

VZŤAH MEDZI PROPROTEÍNOVOU KONVERTÁZOU SUBTILIZÍN/KEXÍN TYPU 9 – PCSK9 A CHOLESTEROLOM V LIPOPROTEÍNOVÝCH ČASTICIACH PRI ISCHEMICKEJ CHOROBE SRDCA

Hubková B.¹, Mašlanková J.¹, Birková A.¹, Večurkovská I.¹, Pella D.ml.²

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

²I. Kardiologická klinika UPJŠ LF a VÚSCH, a.s., Košice

Cieľ Cieľom predloženej práce je analyzovať vzťah medzi proproteínovou konvertázou subtilizín/kexín typu 9 (PCSK9) a cholesterolom v lipoproteínových subfrakciách u pacientov s podozrením na ischemickú chorobu srdca.

Materiál a Metodika Frakcionácia lipoproteínových častíc a kvantifikácia cholesterolu v príslušných subfrakciách bola vykonaná elektroforetickou metódou Lipoprint®. Analýza PCSK9 bola vykonaná metódou ELISA. Výsledky boli korelované s nálezom selektívnej koronárnej angiografie (SKG).

Výsledky Hladiny PCSK9 signifikantne pozitívne korelovali s celkovým cholesterolom a LDL-cholesterolom a boli výrazne vyššie u žien v porovnaní s mužmi. Koreláciu hladín PCSK9 s lipoproteínovými subfrakciami sme preto vyhodnocovali v závislosti od pohlavia a BMI. U žien boli štatisticky významné korelácie medzi hladinami PCSK9 a celkovým cholesterolom, kým u mužov aj medzi PCSK9 a TAG, LDL-C a frakciami LDL-2 a LDL-3. Väčšie subfrakcie LDL aj HDL prevládali najmä u pacientov s fyziologickými BMI a hladinami PCSK9 nad 170 ng/mL. U mužov boli vyššie koncentrácie malých subfrakcií HDL aj LDL zaznamenané u pacientov s nadváhou až obezitou a hladinami PCSK9 nad 170 ng/mL. U žien bol tento trend podobný len v prípade malých HDL frakcií, keďže u nich sme výrazne zvýšené množstvo malých aterogénnych LDL frakcií pozorovali najmä v prípade fyziologických hladín BMI a vysokých hladín PCSK9 nad 220 ng/mL. Korelačná analýza nepotvrdila vzťah medzi PCSK9 a závažnosťou nálezu pri SKG.

Záver Hladiny PCSK9 sú výrazne vyššie u žien než u mužov, v prítomnosti obezity je korelácia medzi PCSK9 a LDL-cholesterolom menej výrazná. Stanovenie hladín PCSK9 má potenciál pri využití ako skorého markera ischemickej choroby srdca u obeznych pacientov, keďže u našich probandov s priemernou hodnotou BMI nad 30 kg/m² hladiny PCSK9 so stúpajúcou závažnosťou nálezu pri SKG najprv stúpali, napokon klesali.

Kľúčové slová: ateroskleróza, PCSK9, lipoproteín, cholesterol, koronárna angiografia, medzipohlavné rozdiely, ischemická choroba srdca, obezita a nadváha

Úvod

Proteolytické štiepenie je hlavným mechanizmom regulácie aktivity proteínov. Pečeňové proproteínové konvertázy (PK) patria medzi serínové endopeptidázy, zúčastňujúce sa aktivácie významných neuropeptidov, peptidových hormónov, cytokínov, rastových faktorov, proteínových receptorov na povrchu buniek, proteáz, adhézných molekúl, ako aj iných sérových proteínov [10, 17]. Niektoré PK sú využívané aj patogénmi na zvýšenie ich infekčnosti [21]. Väčšina z deviatich známych členov PK pôsobí hydrolyticky v mieste zásaditých aminokyselín. Proproteínová konvertáza subtilizín/kexín typu 9 (proproteín convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) a subtilizín/kexín-izozým 1 (site-1 protease, S1P) sa od ostatných PK odlišujú a nehydrolyzujú peptidový/proteínový reťazec v mieste zásaditých aminokyselín [10].

PCSK9 je produkovaný najmä v tkanivách pečene, čriev a obličiek vo forme neaktívneho zymogénu s komplexne naviazanou inhibičnou prodoménou. PCSK9 gén kóduje proteín o približnej veľkosti 72kDa pozostávajúci z 692 aminokyselín. Na proproteíne PCSK9 rozlišujeme päť hlavných sekvencií: signálny peptid (aminokyseliny 1 až 30), N-terminálnu doménu (aminokyseliny 31 až 152), katalytickú doménu - serínovú proteázu (aminokyseliny 153 až 404), závesný „hinge“ región (aminokyseliny 405 až 454) a C terminálnu doménu bohatú na cysteín a histidín (aminokyseliny 455 až 692). Autokatalýza

umožňuje uvoľnenie proteínu z endoplazmatického retikula a po následnej posttranslačnej úprave zahrnujúcej glykozylácie a sulfatáciu sa proproteín uvoľňuje do cirkulácie [6]. V plazme sa PCSK9 nachádza buď v „relej“ intaktnej forme, vo forme po natrávení furinom, ktorý taktiež patrí medzi PK, alebo vo forme di- až oligomérov s vysokou molekulovou hmotnosťou [4]. Sekvencia génu PCSK9 bola publikovaná len pred dvadsiatimi rokmi, onedlho však bolo dokázané, že zmeny v expresii génu výrazne modulujú biologickú aktivitu PCSK9 a následne aj metabolické dráhy regulované PCSK9 [17]. Prepojenie medzi mutáciou v géne kódujúcom PCSK9 a autozomálne dominantnou familiárnou hypercholesterolémiou bolo opísané v roku 2003 Abifadelom a kol. [1, 18].

Medzi najznámejšie funkcie PCSK9 patrí neenzymatická modifikácia pečeňových receptorov lipoproteínov s nízkou hustotou (low-density lipoprotein receptor, LDLR), ktoré PCSK9 neštiepi, ale sa na nich viaže, čím jednak uľahčuje ich uvoľnenie z endoplazmatického retikula ale aj podporuje ich degradáciu v endozómoch/lyzozómoch a znemožní ich prirodzenú recykláciu. Okrem receptorov LDL, PCSK9 zvyšuje degradáciu aj iných receptorov príbuzných LDLR: napríklad (Apo)E receptora 2 (ApoER2), receptora pre lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou (very low-density lipoprotein receptor, VLDLR), glykoproteínového receptora CD36 s rozmanitou funkciou v závislosti od typu buniek, na ktorých je exprimovaný, prevažne zapojeného do metabolizmu

masných kyselín, esterov cholesterolu, oxidovaných lipoproteínov a fosfolipidov, proteínu 1 súvisiaceho s LDLR (LRP1) zapojeného do receptorom sprostredkovanej endocytózy tak vo fyziologických ako aj pri patologických procesoch [6, 12, 18]. Zdokumentovaním úlohy PCSK9 pri zacielení rozmanitých receptorov s cieľom ich degradácie, sa potvrdila jeho regulačná úloha v rôznych procesoch, vrátane metabolizmu cholesterolu, masných kyselín a súvisiacej aterosklerózy, vaskulárneho zápalu, vírusových infekcií a regulácie imunitnej odpovede napríklad pri rakovine [17].

Väčšina PCSK9 v obehu je viazaná na rôzne lipoproteíny, najmä LDL, lipoproteín(a) (Lp(a)) a lipoproteíny s vysokou hustotou (high-density lipoprotein, HDL), avšak nie na lipoproteíny bohaté na TAG, akými sú chylomikróny (CM) a lipoproteíny s veľmi vysokou hustotou (VLDL). Naopak, TAG-bohaté lipoproteíny zvyšujú mieru di- a trimerizácie proproteínu, čím zvyšujú efektívnosť degradácie LDLR. HDL častice inhibujú tvorbu di- a trimérov PCSK9, čo sa považuje za jeden z mechanizmov, akým sa HDL častice zapájajú do inhibície aterosklerózy [6]. Aj keď je pečeň len jedným z tkanív, ktoré PCSK9 produkujú, bolo preukázané, že je primárnym zdrojom plazmatických hladín PCSK9 [15]. Extrahepatálne produkovaný PCSK9 pravdepodobne vykonáva výlučne intracelulárne funkcie alebo pôsobí parakrinne. Z toho vyplýva, že extrahepatálne receptory LDL zohrávajú naďalej významnú úlohu v katabolizme LDL-C, nie sú ovplyvnené plazmatickou hladinou PCSK9. Črevom produkovaný PCSK9 vplýva predovšetkým na lipoproteíny bohaté na TAG vytvorené v enterocytoch. Pozitívne vplyva tak na ich produkciu ako aj na ich sekréciu, transkripčnými aj post-transkripčnými mechanizmami [18]. Produkcia PCSK9 bola dokázaná aj endotelovými bunkami, vaskulárnymi hladkosvalovými bunkami ako aj inými bunkami aterosklerotického plaku. PCSK9 v podmienkach oxidačného stresu stimuluje transkripciu génu kódujúceho receptor pre oxidované LDL (LOX-1) a naopak LOX-1 aktivácia stimuluje expresiu PCSK9. Táto vzájomná interakcia môže podporovať aterogénu, najmä v podmienkach oxidačného stresu a zápalu [18].

Rizikovým faktorom ischemickej choroby srdca je aterogénna dyslipidémia, pri ktorej je koncentrácia LDL-cholesterolu (LDL-C) a počet častíc LDL zvýšená a naopak, počet lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL, high-density lipoprotein) ako aj koncentrácia HDL-cholesterolu (HDL-C) znížená [5, 9]. Zvýšená početnosť LDL a HDL je dôsledkom posunu príslušných lipoproteínov smerom k menším časticiam. Táto heterogenita subpopulácií vysvetľuje rôznorodý efekt malých resp. veľkých lipoproteínov na vývoj aterosklerózy. Kým malé LDL častice sa považujú za aterogénne, malým HDL časticiam sa pripisuje významná antioxidačná aktivita a teda ateroprotektívne vlastnosti. Malé HDL častice sú prítomné vo väčšej miere pri rôznych srdcových a cievnych ochoreniach, ischemickej chorobe srdca

a iných prejavoch aterosklerózy, pravdepodobne v dôsledku obohacovania HDL častíc o triacylglyceroly (TAG) v podmienkach aterogénnej dyslipidémie [4, 11]. Vzhľadom na rozsiahly výskum v oblasti PCSK9 nastal posun aj v liečbe aterogénnej dyslipidémie. Na trhu sa objavili inhibítory PCSK9, ktoré významne znižujú LDL-C a následné kardiovaskulárne riziko [16, 19]. Vzťah medzi subfrakciami LDL a HDL a PCSK9 ešte nie je úplne objasnený. Cieľom tejto práce je analyzovať vzťah medzi dôležitým modulátorom lipoproteínového metabolizmu – PCSK9 a cholesterolom v lipoproteínových subfrakciách LDL a HDL s rôznorodými úlohami v aterogéneze u pacientov s podozrením na ischemickú chorobu srdca.

Materiál a metodika

Probandmi štúdie boli pacienti vo veku nad 18 rokov prijatí s podozrením na ischemickú chorobu srdca na 1. kardiologickú kliniku UPJŠ LF a VÚSCH, a.s. v Košiciach. Pacienti podstúpili odber krvi na zistenie vybraných laboratórnych ukazovateľov (celkový cholesterol, TAG, HDL-C, LDL-C, fibrinogén) a boli vyšetrení selektívnou koronárnou angiografiou (SKG). Na základe nálezu pri SKG boli pacienti zaradení do skupín nasledovne: skupina pacientov bez nálezu – skupina 0 a skupina pacientov s pozitívnym nálezom, pričom tento nález bol odstupňovaný podľa závažnosti do podskupín 1 až 5. Kritériom nezariadenie do štúdie bola v minulosti potvrdená prítomnosť ischemickej choroby srdca a záznam v osobnej anamnéze o akútnom koronárnom syndróme. Elektroforetická separácia lipoproteínov nízkej hustoty bola vykonaná metódou Lipoprint® Lipoprotein Subfractions Testing System (Quantimetrix, US) [9]. Výstupom je kvantifikácia cholesterolu v subfrakciách lipoproteínov s vysokou hustotou (10 frakcií, HDL 1 až 10). Hladina PCSK9 bola analyzovaná kvantitatívne metódou enzýmového imunotestu (enzyme-linked immunosorbent assay, human PCSK9 ELISA kit, Abcam, UK). Metóda využíva záchytné protilátky (capture antibodies) konjugované s afinitnou značkou, ktoré sú rozpoznávané monoklonálnou protilátkou špecifickou pre ľudský PCSK9, vopred nanesenou na mikroplatničku. Po nanesení vzoriek, inkubácii a premytí nenaviazaného materiálu sa množstvo PCSK9 kvantifikuje použitím spektrofotometrickej detekcie pri 450 nm. Citlivosť metódy je 68 pg/mL a rozsah merania 0,5 - 32 ng/mL. Štatistická analýza bola spracovaná použitím programu SPSS Statistics 29 (IBM). Výskum bol schválený 24.1.2019 Etickou komisiou UPJŠ LF 18N/2021 a Etickou komisiou VÚSCH, a.s..

Výsledky

Štúdie sa zúčastnilo 143 pacientov prijatých s podozrením na ischemickú chorobu srdca. Na základe vyšetrenia SKG boli pacienti zatriedení do skupín podľa závažnosti nálezu. Ich základné antropometrické parametre, ako aj hladiny lipidových parametrov, fibrinogénu a PCSK9 vzhľadom na nález pri SKG sú uvedené v Tab. 1.

Table 1 Mean age, BMI, systolic blood pressure, lipid profile, fibrinogen, PCSK9 values based on coronary angiography findings in patients with suspected coronary artery disease (source: the author)

Findings on coronary angiography	Age [years]	BMI [kg/m ²]	SBP [mmHg]	TC [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]	FBG [g/l]	PCSK9 [ng/ml]
0, N = 39	61.3±10.7	32.21±8.41	146±15	4.55±1.17	1.57±0.87	1.29±0.33	2.73±0.97	3.28±0.88	130±56
1, N = 11	62.7±10.5	30.57±4.42	137±10	4.08±1.00	1.17±0.38	1.36±0.29	2.28±0.76	3.17±0.73	157±61
2, N = 11	69.1±9.8	30.93±3.54	144±11	5.37±1.03	1.80±1.30	1.28±0.26	3.22±0.79	3.20±0.59	174±79
3, N = 26	67.4±7.7	31.86±4.98	139±16	4.74±1.63	1.86±0.91	1.29±0.44	3.18±1.93	3.21±0.64	134±46
4, N = 29	65.2±9.7	32.26±5.98	140±19	4.44±1.11	1.57±0.67	1.26±0.35	2.68±1.03	3.32±0.86	134±55
5, N = 27	61.3±8.8	30.37±4.36	138±17	5.00±1.14	1.80±0.98	1.19±0.23	3.26±1.01	3.42±0.63	129±66

0 – without positive finding on coronary angiography; 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography; BMI – body mass index; SBP – systolic blood pressure; TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols; HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C – low-density lipoprotein-cholesterol; FBG – fibrinogen; PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

Korelačná analýza nepotvrdila vzťah medzi PCSK9 a závažnosťou nálezu pri SKG (Pearsonov korelačný faktor -0,036, $p = 0,668$). Naopak, korelácia medzi celkovým cholesterolom (Pearsonov korelačný faktor 0,302, $p <$

0,001***), LDL-C (Pearsonov korelačný faktor 0,200, $p < 0,016^*$) a pohlavím (Pearsonov korelačný faktor 0,299, $p < 0,001^{***}$) bola štatisticky významná (Tab. 2).

Table 2 Correlation analysis in patients with suspected coronary artery disease (source: the author)

PCSK9 correlation	Pearsons correlation factor	Lower confidence interval	Upper confidence interval	<i>p Value</i>
Age [years]	0.032	-0.133	0.195	0.704 ^{ns}
BMI [kg/m ²]	0.105	-0.060	0.265	0.212 ^{ns}
SBP [mmHg]	-0.110	-0.270	0.055	0.190 ^{ns}
TC [mmol/l]	0.302	0.145	0.444	< 0.001***
TAG [mmol/l]	0.141	-0.023	0.299	0.092 ^{ns}
HDL-C [mmol/l]	0.146	-0.018	0.303	0.081 ^{ns}
LDL-C [mmol/l]	0.200	0.037	0.353	0.016*
FBG [g/l]	0.164	0.000	0.320	0.050 ^{ns}
gender	0.299	0.142	0.441	< 0.001***
Findings on coronary angiography	-0.036	-0.199	0.129	0.668 ^{ns}

PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; BMI – body mass index; SBP – systolic blood pressure; TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols; HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C – low-density lipoprotein-cholesterol; FBG – fibrinogen; ns – not significant correlation, * – correlation is significant at the 0.05 level; *** – correlation is significant at the 0.001 level; confidence interval – 95.0 %

Rozdielnosť skúmaných parametrov v závislosti od pohlavia je uvedená v Tab. 3 a Tab. 4. Výsledky poukazujú na štatisticky významný rozdiel medzi priemerným vekom respondentov, s vyššími hodnotami u zúčastnených žien, u ktorých sa potvrdili vyššie hladiny HDL-C tak veľkých (Large HDL) ako aj stredných (Intermediate HDL) subfrakcií, ako aj vyššie hladiny PCSK9. Závažnosť nálezu pri SKG bola u žien nižšia, najviac ich bolo zaradených do kategórie 0 (37,0 %), pričom len u 11,1 % žien sa potvrdil najzávažnejší nález (kategória 5). U mužov dominovali závažné nálezy (kategória 4 a 5, 24,7 % a 23,6 %) a bez nálezu pri SKG bolo 21,4 % (kategória 0). Sérové hladiny PCSK9 u mužov a žien v jednotlivých kategóriách podľa nálezu pri SKG sú uvedené v Tab. 5

a Obr. 1. Výsledky poukazujú na významné rozdiely v hodnotách PCSK9 u mužov a žien zaradených do kategórie 0, teda bez závažných nálezu (102,42 ± 36,69 ng/mL u mužov a 157,01 ± 59,64 ng/mL u žien, $p = 0,002^{**}$) a zaradených do kategórie 1 (113,93 ± 20,17 ng/mL u mužov a 192,04 ± 62,32 ng/mL u žien, $p = 0,026^*$). Medzi jednotlivými kategóriami sa u žien štatisticky významné rozdiely nepotvrdili, u mužov len medzi kategóriami 0 a 3 (102,42 ± 36,69 ng/mL u mužov a 171,82 ± 76,11 ng/mL, $p = 0,003^{**}$). Z grafického výstupu vyplýva, že tak u žien, ako aj u mužov sa hladiny PCSK9 so závažnosťou nálezu najprv zvyšujú, napokon znižujú (Obr. 1).

Table 3 Results of t-test (equality of means) of mean age, BMI, systolic blood pressure, lipid profile, fibrinogen, PCSK9 values and coronary angiography findings in men and women with suspected coronary artery disease (source: the author)

	Men, n = 89	Women, n = 54	<i>p Value</i>
Age [years]	63 ± 10	67 ± 9	0.035*
BMI [kg/m ²]	31 ± 5	32 ± 8	0.248 ^{ns}
BMI < 25	9 (10 %)	8 (15 %)	
BMI 25-30	31 (35 %)	13 (24 %)	
BMI > 30	49 (55 %)	33 (61 %)	
SBP [mmHg]	141 ± 17	141 ± 16	0.982 ^{ns}
TC [mmol/l]	4.57 ± 1.29	4.80 ± 1.22	0.305 ^{ns}
TAG [mmol/l]	1.76 ± 1.01	1.51 ± 0.65	0.107 ^{ns}
HDL [mmol/l]	1.17 ± 0.27	1.44 ± 0.36	< 0.001***
LDL [mmol/l]	2.87 ± 1.13	3.00 ± 1.39	0.540 ^{ns}
FBG [g/l]	3.22 ± 0.76	3.39 ± 0.71	0.181 ^{ns}
PCSK9 [ng/ml]	123 ± 53	160 ± 62	< 0.001***
PCSK9 < 170	78 (88 %)	13 (24 %)	
PCSK9 170-220	7 (8 %)	34 (63 %)	
PCSK9 > 220	4 (4 %)	7 (13 %)	
Findings on coronary angiography 0	19 (21.4 %)	20 (37.0 %)	0.006**
Findings on coronary angiography 1	5 (5.6 %)	6 (11.1 %)	
Findings on coronary angiography 2	8 (9.0 %)	3 (5.6 %)	
Findings on coronary angiography 3	14 (15.7 %)	12 (22.2 %)	
Findings on coronary angiography 4	22 (24.7 %)	7 (13.0 %)	
Findings on coronary angiography 5	21 (23.6 %)	6 (11.1 %)	

BMI – body mass index; SBP – systolic blood pressure; TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols; HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol; LDL – low-density lipoprotein-cholesterol; FBG – fibrinogen; PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; findings on coronary angiography 0 – without positive finding on coronary angiography, 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography; categorical variables are expressed as frequencies and percentages; continuous variables are expressed as mean ± standard deviation; ns – difference is not significant, * – difference is significant at the 0.05 level; *** – difference is significant at the 0.001 level

Table 4 Results of t-test (equality of means) of cholesterol in the respective lipoprotein fractions in men and women with suspected coronary artery disease (source: the author)

	Men, n = 89	Women, n = 54	<i>p Value</i>
Large HDL [mmol/l]	0.25 ± 0.19	0.40 ± 0.21	< 0.001***
Intermediate HDL [mmol/l]	0.61 ± 0.15	0.76 ± 0.19	< 0.001***
Small HDL [mmol/l]	0.30 ± 0.12	0.28 ± 0.11	0.226 ^{ns}
VLDL [mmol/l]	1.35 ± 0.58	1.33 ± 0.42	0.803 ^{ns}
IDL-C [mmol/l]	0.39 ± 0.28	0.39 ± 0.18	0.897 ^{ns}
IDL-B [mmol/l]	0.21 ± 0.17	0.21 ± 0.13	0.834 ^{ns}
IDL-A [mmol/l]	0.28 ± 0.17	0.34 ± 0.18	0.024*
LDL-1 [mmol/l]	0.62 ± 0.30	0.79 ± 0.37	0.003**
LDL-2 [mmol/l]	0.56 ± 0.34	0.47 ± 0.31	0.113 ^{ns}
LDL-3 to 7 [mmol/l]	0.17 ± 0.23	0.09 ± 0.15	0.017*
Mean LDL size [Å]	266.85 ± 5.56	269.98 ± 4.09	< 0.001***

Large-, Intermediate-, Small HDL – cholesterol in the respective high-density lipoprotein fractions; VLDL – cholesterol in the very low-density lipoprotein fraction; IDL-C, -B, -A – cholesterol in the respective intermediate-density lipoprotein fraction; LDL-1, -2, 3 to 7 – cholesterol in the respective low-density lipoprotein fraction; continuous variables are ex-

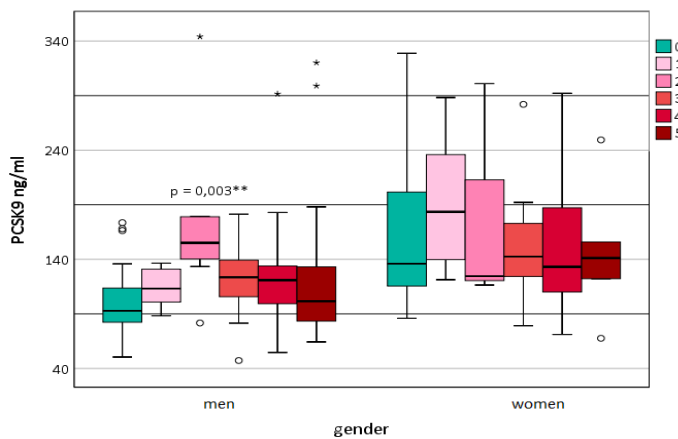
pressed as mean ± standard deviation; ns – difference is not significant, * – difference is significant at the 0.05 level; ** – difference is significant at the 0.01 level; *** – difference is significant at the 0.001 level

Table 5 PCSK9 value in ng/mL in men and women with suspected coronary artery disease based on findings on coronary angiography (source: the author)

Findings on coronary angiography	Men, n = 89		Women, n = 54		p Value
0	n = 19	102.42 ± 36.69	n = 20	157.01 ± 59.64	0.002**
1	n = 5	113.93 ± 20.17	n = 6	192.04 ± 62.32	0.026*
2	n = 8	171.82 ± 76.11	n = 3	180.66 ± 104.31	0.879 ^{ns}
3	n = 14	119.14 ± 33.37	n = 12	150.92 ± 54.07	0.079 ^{ns}
4	n = 22	127.08 ± 46.71	n = 7	155.88 ± 74.26	0.230 ^{ns}
5	n = 21	124.44 ± 68.76	n = 6	146.26 ± 59.67	0.489 ^{ns}

findings on coronary angiography 0 – without positive finding on coronary angiography. 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography; categorical variables are expressed as frequencies and percentages; continuous variables are expressed as mean ± standard deviation; ns – difference is not significant. * – difference is significant at the 0.05 level; ** – difference is significant at the 0.01 level

Figure 1 PCSK9 in ng/mL in men and women based on findings on angiography (source: the author)

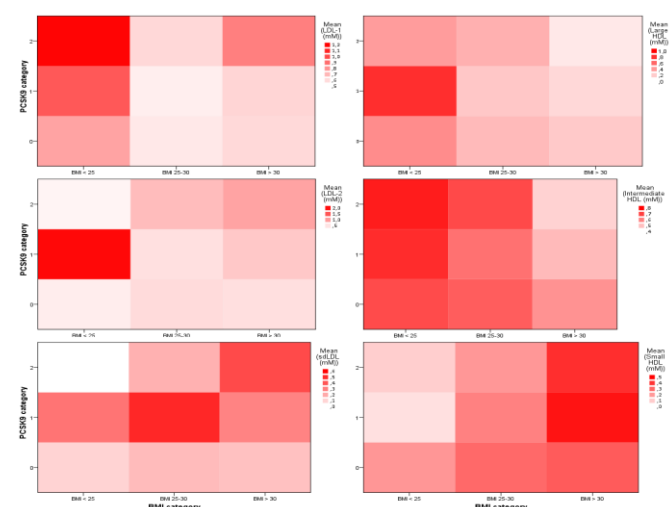


findings on coronary angiography 0 – without positive finding on coronary angiography; 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography

Vzhľadom na to, že niektoré zdroje uvádzajú, že hladiny PCSK9 nekorelujú s hladinami LDL-C u obéznych ľudí [18], koreláciu medzi PCSK9 a lipoproteínovými subfrakciami v závislosti od BMI a pohlavia sme znázornili použitím metódy „heat map“. Kým korelačná analýza odhalila súvis medzi PCSK9 a strednými LDL-2 a malými LDL-3 subfrakciami u mužov, u žien sa významné korelácie medzi PCSK9 a subfrakciami lipoproteínov nepotvrdili (Tab. 6). Dvojmerná grafická prezentácia dát v závislosti od viacerých premenných poukazuje na najväčšie zastúpenie veľkých najmenej aterogénnych LDL frakcií (LDL-1) u mužov s fyziologickým BMI avšak s vysokými hladinami PCSK9 nad 220 ng/mL, najväčšie zastúpenie stredných LDL frakcií (LDL-2) u mužov s fyziologickými hodnotami BMI a fyziologickými hladinami PCSK9 (170-220 ng/mL), a najväčšie zastúpenie malých a denzných aterogénnych LDL frakcií (sdLDL, LDL-3 až 7) u mužov s nadváhou (BMI 25-30) a fyziologickými hladinami PCSK9 (170-220 ng/mL). Distribúcia HDL subfrakcií u mužov bola nasledovná: najväčšie frakcie HDL (Large HDL, HDL-1 až 3) boli

zaznamenané u mužov s fyziologickými hodnotami BMI a fyziologickými hladinami PCSK9 (170-220 ng/mL), stredné frakcie HDL (Intermediate HDL, HDL-4 až 7) u mužov s fyziologickými hladinami BMI a normálnymi až vysokými hladinami PCSK9 (nad 170 ng/mL), a malé HDL (HDL-8 až 10) u mužov s obezitou a normálnymi až vysokými hladinami PCSK9 (nad 170 ng/mL) (Obr. 2). U žien sme najväčšiu koncentráciu veľkých LDL frakcií zaznamenali takisto ako u mužov v prípade fyziologických hladín BMI, ale s fyziologickými hladinami PCSK9 (170-220 ng/mL), stredné a malé LDL frakcie boli výrazné u žien s fyziologickým BMI ale vysokými hladinami PCSK9 (nad 170 ng/mL). Veľké HDL frakcie boli výrazné u žien s normálnymi hodnotami BMI, s malými odchýlkami v závislosti od hodnôt PCSK9. Stredné frakcie HDL boli najvyššie u žien s fyziologickými hladinami BMI a hladinami PCSK9 nad 220 ng/mL. Malé HDL prevažovali u žien s nadváhou a hodnotami PCSK9 nad 170 ng/mL (Obr. 3).

Figure 2 Heat map visualisation of PCSK9, BMI and lipoprotein fractions in men (source: the author)

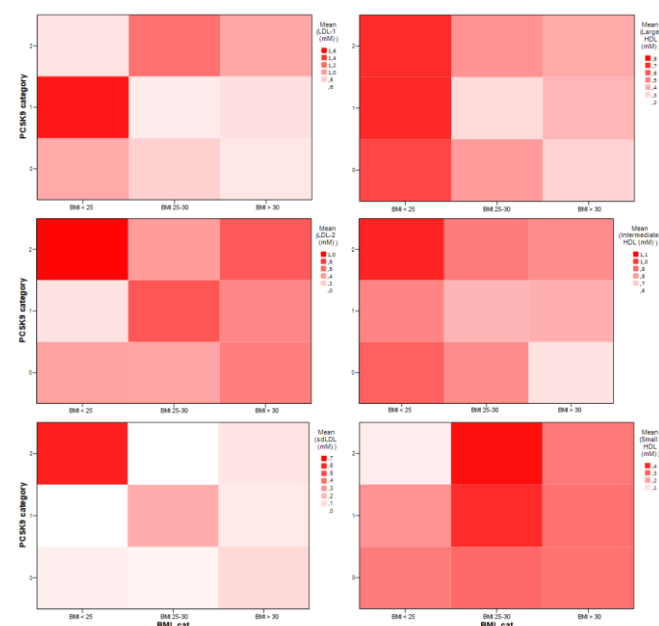


PCSK9 category 0 – values < 170 ng/mL; PCSK9 category 1 – values 170-220 ng/mL; PCSK9 category 2 – values > 220 ng/mL

Table 6 Correlation analysis in men and women with suspected coronary artery disease (source: the author)

PCSK9 correlation	Men, n = 89			Women, n = 54		
	Pearsons correlation factor	Lower, upper C.I.	<i>p</i> Value	Pearsons correlation factor	Lower, upper C.I.	<i>p</i> Value
Age [years]	-0.048	-0.254, 0.162	0.654 ^{ns}	0.018	-0.251, 0.284	0.900 ^{ns}
BMI [kg/m ²]	0.040	-0.170, 0.246	0.709 ^{ns}	0.118	-0.155, 0.374	0.396 ^{ns}
SBP [mmHg]	-0.076	-0.280, 0.134	0.478 ^{ns}	-0.182	-0.429, 0.090	0.187 ^{ns}
TC [mmol/l]	0.291	0.088, 0.471	0.006 ^{**}	0.294	0.028, 0.521	0.031 [*]
TAG [mmol/l]	0.251	0.046, 0.437	0.017 [*]	0.084	-0.188, 0.344	0.545 ^{ns}
HDL-C [mmol/l]	-0.077	-0.280, 0.134	0.475 ^{ns}	0.142	-0.131, 0.395	0.307 ^{ns}
LDL-C [mmol/l]	0.226	0.019, 0.415	0.033 [*]	0.157	-0.116, 0.408	0.257 ^{ns}
LDL-1 [mmol/l]	0.130	-0.081, 0.329	0.226 ^{ns}	0.199	-0.072, 0.444	0.148 ^{ns}
LDL-2 [mmol/l]	0.231	0.024, 0.419	0.030 [*]	0.208	-0.063, 0.451	0.132 ^{ns}
sdLDL [mmol/l]	0.215	0.007, 0.405	0.043 [*]	0.175	-0.097, 0.423	0.204 ^{ns}
Large HDL [mmol/l]	-0.096	-0.298, 0.115	0.373 ^{ns}	0.034	-0.236, 0.299	0.806 ^{ns}
Intermediate HDL [mmol/l]	0.299	-0.270, 0.145	0.065 ^{ns}	0.135	-0.138, 0.388	0.332 ^{ns}
Small HDL [mmol/l]	0.052	-0.158, 0.258	0.625 ^{ns}	0.159	-0.114, 0.409	0.252 ^{ns}

PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; BMI – body mass index; SBP – systolic blood pressure; TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols; HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C – low-density lipoprotein-cholesterol; LDL-1 – cholesterol in large low-density lipoprotein-1 subfraction; LDL-2 – cholesterol in intermediate low-density lipoprotein-2 subfraction; sdLDL – cholesterol in small low-density lipoprotein-3 to 7 subfractions; Large HDL – cholesterol in large high-density lipoprotein-1 to 3 subfractions; Intermediate HDL – cholesterol in intermediate high-density lipoprotein-4 to 7 subfractions; Small HDL – cholesterol in small high-density lipoprotein-8 to 10 subfractions; ns – not significant correlation; * – correlation is significant at the 0.05 level; *** – correlation is significant at the 0.001 level; confidence interval – 95.0 %, PCSK9 category 0 – values < 170 ng/mL; PCSK9 category 1 – values 170-220 ng/mL; PCSK9 category 2 – values > 220 ng/mL

Figure 3 Heat map visualisation of PCSK9, BMI and Lipoprotein fractions in women (source: the author)

PCSK9 category 0 – values < 170 ng/mL; PCSK9 category 1 – values 170-220 ng/mL; PCSK9 category 2 – values > 220 ng/mL

Diskusia

Od objavenia PCSK9 a jeho vplyvu na metabolizmus cholesterolu ubehlo len 20 rokov, avšak prvé liečivá na báze inhibítorov PCSK9 sa v klinickej praxi naplno využívajú. Existuje množstvo štúdií popisujúce vplyv týchto inhibítorov na zníženie hladín LDL-C a Lp(a) [4, 6, 8, 14, 18]. Niektoré popisujú synergický vplyv so statínmi [6], iné poukazujú na zvýšenie expície génu PCSK9 vplyvom statínov a liečiva Ezetimibe [3, 13]. Niektoré zdroje poukazujú na vplyv inhibítorov PCSK9 na zvýšenie hladín HDL-C [6], tie však nemusia zaručiť zníženie aterogénneho rizika. Dafnis a kol. [4] skúmali vzťah medzi subfrakciami HDL a PCSK9. Podľa ich zistenia je na apoB častice viazaných až 68% cirkulujúcich PCSK9, čo je v súlade so zisteniami iných autorov [6]. Po odstránení apoB častíc z plazmy zistili, že zo zvyšných 32 % je iba 6 % viazaných na HDL častice. Štruktúru PCSK9 v jednotlivých subfrakciách izolovaných metódou Lipoprint® určili nasledovne: veľké a stredné HDL frakcie boli viazané s furínom štiepenou, menej efektívnou formou PCSK9, kým v malých subfrakciách detegovali zrelú, intaktnú formu, ktorá vykazuje vyššiu efektívnosť v degradácii LDLR [4]. HDL okrem reverzného transportu cholesterolu vykazujú aj iné antiaterogénne vlastnosti. Pôsobí voči reaktívnym formám kyselika (reactive oxygen species, ROS), stimuluje migráciu endotelových buniek, v dôsledku čoho dochádza k neovaskularizácii aterosklerotických plakov. Dafnis

a kol. dokázali, že kým naviazanie PCSK9 na malé HDL častice výrazne zvyšuje efektivitu PCSK9 pri odstraňovaní LDLR, PCSK9 inhibuje ateroprotektívny vplyv HDL častíc tak v zmysle nižšej účinnosti voči ROS aj voči migrácii endotelových buniek [4]. Nespornou výhodou inhibície PCSK9 je stimulácia fyziologických funkcií HDL častíc aj pri ich nezmenenej koncentrácii. Relatívne nová štúdia z roku 2021 vyvracia teóriu o väzbe PCSK9 predovšetkým na apoB lipoproteíny [2]. Podľa nich sa apoB častice obohacujú o PCSK9 až po uvoľnení z väzby s HDL, najmä po najedení, keď je fluktuácia v hladinách HDL najvýraznejšia, pričom PCSK9 považujú za základnú súčasť proteómu HDL. U žien je posun v redistribúcii HDL subpopulácie postprandiálne výraznejší než u mužov, čím vysvetľujú aj vplyv pohlavia na hladiny PCSK9. Autori popisujú významný vplyv HDL aj na aktivitu PCSK9, a ako miesto väzby určujú apolipoproteín apoA1. Na základe ich štúdie je silná korelácia medzi NMR analýzou stanovenou koncentráciou PCSK9 a počtom lipoproteínových častíc, koncentráciou lipidov, apoB-časticami ale aj počtom malých HDL častíc a apolipoproteínmi apoC3. Podobne ako Dafnis a kol., aj autori Burnap a kol. popisujú zvýšenú efektivitu PCSK9 pri degradácii LDLR po naviazaní na HDL častice [4, 2]. V súbore zväčša obéznych pacientov s podozrením na ischemickú chorobu srdca sme štatisticky významné korelácie medzi PCSK9 a subfrakciami HDL nezaznamenali, avšak kým korelácia medzi PCSK9 a veľkými HDL subfrakciami bola negatívna (-0,096 u mužov) alebo slabo pozitívna (0,034 u žien) korelácia medzi PCSK9 a menšími HDL subfrakciami bola výraznejšia pozitívna (stredná HDL frakcia: 0,299 u mužov, malá HDL frakcia: 0,159 u žien).

Podľa odbornej literatúry vykazujú ženy vyššie koncentrácia PCSK9 v porovnaní s mužmi [2, 7]. V štúdiu mapujúcej hladiny PCSK9 v zdravej libanonskej dospeljej populácii s priemerným vekom 39 ± 13 rokov určili medián 300 ng/mL , bez rozdielu medzi pohlaviami a nezávisle od BMI, s vyššími hladinami u starších osôb [7]. Respondenti našej štúdie mali výrazne vyšší priemerný vek a mali podozrenie na ischemickú chorobu srdca. Nami stanovené priemerné hodnoty PCSK9 boli u mužov podľa očakávania nižšie ($123 \pm 53 \text{ ng/mL}$) ako u žien ($160 \pm 62 \text{ ng/mL}$), stanovili sme však nižšie hladiny než autori spomenutej štúdie. Kým výrobca kitu, ktorý použili autori Gannagé-Yared a kol. [7] deklaruje fyziologické hladiny na úrovni 177 až 460 ng/mL , nami stanovené fyziologické hladiny boli v rozmedzí od 170 do 220 ng/mL .

Prehľadová práca Shapira a Fazia popisuje vzťah medzi PCSK9 a rôznymi metódami zobrazujúcimi aterosklerózu [18]. Poukazujú na významnú koreláciu medzi PCSK9 a hrúbkou vnútorných vrstiev krčnej tepny, obsahom vápnika v stene koronárnych tepien meraného metódou počítačovej tomografie (computed tomography, CT), rozsahom zápalu a aterosklerózy určenej pomocou intravaskulárneho ultrazvuku. V našej štúdiu sme pacientov zatriedili podľa závažnosti nálezu pri selektívnej koronárnej angiografii. Hladiny PCSK9 so závažnosťou nálezu najprv stúpali (u mužov z priemernej hladiny $102.42 \pm 36.69 \text{ ng/mL}$ v skupine bez nálezu na hladinu $171.82 \pm 76.11 \text{ ng/mL}$ v podskupine 2 s miernym nálezom;

u žien z priemernej hladiny $157.01 \pm 59,64 \text{ ng/mL}$ bez nálezu až na hladinu $192.04 \pm 62,32 \text{ ng/mL}$ v podskupine 1 s miernym nálezom), napokon klesali (u mužov na hladinu $124.44 \pm 68,76 \text{ ng/mL}$ v podskupine 5 so závažným nálezom, u žien na hladinu $146.26 \pm 59,67 \text{ ng/mL}$ v podskupine 5 so závažným nálezom). Tieto výsledky poukazujú na význam sledovania PCSK9 v rámci personalizovaného prístupu pri prevencii a liečbe aterosklerózy.

Stanovenie PCSK9 v kombinácii so stanovením LDL-cholesterolu dokáže predpovedať mieru prežitia bez kardiovaskulárnych príhod, pričom najvyššiu výpovednú hodnotu majú vysoké hladiny PCSK9 a nízke hladiny LDL-cholesterolu. 15 rokov trvajúca štúdia preukázala najvyššie riziko aterosklerózy u pacientov s vysokými hladinami PCSK9 a nízkymi hladinami LDL-C [18]. Vlachopoulos a kol. [20] vyčíslili zvýšenie rizika kardiovaskulárnych príhod nasledovne: zvýšenie hodnoty PCSK9 o jednu štandardnú odchýlku predstavuje zvýšenie rizika o 10%, pacienti s hladinami PCSK9 v hornom kvartile majú riziko o 23 % vyššie. Podľa ich zistení majú hladiny PCSK9 význam určenia rizika kardiovaskulárnych príhod u bezpríznakových jedincov a nie v populácii s preukázaným aterogénnym rizikom. Bude zaujímavé sledovať pacientov s rizikom ischemickej choroby srdca vzhľadom na ich známu hladinu PCSK9 na začiatku našej štúdie.

Záver

Hladiny PCSK9 sú výrazne vyššie u žien v porovnaní s mužmi. V prítomnosti obezity je korelácia medzi PCSK9 a LDL-cholesterolom menej výrazná, napriek známemu významnému vplyvu PCSK9 na metabolizmus cholesterolu. Stanovenie hladín PCSK9 má potenciál pri využití ako skorý marker ischemickej choroby srdca aj u obéznych pacientov, keďže u našich probandov s priemernou hodnotou BMI nad 30 kg/m^2 hladiny PCSK9 so stúpajúcou závažnosťou nálezu pri SKG najprv stúpali, napokon klesali. Stanovenie hladín PCSK9 by malo byť opakovane uskutočnené s personalizovaným prístupom, vzhľadom na vysokú variabilitu v populácii a kinetike PCSK9 v závislosti od rozvoja aterosklerózy.

Literatúra

1. Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.P. et al.: Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 34, 2003 (2):154-56. doi: 10.1038/ng1161. PMID: 12730697.
2. Burnap, S.A., Sattler, K., Pechlaner, R. et al.: PCSK9 Activity Is Potentiated Through HDL Binding. *Circ Res.* 129, 2021 (11):1039-1053. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319272. Epub 2021 Oct 4. PMID: 34601896; PMCID: PMC8579991.
3. Careskey, H.E., Davis, R.A., Alborn, W.E. et al.: Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res.* 49, 2008 (2):394-8. doi: 10.1194/jlr.M700437-JLR200. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18033751.
4. Dafnis, I., Tsouka, A.N., Gkolfinopoulou, C. et al.: PCSK9 is minimally associated with HDL but impairs the anti-atherosclerotic HDL effects on en-

- dothelial cell activation. *J Lipid Res.* 63, 2022 (10):100272. doi: 10.1016/j.jlr.2022.100272. Epub 2022 Sep 5. PMID: 36067830; PMCID: PMC9526147.
5. Duparc, T., Ruidavets, J.B., Genoux, A.: Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. *Sci Rep.* 10, 2020 (1):8138. doi: 10.1038/s41598-020-65100-2. PMID: 32424189; PMCID: PMC7234989.
 6. Ferri, N., Corsini, A., Macchi, C. et al.: Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and high-density lipoprotein metabolism: experimental animal models and clinical evidence. *Transl Res.* 2016 (173):19-29. doi: 10.1016/j.trsl.2015.10.004. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26548330.
 7. Gannagé-Yared, M.H., Naous, E., Al Achkar, A. et al.: Lipid Parameters and Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 in Healthy Lebanese Adults. *Metabolites.* 12, 2022 (8):690. doi: 10.3390/metabo12080690. PMID: 35893257; PMCID: PMC9394379.
 8. Gaudet, D., Kereiakes, D.J., McKenney, J.M. et al.: Effect of alirocumab, a monoclonal proprotein convertase subtilisin/kexin 9 antibody, on lipoprotein(a) concentrations (a pooled analysis of 150 mg every two weeks dosing from phase 2 trials). *Am J Cardiol.* 114, 2014 (5):711-5. doi: 10.1016/j.amjcard.2014.05.060. Epub 2014 Jun 18. PMID: 25060413.
 9. Hubková, B., Birková, A., Mašlanková, J. et al.: Stanovenie frakcií HDL-cholesterolu pri ischemickej chorobe srdca, Ateroskleróza. 26, 2022 (1-2):1630-637.
 10. Jin, W., Wang, X., Millar, J.S. et al.: Hepatic proprotein convertases modulate HDL metabolism. *Cell Metab.* 6, 2007 (2):129-36. doi: 10.1016/j.cmet.2007.07.009. PMID: 17681148; PMCID: PMC2565575.
 11. Kontush, A., Chapman, M.J.: Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 3, 2006 (3):144-53. doi: 10.1038/npcardio0500. PMID: 16505860.
 12. Lambert, G., Charlton, F., Rye, K.A.: Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis.* 203, 2009 (1):1-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.010. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18649882.
 13. Mayne, J., Dewapura, T., Raymond, A. et al.: Plasma PCSK9 levels are significantly modified by statins and fibrates in humans. *Lipids Health Dis.* 2008 (7):22. doi: 10.1186/1476-511X-7-22. PMID: 18547436; PMCID: PMC2432057.
 14. O'Donoghue, M.L., Fazio, S., Giugliano, R.P. et al.: Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. *Circulation.* 139, 2019 (12):1483-492. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037184. PMID: 30586750.
 15. Roubtsova, A., Munkonda, M.N., Awan, Z.: Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 2011 (4):785-91. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.220988. Epub 2011 Jan 27. PMID: 21273557.
 16. Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Keech, A.C. et al.: Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 376, 2017 (18):1713-722. doi: 10.1056/NEJMoa1615664. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28304224.
 17. Seidah, N.G.: The PCSK9 discovery, an inactive protease with varied functions in hypercholesterolemia, viral infections, and cancer. *J Lipid Res.* 2021, (62):100130. doi: 10.1016/j.jlr.2021.100130. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34606887; PMCID: PMC8551645.
 18. Shapiro, M.D., Fazio, S.: PCSK9 and Atherosclerosis - Lipids and Beyond. *J Atheroscler Thromb.* 24, 2017 (5):462-72. doi: 10.5551/jat.RV17003. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28302950; PMCID: PMC5429160.
 19. Tsouka, A.N., Tellis, C.C., Tselepis, A.D.: Pharmacology of PCSK9 Inhibitors: Current Status and Future Perspectives. *Curr Pharm Des.* 24, 2018 (31):3622-633. doi: 10.2174/1381612824666181010144823. PMID: 30317986.
 20. Vlachopoulos, C., Terentes-Printzios, D., Georgiopoulou, G. et al.: Prediction of cardiovascular events with levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2016 (252):50-60. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.922. Epub 2016 Jul 31. PMID: 27501130.
 21. Wu, Q., Chen, S.: Proprotein convertase subtilisin/kexin 6 in cardiovascular biology and disease. *Int J Mol Sci.* 23, 2022 (21):13429. doi: 10.3390/ijms232113429. PMID: 36362216; PMCID: PMC9656567.

RELATION BETWEEN PCSK9 AND LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN CORONARY HEART DISEASE

Hubková B., Mašlanková J., Birková A., Večurkovská I., Pella D.ml.

Aim The objective of the present work is to analyse the relation between an important modulator of lipoprotein metabolism – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and cholesterol in lipoprotein subfractions in patients with suspected ischemic heart disease.

Materials and Methods Fractionation of lipoprotein particles and quantification of cholesterol in the respective subfractions were performed using the Lipoprint® electrophoretic method. PCSK9 analysis was performed by ELISA method. The results were correlated with the findings of selective coronary angiography.

Results PCSK9 levels strongly correlated with total cholesterol and LDL-cholesterol and were significantly higher in women compared to men. Therefore, we evaluated the correlation of PCSK9 levels with lipoprotein subfractions depending on gender and BMI. In women, there were statistically significant correlations between PCSK9 levels and total cholesterol, while in men also between PCSK9 and TAG, LDL-C and LDL-2 and LDL-3 fractions. The correlation between PCSK9 and HDL subfractions was not confirmed. Larger subfractions of both LDL and HDL were prevalent in patients with physiological BMI and PCSK9 levels above 170 ng/mL. In men, higher concentrations of both small HDL and LDL subfractions were noted in overweight to obese patients with PCSK9 levels above 170 ng/mL. In women, this trend was similar only in small HDL fractions, as a significantly increased amount of small atherogenic LDL fractions were detected in women with physiological levels of BMI and high levels of PCSK9 above 220 ng/mL.

Conclusion PCSK9 levels are significantly higher in women compared to men. In the presence of obesity, the correlation between PCSK9 and LDL-cholesterol is less pronounced despite the confirmed significant influence of PCSK9 on cholesterol metabolism. Determination of PCSK9 levels has the potential as early marker of ischemic heart disease even in obese patients, since in our probands with an average BMI value above 30 kg/m², PCSK9 levels first increased then decreased with increasing severity of the findings on coronary angiography. Correlation analysis did not confirm the relationship between PCSK9 and the severity of the findings on coronary angiography.

Key words atherosclerosis, PCSK9, lipoprotein, cholesterol, coronary angiography, gender differences, ischemic heart disease, obesity and overweight

Práca vznikla pri riešení projektu OPENMED ITMS: 313011V455.

Autori deklarujú, že nemajú potenciálny konflikt záujmov.

Ing. Beáta Hubková. PhD.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF
Trieda SNP 1, Košice
E-mail: beata.hubkova@upjs.sk