

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Ing. Kateřina Dunovská

Biochemie a patobiochemie fylochinonu a menachinonů

Biochemistry and pathobiochemistry of phyloquinone and menaquinones

Disertační práce

Školitelka: Ing. Eva Klapková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.8.2020

Ing. Kateřina Dunovská

Identifikační záznam:

DUNOVSKÁ, Kateřina. Biochemie a patobiochemie fylochinonu a menachinonů. [*Biochemistry and Pathobiochemistry of Phylloquinone and Menaquinones*]. Praha, 2020. 147 stran, 1 příloha. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol. Školitelka Klapková, Eva.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Evě Klapkové, Ph.D. za odborné vedení mého nejen postgraduálního studia a projektů s ním souvisejících, ale i za možnost kdykoliv otevřeně debatovat o všech úskalích, jež s sebou výzkumná práce přináší. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. Richardu Průšovi, CSc. a MUDr. Janě Čepové, Ph.D., MBA za umožnění měření této disertační práce na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol. Také bych ráda poděkovala všem svým spolupracovníkům, kteří se podíleli na sběru vzorků.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za jejich nekonečnou trpělivost a podporu v období nezdařených experimentů a těžkých chvil v laboratoři.

Tato disertační práce byla podpořena projektem Ministerstva zdravotnictví koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN Motol). Práce byla financována z interního grantu 6015 (FN Motol).

OBSAH

ÚVOD	8
TEORETICKÁ ČÁST	10
1. <i>Vitamin K</i>	10
1.1. Vitamin K ₁	10
1.2. Vitamin K ₂	11
1.3. Vitamin K ₃	12
1.4. Biologická dostupnost	14
1.5. Recyklace vitamínu K	15
1.5.1. Warfarin	17
1.6. Metabolismus vitamínu K	17
1.7. Konverze PK na MK	19
1.8. Obsah vitamínu K v potravinách	21
1.8.1. Sýry	21
1.8.2. Maso	22
1.8.3. Zelenina	22
1.8.4. Ovoce a ořechy	22
1.9. Nedostatek a nadbytek vitamínu K	23
2. <i>Vitamin K dependentní proteiny (VKDP)</i>	26
2.1. Osteokalcin	28
2.1.1. Funkce osteokalcinu v kostním metabolismu	29
2.1.2. Osteokalcin a glukózový metabolismus	30
2.1.3. Osteokalcin a testikulární funkce	30
2.1.4. Stanovení osteokalcinu	31
2.2. Matrix Gla protein (MGP)	32
2.2.1. Izoformy matrix Gla proteinu a jejich funkce	33
2.2.2. Funkce matrix Gla proteinu v kardiovaskulárním systému	34
2.2.3. Matrix Gla protein v kostním systému	35
2.2.4. Keutelův syndrom	36
2.2.5. Stanovení matrix Gla proteinu	36
2.3. Gla rich protein (GRP)	36
2.3.1. Funkce Gla rich proteinu v kostním systému	37
2.3.2. Funkce Gla rich proteinu v kardiovaskulárním systému	38
2.4. Specifický protein 6 zastavující růst (Gas6)	38
2.4.1. Význam Gas6 při sepsi	39
2.4.2. Funkce Gas6 v kardiovaskulárním systému	40
2.4.3. Funkce Gas6 při onemocnění ledvin	41
2.5. Periostin a periostinu podobný faktor	41
2.5.1. Periostin a periostinu podobný faktor v kostním systému	42
2.5.2. Periostin a periostinu podobný faktor v kardiovaskulárním systému	42
2.6. Vitamin K dependentní koagulační faktory a antikoagulační proteiny	43
2.6.1. Koagulační proteiny související pouze s krvácením	44
2.6.2. Koagulační proteiny související jak s krvácením, tak s trombózou	45
2.6.2.1. Faktor II (FII) a protein indukovaný nedostatečností vitamínu K (PIVKA-II)	45
2.6.2.2. Faktor VII (FVII)	46
2.6.2.3. Faktor IX (FIX)	47

2.6.3.	Koagulační proteiny související pouze s trombózou	47
2.6.4.	Koagulační proteiny pravděpodobně nesouvisející ani s krvácením ani s trombózou	47
2.7.	Prolin rich Gla protein a transmebránové Gla proteiny	48
2.8.	Transtyretin	48
3.	<i>Metody stanovení vitamínu K</i>	50
3.1.	Využití stanovení vitamínu K	52
3.1.1.	Cystická fibróza	52
3.1.2.	Osteoporóza	54
CÍLE PRÁCE		56
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		57
4.	<i>Materiál a přístroje</i>	57
4.1.	Přístroje	57
4.2.	Ostatní materiál	58
4.3.	Ostatní programy	58
4.4.	Reagencie pro HPLC	59
4.5.	Reagencie pro LC-MS/MS	59
4.6.	Sběr vzorků a soubor pacientů	60
5.	<i>Metody a příprava reagentů pro HPLC</i>	61
5.1.	Příprava mobilní fáze	61
5.2.	Příprava zásobních roztoků	61
5.3.	Příprava vzorků pro analýzu	62
5.4.	Chromatografická analýza vzorků	62
6.	<i>Metody a příprava reagentů pro LC-MS/MS</i>	63
6.1.	Příprava mobilní fáze	63
6.2.	Příprava zásobních roztoků	63
6.3.	Příprava vzorků pro analýzu	63
6.4.	Chromatografická analýza vzorků	64
VÝSLEDKY A DISKUZE		66
7.	<i>Metoda HPLC</i>	66
7.1.	Kalibrace	66
7.2.	Opakovatelnost měření	68
7.3.	Reprodukovatelnost měření	69
7.4.	Pravdivost měření (bias)	70
7.5.	Mez detekce	71
7.6.	Mez kvantifikace	72
7.7.	Výtěžnost metody	72
7.8.	Robustnost metody	73
7.9.	Shrnutí validace HPLC metody	75
8.	<i>Metoda LC-MS/MS</i>	75
8.1.	Kalibrace	76
8.2.	Opakovatelnost	78
8.3.	Reprodukovatelnost měření	79
8.4.	Pravdivost měření (bias)	80
8.5.	Mez detekce	80

8.6.	Mez kvantifikace	81
8.7.	Výtěžnost metody.....	81
8.8.	Robustnost metody	81
8.9.	Shrnutí validace LC-MS/MS metody.....	82
9.	<i>Přímé stanovení vitamínu K pomocí HPLC s FLD.....</i>	<i>83</i>
10.	<i>Přímé stanovení vitamínu K pomocí metody LC-MS/MS.....</i>	<i>88</i>
10.1.	Vitamin K u pacientů s osteoporózou	89
10.2.	Přímé a nepřímé stanovení vitamínu K u pacientů a dobrovolníků užívajících formu MK-7.....	95
10.2.1.	Hladiny vitamínů K u pacientů bez prokázané osteoporózy.....	95
10.2.2.	Užívání Femoralexu forte u zdravých dobrovolníků.....	96
10.2.3.	Užívání Femoralexu forte u pacientů s osteopénií	98
10.3.	Stanovení referenčních mezí tří forem vitamínu K.....	102
10.4.	Pacienti s CF	105
11.	<i>Porovnání stanovení vitamínu K pomocí metod HPLC a LC-MS/MS</i>	<i>112</i>
ZÁVĚR	116	
SOUHRN	120	
SUMMARY	121	
POUŽITÁ LITERATURA	122	
SEZNAM ZKRATEK	137	
SEZNAM OBRÁZKŮ	139	
SEZNAM TABULEK	140	
SEZNAM PUBLIKACÍ	141	
PŘÍLOHY	143	

ÚVOD

Vitamin K patří mezi poslední z vitaminů rozpustných v tucích, u kterého se rutinně neměří jeho koncentrace v biologickém materiálu. Ke zjištění jeho hladin v krevním systému se využívají nepřímé ukazatele jako je například protrombinový čas nebo některé vitamin K dependentní proteiny. Vitamin K se již dostává do podvědomí laické veřejnosti. Volně dostupné preparáty s přídatkem vitaminu K (zejména formy menachinon-7) se doporučují užívat jako prevence rizika kostních ztrát (osteopénie, osteoporóza). Přirozeně se vitamin K získává stravou ze zelené listové zeleniny, z fermentovaných potravin nebo ze živočišných produktů. V menší míře je vitamin K produkován střevními bakteriemi. V odborné literatuře lze nalézt různé fyziologické hladiny vitaminu K. Doporučené denní dávkování u dospělých se pohybuje mezi 70 – 120 µg vitaminu K, avšak tyto hodnoty nevypovídají nic o zastoupení jednotlivých forem vitaminu K. V České republice je dle vyhlášky č. 450/2004 Sb. a novely 330/2009 Sb. doporučené denní dávkování u dospělých bez ohledu na pohlaví 75 µg vitaminu K (Fajfrová, 2011; Vavrova et al., 2007; Zákon č. 450/2004 Sb., 2009).

Vzhledem k velké škále funkcí vitaminu K by bylo vhodné monitorovat jeho hladiny u onemocněních spojené s kostní remodelací, ale také u chorob postihující trávicí systém. U některých onemocněních, u kterých bývá zhoršená vstřebatelnost živin, dochází i ke zhoršení vstřebatelnosti vitaminů rozpustných v tucích (vitamin A, D, E a K). Mezi tyto choroby řadíme např. Crohnovu nemoc, ulcerózní kolitidu, cystickou fibrózu a jiné (Fila, 2017; Jakubec, 2006; Skalická, 2014). Vitamin K se již nepřímo monitoruje při poruchách krevního srážení. Avšak nepřímé testy hladin vitaminu K nereagují na změnu dostatečně rychle (Fusaro et al., 2017). Deficit vitaminu K byl pozorován i u epileptických záchvatů a mentálních retardací (Masterjohn, 2008). Nedostatek vitaminu K bývá spojován s vyšším rizikem rozvoje některých metabolických onemocněních jako je například diabetes mellitus (Beulens et al., 2010). V posledních letech se výzkum zabývá vlivem vitaminu K na některá onkologická onemocnění, kde byl prokázán pozitivní vliv na redukci nádorových buněk (Lamson, 2003).

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu na stanovení vitaminu K₁ a dvou forem vitaminu K₂ (menachinonu-4 a menachinonu-7) pomocí metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí s použitím izotopově značených standardů jednotlivých forem vitaminu K. Dalším cílem bylo stanovit referenční meze tří forem vitaminu K u stredo-evropské populace a porovnání těchto výsledků s výsledky

osteoporotických pacientů. Dalším cílem bylo stanovit hladiny vitamínu K a proteinu indukovaného nedostatečností vitamínu K u dětských pacientů s cystickou fibrózou. Poslední cílem bylo porovnat stanovení vitamínu K pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

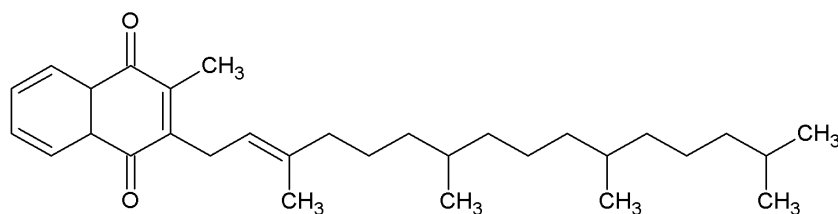
TEORETICKÁ ČÁST

1. Vitamin K

Vitamin K patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Vitamin K představuje rodinu sloučenin, které se vyznačují společným 2-metyl-1,4-naftochinonovým jádrem (menadion). Podle (ne)přítomnosti a rozdílnosti postranního řetězce lze rozlišit různé formy vitaminu K. Vitamin K má 2 přirozeně se vyskytující formy: vitamin K₁ a vitamin K₂. Ostatní formy vitaminů jako je vitamin K₃, vitamin K₄ a vitamin K₅ jsou synteticky vyrobené a využívají se jako příměs zvířecích krmiv a k inhibici růstu plísní (Kurosu a Begari, 2010).

1.1. Vitamin K₁

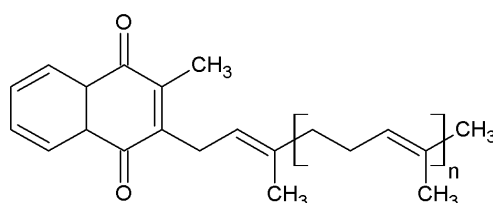
Vitamin K₁ se také nazývá fylochinon. Pro vitamin K₁ lze dohledat i další názvy např. fytonadion, fytomenadion, fylohydrochinon, konakion, aquamefyton. Vitamin K₁ je rostlinného původu. Rostliny nebo některé sinice jsou schopny tento vitamin syntetizovat. Ve své molekule kromě společného naftochinonového jádra obsahuje fytylový postranní řetězce (hexahydrotetraprenyl), který se také nachází v chlorofylu. Vitamin K₁ je žlutá olejovitá látka, kterou lze rozpustit v organických rozpouštědlech a nelze ji rozpustit ve vodě. Patří mezi hlavní složku přijatého vitaminu K potravou v západní stravě (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2017; Kurosu a Begari, 2010; National Library of Medicine, 2020; Shearer a Newman, 2014; World Health Organization, 2005). **Obrázek 1** ukazuje strukturní vzorec vitaminu K₁.



Obr. 1 Vitamin K₁

1.2. Vitamin K₂

Pod názvem vitamin K₂ se nachází skupina sloučenin s 2-metyl-1,4-naftochinonovým jádrem a s různě dlouhým isoprenoidním postranním řetězcem připojeným v pozici 3. Podle počtu izoprenových jednotek v postranním řetězci označujeme jednotlivé formy vitaminu K₂ zkratkou MK-n. Zkratka MK označuje, že se jedná o menachinon, a *n* vyjadřuje počet izoprenových jednotek, kde počet jednotek může být 1 – 15. Vitamin K₂ je žlutá krystalická látka. Její rozpustnost v organických rozpouštědlech je nižší než u vitaminu K₁. Ve vodě je vitamin K₂ nerozpustný. V přijaté potravě se nejvíce setkáváme s typy MK-4 až MK-9. Avšak pouze asi 10 – 25 % přijatého vitaminu K tvoří vitamin K₂. Z tohoto množství je nejvyšším podílem zastoupena forma MK-4 (zhruba 30 – 40 %). Vitamin K₂ je zejména živočišného původu (maso, vejce, sýry) nebo bakteriálního původu. Bakterie ve střevním traktu (např. *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Enterobacter*, *Eubacterium*, *Veillonella*) syntetizují zejména formy s delším postranním řetězcem jako jsou MK-10 a MK-11, ale také v menší míře MK-7, MK-8, MK-9 a MK-12. Různé typy menachinonů jsou syntetizovány různými typy bakterií, např. *Escherichia coli* produkuje zejména MK-8, zatímco *Mycobacterium tuberculosis* využívá MK-9 jako lipofilní nosič elektronů. Prozatím není jasné, jaké množství vitaminu K₂ jsou schopné bakterie v lidském střevě syntetizovat. Menachinonová rodina je evolučně nejstarším typem isoprenových chinonů a nejrozšířenějším typem bakteriálních respiračních chinonů. Stejně jako u vitaminu K₁ existují i pro MK-4 a MK-7 různé druhy názvů. MK-4 můžeme nalézt pod pojmy menatetrenon, vitamin K₂(sub20), kaytwo, keftorn-2. MK-7 se vyskytuje pod pojmy vitamin K₂(35), trans-menachinon 7. (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2017; National Library of Medicine, 2020; Shearer a Newman, 2014; Walther et al., 2013; World Health Organization, 2005). *Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.* znázorňuje strukturní vzorec vitaminu K₂. **Tabulka 1** ukaže přehled jednotlivých přírodních forem vitaminu K s jejich sumárním vzorcem, molekulovou hmotností a dalšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi včetně uvedení zdrojů.



Obr. 2 Vitamin K₂

(*n* – počet jednotek v postranním řetězci)

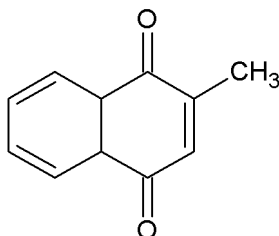
Tab. 1 Přehled vlastností vitamínu K₁, MK-4 a MK-7

Název	Vitamin K ₁	Vitamin K ₂	
		MK-4	MK-7
Strukturní vzorec	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	C ₃₁ H ₄₀ O ₂	C ₄₆ H ₆₄ O ₂
Molekulová hmotnost (g/mol)	450,7	444,6	649,0
IUPAC název	2-metyl-3-[(E,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-enyl]naftalen-1,4-dion	2-metyl-3-[(2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]naftalen-1,4-dion	2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E)-3,7,11,15,19,23,27-heptamethyloctacos-2,6,10,14,18,22,26-heptaenyl]-3-methylnaftalen-1,4-dion
Některé ostatní používané názvy	Fylochinon, fytonadion, fytomenadion, fylohydrochinon, konakion, aquamefyton	menatetrenon, vitamin K ₂ (sub20), kaytwo, keftorn-2	vitamin K ₂ (35), transmenachinon 7
Biologický poločas	1 – 1,5 hodiny	1 – 1,5 hodiny	cca 4 dny
Rozpustnost	Slabě rozpustný v metanolu, rozpustný v etanolu, acetonu, benzenu, hexanu, chloroformu a olejích, nerozpustný ve vodě	Méně rozpustný než vitamin K ₁ , nerozpustný ve vodě	Méně rozpustný než vitamin K ₁ , nerozpustný ve vodě
Forma	Žlutá olejovitá látka nebo žluté krystaly	Žluté krystaly	Žluté krystaly
Zdroj	Zelená listová zelenina	Sýry, živočišné produkty	Sýry, živočišné produkty, bakteriální produkce

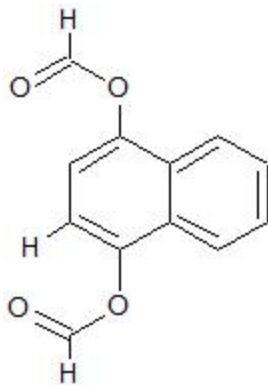
1.3. Vitamin K₃

Vitamin K₃ lze v literatuře nejčastěji nalézt pod pojmem menadion. Další názvy pro tuto formu vitamínu jsou např. menafton, tylochinon, kappaxin, kanon, prokayvit, aquinon,

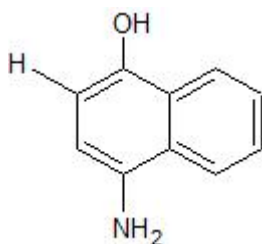
vitamin K₂(0). Jako jediný ze základních typů vitamínu K neobsahuje postranní řetězec. Vitamin K₃ je citronově žlutá krystalická látka rozpustná v organických rozpouštědlech. Navíc je také částečně rozpustný ve vodě. Vitamin K₃ je synteticky připravený. Další typy synteticky připravených vitamínů K jsou vitamin K₄ a vitamin K₅. Tyto synteticky připravené vitamíny jsou využívány jako složka zvířecích krmiv. U syntetických forem vitamínu K byla prokázána toxicita. Vitamin K₃ dokáže způsobit u lidí rozpad erytrocytů a byla u něj prokázána také hepatotoxicita (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2017; Halder et al., 2019; National Library of Medicine, 2020; Shearer a Newman, 2014; World Health Organization, 2005). **Obr. 3** ukazuje strukturní vzorec vitamínu K₃, **obrázek 4** strukturní vzorec vitamínu K₄ a **obrázek 5** strukturní vzorec vitamínu K₅.



Obr. 3 *Vitamin K₃*



Obr. 4 *Vitamin K₄*



Obr. 5 *Vitamin K₅*

V *tabulce 2* je uveden přehled jednotlivých syntetických forem vitamínu K s jejich sumárním vzorcem, molekulovou hmotností a dalšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi.

Tab. 2 Přehled vitamínu K

Název	Vitamin K ₃	Vitamin K ₄	Vitamin K ₅
Strukturní vzorec	C ₁₁ H ₈ O ₂	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	C ₁₁ H ₁₁ NO
Molekulová hmotnost (g/mol)	172,2	258,3	173,2
IUPAC název	2-metylnaftalen-1,4-dion	(4-acetyloxy-3-methylnaphthalen-1-yl) acetate	4-amino-2-methylnaphthalen-1-ol
Některé ostatní používané názvy	Menadione, menaphthone, thyloquinone, kappaxin, kayquinone, klottone, panosine, menaphthon, kanone, kipca, aquinone, kaergona, prokayvit, hemodal	Menadiol diacetate, acetomenaphthone, kapilin, kayvite, pafavit,	Kayvisyn, synkamin
Rozpustnost	Slabě rozpustné v etanolu, kyselině octové, rozpustné v etyl etéru, benzenu, chloroformu a vodě	nepopsáno	nepopsáno
Forma	Žluté krystaly s velmi slabým štiplavým zápachem	nepopsáno	nepopsáno

1.4. Biologická dostupnost

Při příjmu zeleniny bohaté na vitamin K₁ a potravin bohatých na vitamin K₂ bylo prokázáno, že postprandiální sérové koncentrace vitamínu K₂ zejména formy MK-7 jsou až desetkrát vyšší než sérové koncentrace vitamínu K₁. Navíc sérová koncentrace vitamínu K₁ na lačno vykazuje větší interindividuální variace. Menachinony s delším postranním řetězcem jako například MK-7 nebo MK-9 mají delší biologický poločas v cirkulaci v porovnání s vitamínem K₁, díky tomu jsou dostupné delší dobu v oběhu.

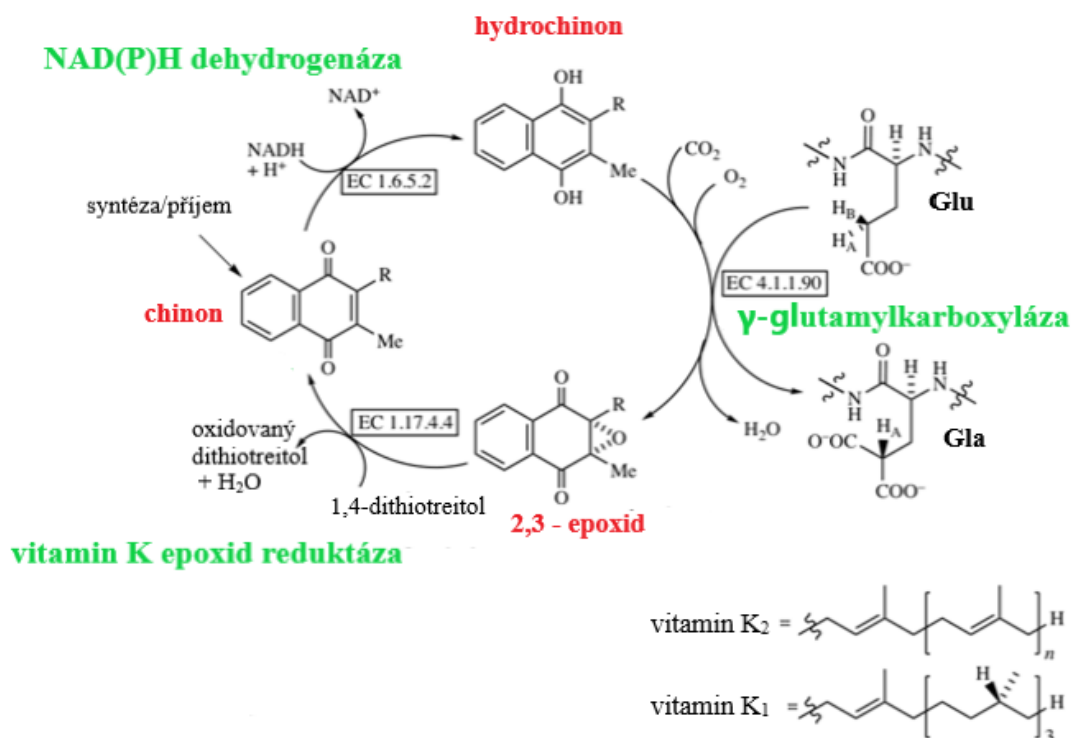
Biologická dostupnost se však mezi jednotlivými menachinony liší. Při podání 420 µg MK-4 v jedné dávce nebylo prokázáno zvýšení sérové hladiny této formy vitamínu K₂, zatímco při podání 420 µg MK-7 byly detekovány zvýšené sérové koncentrace po dobu několika dní. MK-9 je více lipofilní a má dlouhý biologický poločas, ale právě kvůli jeho vysoké lipofilitě je méně absorbován. Biologický poločas vitamínu K₁ a MK-4 je zhruba 1 - 1,5 hodiny. V případě menachinonů s delším postranním řetězcem se biologický poločas prodlužuje až na několik dní. MK-7 byl detekován i po 96 hodinách (Halder et al., 2019; Sato et al., 2012; Schurgers et al., 2007).

1.5. Recyklace vitamínu K

Vitamin K působí jako kofaktor posttranslační modifikace, který katalyzuje karboxylaci glutamových reziduí (Glu) na γ -karboxyglutamové rezidua (Gla). Tato reakce je katalyzována mikrozomálním enzymem γ -glutamylkarboxylázou, který je závislý na přítomnosti vitamínu K. Dále je pro reakci nutná účast CO₂ a molekulárního kyslíku. Pro karboxylaci je potřebná aktivní forma vitamínu K – vitamin K hydrochinon (redukovaná forma). Oxidace vitamin K hydrochinonu na vitamin K 2,3-epoxid probíhá za účasti vitamin K dependentní karboxylázy (γ -glutamylkarboxyláza, GGcX, EC 4.1.1.90). Současně s touto reakcí dochází ke karboxylaci Glu na Gla. Molekula CO₂ je zakorporována do Gla, zatímco jeden atom kyslíku není začleněn do substrátu, ale do vitamin K 2,3-epoxidu. Druhý atom kyslíku tvoří s vodíkem molekulu vody. Vitamin K 2,3-epoxid je zpět redukován na chinon a poté na hydrochinon za účasti vitamin K epoxidreduktázy (VKOR, EC 1.17.4.4). Aktivita epoxidreduktázy je závislá na přítomnosti dithiolu a na přítomnosti kumarinových antikoagancií (např. warfarin), která jsou schopná inhibovat její aktivitu. VKOR dokáže regenerovat hydrochinon redukcí vitamin K 2,3-epoxidu přes prostředníka chinon. Vitamin K přijatý z potravy může do tohoto cyklu vstupovat před NAD(P)-H dependentní vitamin K reduktázou (EC 1.6.5.2), která není inhibována kumariny. Karboxylace vitamin K dependentních proteinů (VKDP) je zásadní pro jejich správnou funkci. Vzniklé γ -karboxylové skupiny mají zásadní význam pro navázání koagulačních faktorů prostřednictvím vápenatých iontů na fosfolipidové povrchy, kde jsou vytvořeny podmínky pro vznik komplexů s proteolytickou aktivitou (Akbari a Rasouli-Ghahroudi, 2018; Gröber et al., 2014; Kessler, 2014; Liu et al., 2014; Stafford, 2005; Wallin, 2013; World Health Organization, 2005).

GGCX je membránový protein se 758 aminokyselinovými residui a 5 transmembránovými doménami. Obsahuje jednu disulfidickou vazbu mezi 99. a 450. reziduem. Aktivita GG CX byla objevena v roce 1975. N-konec proteinu zasahuje do cytoplazmy, zatímco C-konec se nachází v lumenu endoplazmatického retikula (Stafford, 2005).

Aktivita VKOR byla publikována již v roce 1970. Epoxidreduktáza je protein obsahující 163 aminokyselinových zbytků a je kodována 5kb DNA na chromozomu 16. Jako v případě GG CX je také VKOR membránový protein, který N-koncem zasahuje do lumenu endoplazmatického retikula, zatímco C-konec se nachází v cytoplazmě. VKOR obsahuje 3 transmembránové domény. VKOR je cílem pro účinek nejčastěji předepisovaných orálních antikoagulancií (např. warfarin). Polymorfismus mutací genu pro VKOR by měl být vyšetřen u pacientů na kumarinové léčbě, aby nedocházelo k závažným vedlejším účinkům tohoto léčiva. Prozatím není jasně znám mechanismus ani místo vazby warfarinu na VKOR (Stafford, 2005; Wu et al., 2018). **Obr. 6** znázorňuje celý recyklační cyklus vitamínu K.



Obr. 6 Cyklus vitamínu K

(přeloženo a upraveno z původního zdroje:

<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/reaction/misc/vitKcycle.html>)

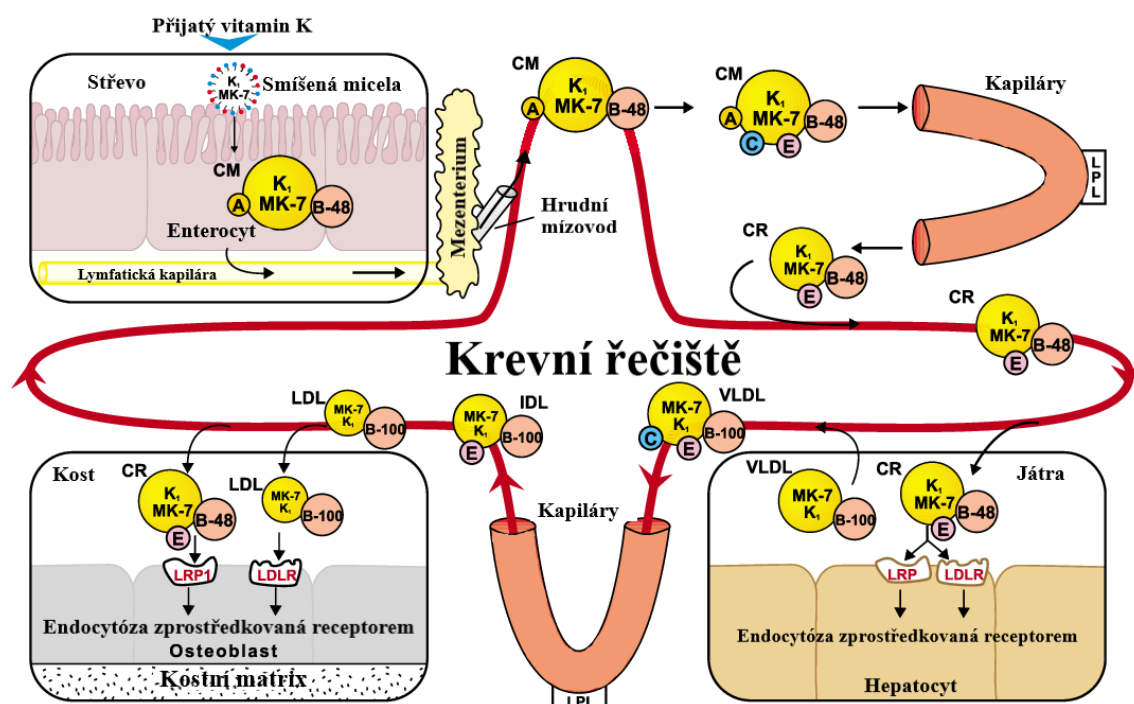
1.5.1. Warfarin

Warfarin je léčivo, které patří do skupiny kumarinů. Funguje jako antagonistu vitamínu K (VKA). Warfarin je hojně předepisované léčivo na prevenci vzniku trombotických stavů. Warfarin má biologický poločas okolo 36 – 42 hodin. Hlavní nevýhodou VKA je úzký terapeutický index a poměrně krátká doba, ve které je pacient v terapeutickém INR (mezinárodní normalizovaný poměr) rozmezí. Warfarin kromě inhibice koagulace indukuje také cévní kalcifikaci. U zvířecího experimentu prováděného na krysách byla prokázána kalcifikace v mnoha cévách a docházelo u nich také k rozvoji chronického onemocnění ledvin (CKD). Tento jev byl utlumen při podávání vysokých dávek vitamínu K. U krys s CKD byly naměřeny nižší koncentrace vitamínu K oproti krysám bez CKD. U krys s CKD byla pozorována snížená exprese genu pro VKOR a současně zvýšená exprese genu pro matrix Gla protein (MGP) v ledvinách a hrudní aortě. Exprese genu pro GGCX nevykazovala žádné rozdíly v těchto tkáních (Shea, 2019). Dnes jsou již na trhu dostupná antikoagulační léčiva, která se označují jako nová orální antikoagulancia (NOAC) nebo také non-vitamin K antagoničtí orální antikoagulancia. Tato léčiva jsou přímými inhibitory koagulačních faktorů trombinu nebo aktivovaného koagulačního faktoru X. Tento typ léčiva se vyznačuje zjednodušením léčby pro pacienty, kdy není potřebná tak velká monitorace stavu jako v případě léčby warfarinem. Avšak NOAC mají stále ještě svá úskalí, kdy po zavedení do klinické praxe byl pozorován vyšší výskyt krvácivých stavů do zažívacího traktu v kontrastu při používání warfarinu. Použití NOAC je nevhodné u pacientů s umělou srdeční chlopní (Altiok a Marx, 2018; Hluší et al., 2015; Kessler, 2012).

1.6. Metabolismus vitamínu K

Přírodní formy vitamínu K, fylochinon a menachinon, mají extrémně lipofilní povahu, a proto ke svému transportu v krevním řečišti nemohou využívat proteiny jako v případě ostatních vitaminů rozpustných v tucích. Transport vitamínu K je závislý na lipoproteinech. Vitamin K₁ patří mezi hlavní složku přijímaného vitamínu K. Přijatý vitamin K nejprve prochází solubilizací do micel a poté dochází k jeho absorpci v proximální části tenkého střeva. Bylo prokázáno, že efektivita absorpce vitamínu K₁ z listové zeleniny je nižší než 10 %. Ve střevní sliznici je vitamin K₁ začleněn do chylomikronů a je sekretován do lymfy, odkud vstupuje do krve přes kapiláry.

K nárůstu koncentrace vitamínu K_1 v krevním oběhu dochází mezi třetí a šestou hodinou po konzumaci jídla bohatého na tento vitamin. U zdravých jedinců lačnicích přes noc byla stanovována koncentrace vitamínu K vzhledem k různým typům lipoproteinů. Největší podíl na přenosu vitamínu K má velmi nízkodenzitní lipoprotein (VLDL), který transportuje více jak 50 % vitamínu K. O zbylou část vitamínu K se stejným dílem dělí nízkodenzitní (LDL) a vysokodenzitní (HDL) lipoprotein. Transport menachinonů je obdobný vitamínu K_1 (Kohlmeier et al., 1996; Shearer a Newman, 2008; World Health Organization, 2005). **Obrázek 7** znázorňuje metabolismus vitamínu K.



Obr. 7 Metabolismu vitamínu K

Přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Shearer a Newman, 2008)

(CM – chylomikrony, CR – chylomikronové zbytky, LDL – nízkodenzitní lipoprotein, VLDL – velmi nízkodenzitní lipoprotein, IDL – lipoprotein o střední denzitě, LPL – lipoproteinová lipáza, LRP – protein podobný LDL receptoru, LRP-1 – protein 1 související s LDL receptorem, LDLR – receptor pro LDL, A – apolipoprotein A, B-48 – apolipoprotein B-48, C – apolipoprotein C, E – apolipoprotein E, B-100 – apolipoprotein B-100)

Největším úložištěm vitamínu K v organismu jsou játra, která jsou současně i místem pro syntézu vitamín K dependentních koagulačních faktorů. Zastoupení různých forem vitamínu K v játrech je rozdílné oproti plazmě. V játrech zabírá vitamín K_1 10 % a zbylý podíl zabírá vitamín K_2 . Jednotlivé zastoupení menachinonů v játrech se

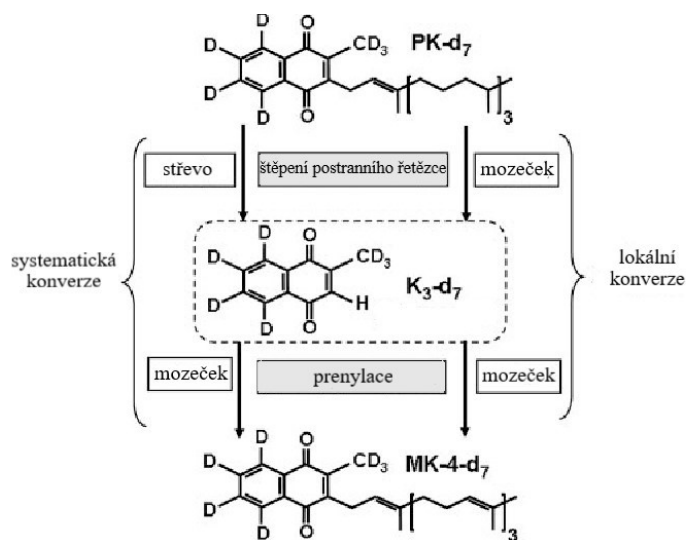
mezi jedinci liší a také částečně reflektuje jejich střevní mikroflóru, jelikož se zde vyskytují typy vitamínu K₂, které se v běžné stravě objevují zřídka (např. MK-10 a MK-11 syntetizované rodem *Bacteroides*). Vitamin K se samozřejmě vyskytuje i v jiných tkáních. Vyšší koncentrace vitamínu K₁ byly dále zaznamenány v pankreatu, srdci, mozku, ledvinách a plicích. V ledvinách, mozku a slinivce byla zaznamenána přítomnost MK-4. Přítomnost pouze jednoho typu menachinonu naznačuje, že by se mohlo jednat o jeho konverzi z vitamínu K₁. V kosti jak trabekulární, tak kortikální byla detekována koncentrace vitamínu K₁ a menachinonů s kratším postranním řetězcem. Zásoba vitamínu K₁ je velmi nízká u novorozenců, a proto je nutné u této skupiny jedinců provádět profylaxi k odvrácení rizika krvácivých stavů, pokud je novorozenec kojen. Umělá strava novorozenců je již fortifikována. Také z důvodu nedostatečné syntézy menachinonů ve střevě jsou hladiny vitamínu K₂ většinou nedetekovatelné (World Health Organization, 2005).

Játra nehrají důležitou roli pouze ve skladování vitamínu K a syntéze VKDP, ale jsou také důležité v eliminaci vitamínu K. Při podání značeného vitamínu K₁ byla prokázána exkrece tohoto vitamínu močí okolo 20 % v průběhu tří dní. Zhruba 35 – 50 % bylo vyloučeno jako metabolity žluči ve stolici. Rychlé vyčerpání zásob vitamínu K₁ naznačuje, že organismus kontinuálně tyto zásoby doplňuje. K exkreci vitamínu K močí dochází díky oxidativní degradaci fytylového postranního řetězce. Nejspíše je využíváno stejných enzymů jako při ω -oxidaci a β -oxidaci mastných kyselin. Karboxylové kyseliny s pěti nebo sedmi uhlíkatými postranními řetězci byly identifikovány jako dva hlavní metabolity katabolismu vitamínu K. Metabolity vylučované žlučí nebyly prozatím jasně identifikovány. Jedná se o molekuly, které jsou zprvu rozpustné ve vodě a stávají se rozpustnými v tucích z důvodu jejich průchodu přes střevo (World Health Organization, 2005).

1.7. Konverze PK na MK

Konverze vitamínu K₁ na MK-4 vyskytující se u ptáků byla popsána již v 60. letech. Prozatím princip této konverze však není zcela jasný. Byly popsány dva teoretické postupy konverze. U prvního by měl být odštěpen postranní řetězec fylochinonu a vznikla by toxická forma vitamínu K – menadion (vitamin K₃). Ta by byla částečně detoxifikována játry či trávicí soustavou a byla by vyloučena močí z organismu. A částečně by k ní byly připojeny izoprenové jednotky, čímž by vznikla forma MK-4.

Druhý princip bere v úvahu denuraci fytylového postranního řetězce fylochinonu a následnou posttranslační modifikaci (prenylaci = připojení geranylgeranylu (isoprenoid) k C-terminálnímu cysteinu cílového proteinu) MK-4. V obou teoriích se vyskytují značné nejasnosti např. ve vyřešení transportu vitamínu K₃ krví nebo v rychlosti připojení izoprenových jednotek. Bylo zjištěno, že přeměna vitamínu K₁ na MK-4 probíhá rozdílně mezidruhově (např. krysy konvertují vitamín K₁ méně než holubi) (Masterjohn, 2008; Okano et al., 2008). Z dostupné literatury vyplývá, že s největší pravděpodobností jsou i lidé schopni konverze vitamínu K, kde bylo měřením prokázáno, že při příjmu vitamínu MK-7 se zvyšuje v krvi současně i koncentrace MK-4 (Sato et al., 2012). Avšak některé publikace ukázaly (Gröber et al., 2014; Sato et al., 2012; Walther et al., 2013), že vyšší příjem vitamínu K₁ ve stravě zvýší koncentraci vitamínu K₂ v mateřském mléce, nikoliv v krvi. Vyšší formy vitamínu K₂ jako MK-9 či MK-10 ve stravě nalézáme vzácně. Vitamín K₃ se přirozeně nevyskytuje a je pouze syntetický. Pokud je vitamín K₃ podán, dochází u něj *in vivo* k alkylnaci na některou formu vitamínu K₂. Vitamín K₃ je oproti vitamínům K₁ a K₂ rozpustný i ve vodě (160 mg/l), a proto ho lze vstřebat i v nepřítomnosti žlučových kyselin (Masterjohn, 2008). Na **obrázku 8** jsou znázorněny 2 možné způsoby konverze vitamínu K₁ na vitamín K₂.



Obr. 8 Konverze vitamínu K₁ na vitamín K₂

Přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Okano et al., 2008)

1.8. Obsah vitamínu K v potravinách

Jak již bylo výše uvedeno, nejvyšší hladiny vitamínu K₁ lze nalézt u zelené zeleniny a v rostlinných olejích. Je to hlavní forma vitamínu K přijatého stravou. Zatímco vitamín K₂ lze v nejvyšších hladinách detekovat v mase, sýrech, vejcích a mléčných výrobcích. Bohatým zdrojem MK-4 jsou játra. Dnes je japonská potravina zvaná „natto“ známá pro svůj vysoký podíl MK-7, a to v koncentraci 9965 ng/g produktu, dále obsahuje i ve vyšší míře MK-8 (824 ng/g produktu) a MK-6 (124 ng/g produktu) (Vermeer et al., 2018).

1.8.1. Sýry

U sýrů byly stanovovány hladiny vitamínu K₁ a vitamínu K₂ (formy: MK-4 až MK-10) pomocí chromatografické metody s fluorescenční detekcí. V sýru typu Gouda je v největším množství zastoupen MK-9, kdy nejvyšší stanovená hladina této formy vitamínu (424 ng/g sýru) byla u 13týdenní goudy. Dietnější sýr Milner obsahoval, jako v předešlém případě, největší zastoupení formy MK-9. Nejvyšší stanovená hladina MK-9 (306 ng/g sýru) byla u 13týdenního typu. U nízkotučného sýra Slankie dosahovala nejvyšší hladina MK-9 233 ng/g sýru v 26týdenním typu. Hladiny MK-5 a MK-6 byly u všech výše uvedených typů srovnatelné a dosahovaly nejvyšších hladin 4,9 ng/g sýru pro obě formy. Hladiny K₁, MK-4, MK-7 a MK-8 dosahovaly nejvyšších hladin u sýru Gouda, a to v koncentracích 39,6 ng/g sýru (K₁), 208 ng/g sýru (MK-4), 17,3 ng/g sýru (MK-7) a 96,8 ng/g sýru (MK-8). U žádného výše uvedeného sýru nebyla detekována hladina MK-10. Vysoká koncentrace MK-10 byla detekována u švýcarského sýru Ementál v hodnotě 322 ng/g sýru. Forma MK-10 pochází z produkce bakterie *Propionibacterium freudenreichii*, která je zodpovědná za tvorbu bublin v sýru a v důsledku tohoto jevu vznikají tzv. sýrová oka. Nejvyšší hladina MK-7 (83,7 ng/g sýru) byla detekována u francouzského sýru Münster. Další francouzský sýr Camembert se vyznačuje vysokou hladinou MK-8 (151 ng/g sýru) a MK-9 (395 ng/g sýru). Pokud by se sečetly všechny formy vitamínu K₂, nejvyšší hladina celkového vitamínu K₂ (729 ng/g sýru) je zastoupena v sýru Gouda (Vermeer et al., 2018).

1.8.2. Maso

V mase nejčastěji nalézáme formu MK-4 kromě jater, kde lze detekovat i formy MK-6 až MK-10. Množství vitamínu K obsažené v mase závisí na původu masa. Bylo prokázáno, že nejvyšší koncentrace MK-4 byla detekována v kuřecím mase z Japonska, zatímco koncentrace tohoto vitamínu v kuřecím mase z USA nebo z Holandska dosahovala nižších hodnot (Halder et al., 2019). Největší množství MK-4 lze nalézt u úhoře (631 ng/g masa), dále v kuřecím mase (101 ng/g masa) a v mletém mase (76,1 ng/g masa). Oblíbený losos obsahuje MK-4 v koncentraci pouze 6 ng/g masa (Vermeer et al., 2018).

1.8.3. Zelenina

V zelenině se nalézají zejména vitamín K₁. Znamé kysané zelí obsahuje vitamín K₁ v množství 224 ng/g zelí, ale obsahuje také i vitamín K₂ (55 ng/g zelí). Větší množství vitamínu K₁ je obsaženo například v kapustě (7060 ng/g kapusty), vodnici (5680 ng/g vodnice), brokolici (1467 ng/g brokolice) a špenátu (967 ng/g špenátu) (Halder et al., 2019). V rostlinných olejích je průměrná koncentrace vitamínu K₁ 425 ng/g oleje (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2017).

1.8.4. Ovoce a ořechy

V některých druzích ovoce a ořechů byla prokázána přítomnost vitamínu K₁. V sušených švestkách lze detekovat vitamín K₁ v množství okolo 600 ng/g ovoce, nebo například v kiwi, kde je vitamín K₁ obsažen v množství 421 ng/g ovoce. Lesní bobuloviny jako borůvky či ostružiny obsahují vitamín K₁ v množství okolo 210 ng/g ovoce. Nejvíce bohaté na vitamín K₁ jsou piniové ořechy (536 ng/g ořechů) a kešu ořechy (419 ng/g ořechů). Bylo prokázáno, že vitamín K₁ přijatý z ovoce a ořechů neinterferuje s warfarinovou léčbou (Dismore et al., 2003; Halder et al., 2019).

1.9. Nedostatek a nadbytek vitamínu K

Nedostatek vitamínu K může být způsobený nedostatečným příjmem nebo narušením střevní mikroflóry. Pacienti s antikoagulační léčbou nebo s některými autoimunitními chorobami (např. celiakií) mohou být ohroženi nedostatkem vitamínu K. Toxicita vysokých dávek vitamínu K byla popsána pouze u injekčního podání vitamínu K₃, kdy docházelo k poškození hepatocytů, anémii s ikterem a alergickým reakcím. U vysokých experimentálních dávek přírodního vitamínu K nebyl pozorován toxický účinek, a proto není určena maximální bezpečná dávka. Avšak při nadměrném příjmu kysaného zelí bylo popsáno předávkování vitamínem K, které se projevovalo nechutenstvím a bolestí hlavy (Bayer, 2008; Erdman et al., 2012; Mason, 2007; Rasmussen et al., 2006). Proteinům, které souvisí s vitamínem K se věnuji v *kapitole 2 - Vitamin K dependentní proteiny*. Vitamin K má mnoho funkcí.

Vitamin K a koagulace

Vitamin K je znám zejména díky své funkci v krevní koagulaci. V plazmatickém koagulačním systému existují čtyři vitamin K dependentní faktory: faktor II, faktor VII, faktor IX a faktor X. Při nedostatku vitamínu K v organismu může docházet k poruchám koagulace. Tyto poruchy koagulace mohou vyvolat krvácení. Vitamin K se účastní nejen hemokoagulace, ale také i fibrinolýzy (inhibice koagulace), kde působí další z vitamin K dependentních proteinů – protein C, protein S a protein Z. Deficit fibrinolytických proteinů je také asociován s nedostatkem vitamínu K (Pecka, 2004).

Krvácení u novorozenců v důsledku nedostatku vitamínu K

Krvácení v důsledku nedostatku vitamínu K (VKDB; z angl. *vitamin K deficiency bleeding*) postihuje zejména novorozence kvůli jejich nízkým zásobám vitamínu K a nedostatku vitamínu K v mateřském mléce. Rodiče odmítající injekční podání by měli být poučeni o nižší efektivitě perorálního podání a o riziku VKDB. Kancerogenita intramuskulární profylaxe u novorozenců publikovaná ve dvou studiích nebyla dalšími studiemi potvrzena (Hanzl, 2011; Ng a Loewy, 2018).

V České republice probíhá profylaxe v dávce 1,0 mg intramuskulárně mezi 2. a 6. hodinou po porodu. Tento způsob dávky již není nutno opakovat. Druhým způsobem profylaxe je podání 2,0 mg vitamínu K₁ perorálně ve stejném časovém intervalu jako v případě intramuskulárního podání. Zde je nutné perorálně dávku 1,0 mg jedenkrát týdně

opakovat do stáří 10 - 12 týdnů. V případě nedonošených novorozenců narozených před 32. týdnem gestačního věku se doporučuje intravenózní dávka vitamínu K 0,2 mg/kg podávaná jednou týdně, poté po dosažení plné enterální výživy lze přejít na perorální podání v dávce 0,5 – 1,0 mg jedenkrát týdně do stáří 12 týdnů. Nebo lze zvolit dávku 0,3 mg/kg podávanou intramuskulárně, kterou již není třeba opakovat. U předčasně narozených novorozenců po 32. týdnu gestačního věku lze vitamín K podat v dávce 0,3 mg intravenózně týdně a při dosažení plné enterální výživy lze přejít na perorální podání v dávce 1,0 mg týdně do 12. týdne věku. Lze zvolit dávku 0,5 mg podanou intramuskulárně, kterou není potřeba opakovat (Hanzl, 2011).

Kostní metabolismus a kalciový paradox

U vitamínu K byl pozorován pozitivní účinek na kostní hmotu, kde působí na osteokalcin v průběhu jeho karboxylace a dále působí na zvýšení osteoblastické aktivity. Vitamin K při kostní novotvorbě dokáže inhibovat osteoklasty. Hlavní formou, která působí na osteokalcin, je vitamín K₂ zejména forma MK-7. Bylo prokázáno, že pravidelné užívání MK-7 vede ke snížení rizika rozvoje osteoporózy. Prozatím v žádné publikaci nebyla jasně stanovena doporučená denní dávkování pro jednotlivé formy vitamínu K (Masterjohn, 2008). Dostatečně karboxylovaný osteokalcin lépe váže vápenaté ionty do kostní hmoty. V desetileté studii, které se účastnilo 72 327 žen ve věku 38 – 63 let, bylo prokázáno snížení rizika zlomenin kyčle až o 30 % při pravidelném užívání vitamínu K, avšak autoři přesně nespecifikovali o jakou formu vitamínu K se jedná (Gröber et al., 2014).

S karboxylací matrix Gla proteinu souvisí kalcifikace cévní stěny. Při nedostatečné karboxylaci MGP dochází k tzv. „kalciovému paradoxu“, kdy se nadměrně ukládají vápenaté ionty do cévní stěny na úkor kostní hmoty. V důsledku tohoto paradoxu jsou ohroženy dva systémy: cévní systém s rizikem rozvoje aterosklerózy a kostra s rizikem rozvoje osteoporózy (Gheorghe a Crăciun, 2016; Masterjohn, 2008). V Rotterdamské studii byl posuzován vliv vitamínu K₁ a vitamínu K₂ na rozvoj kardiovaskulárního onemocnění. V této studii bylo prokázáno, že příjem více než 250 µg vitamínu K₁ za den nemá žádný pozitivní vliv na kardiovaskulární systém, zatímco příjem 25 µg vitamínu K₂ (směs forem MK-4 až MK-10) za den redukuje riziko kardiovaskulárního onemocnění až o 57 % (Geleijnse et al., 2004).

Nervový systém

Vitamin K₂ dokáže v mozku podporovat enzymy produkující sulfatidy. Sulfatidy s věkem postupně klesají a dochází k rozvoji stařecké neurologické degenerace. Na zvířecím modelu, kde byl vyřazen gen pro tvorbu sulfatidů nebo cerebrosidů, byla prokázána růstová retardace, ztráta fyzické aktivity a výskyt epileptických záchvatů. Mozek si i přes nízký příjem vitamínu K dokáže udržovat relativně vysokou hladinu vitamínu K₂ (Masterjohn, 2008) .

Vitamin K a diabetes mellitus

Nedostatek vitamínu K bývá asociován s rizikem rozvoje diabetu mellitu. Na myším modelu bylo prokázáno, že vitamin K dokáže redukovat sníženou rezistenci inzulinu, který se vyskytuje hlavně u diabetiků druhého typu. Vliv vitamínu K na citlivost k inzulinu byl pozorován jak u vitamínu K₁, tak u vitamínu K₂. Nedostatek vitamínu K u zvířat také zpožďoval inzulinovou odpověď (Beulens et al., 2010).

Vitamin K a infekční onemocnění

Vysoké dávky vitamínu K₂ formy MK-4 jsou spojovány se sníženými hladinami proinfekčních markerů. Vitamin K₂ a zejména jeho analoga (menadion, 1,4-naftochinon, koenzymy Q1 až Q3, koenzym Q10) mají také vliv na růst bakteriálních patogenů. Při jednodenním testu byla prokázána inhibice bakteriálního růstu různých Gram pozitivních bakterií např. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus agalactiae* vlivem přítomnosti analogů vitamínu K. Některé typy bakterií dokáží produkovat enterotoxiny a také bývají častou příčinou toxického šoku.

Menachinon je součástí elektronového transportního řetězce u *Staphylococcus aureus* a *Bacillus anthracis* . Menadion je teoretickým prekurzorem pro menachinon, a proto je zajímavé, že právě tato molekula má antimikrobiální efekt na tyto dvě bakterie (Ferland, 2012; Kurosu a Begari, 2010; Schlievert et al., 2013).

Vitamin K a onkologická onemocnění

Nejsilnější antikancerózní účinek vykazuje vitamin K₃, avšak jeho nežádoucí účinky omezují jeho používání. Podávání vitamínu K₃ ve velmi malých dávkách v kombinaci

s vysokými dávkami vitamínu C přineslo při testování na zvířecím modelu velmi uspokojivé výsledky. Proto byla tato kombinace vitaminů aplikována vybraným pacientům s karcinomem prostaty. Prozatím se tato kombinace vitamínu K₃ a C jeví jako účinná při použití dalších antikancerogenních antioxidantů (Lamson, 2003; Lamson et al., 2010).

Antikancerózní účinek byl popsán i u ostatních forem vitamínu K. Vitamin K₂ vykazoval antikancerózní efekt na některé buněčné linie u karcinomu ovarií. Dále vitamin K₂ dokáže zefektivnit účinky chemoterapeutické léčby. Bylo prokázáno, že pravidelný příjem vitamínu K₂ snižuje riziko výskytu nádorových onemocnění (Nakaya et al., 2012; Nimptsch et al., 2010).

2. Vitamin K dependentní proteiny (VKDP)

V současné době je známo 17 vitamin K dependentních proteinů. Do této skupiny patří některé koagulační faktory (faktor II, faktor VII, faktor IX a faktor X), antikoagulační proteiny (protein C, protein S a protein Z), osteokalcin, matrix Gla protein, specifický protein 6 zastavující růst (Gas6), Gla-rich protein (GRP), periostin, periostinu podobný faktor (PLF), prolin rich Gla protein (PRGP) 1 a 2, transmembránové Gla proteiny (TMGP) 3 a 4 (Wen et al., 2018). V *příloze 1* jsou uvedeny sekvence aminokyselin VKDP s vyznačenými místy pro γ -glutamylkarboxylaci.

Funkce některých z těchto proteinů nejsou zcela jasné, jako například v případě PRGP a TMGP. Vyšší zájem o studování funkcí VKDP vychází zejména z toho, že jsou tyto proteiny důležité v prevenci některých závažných onemocněních např. osteoporózy či kardiovaskulárních chorob (Wen et al., 2018).

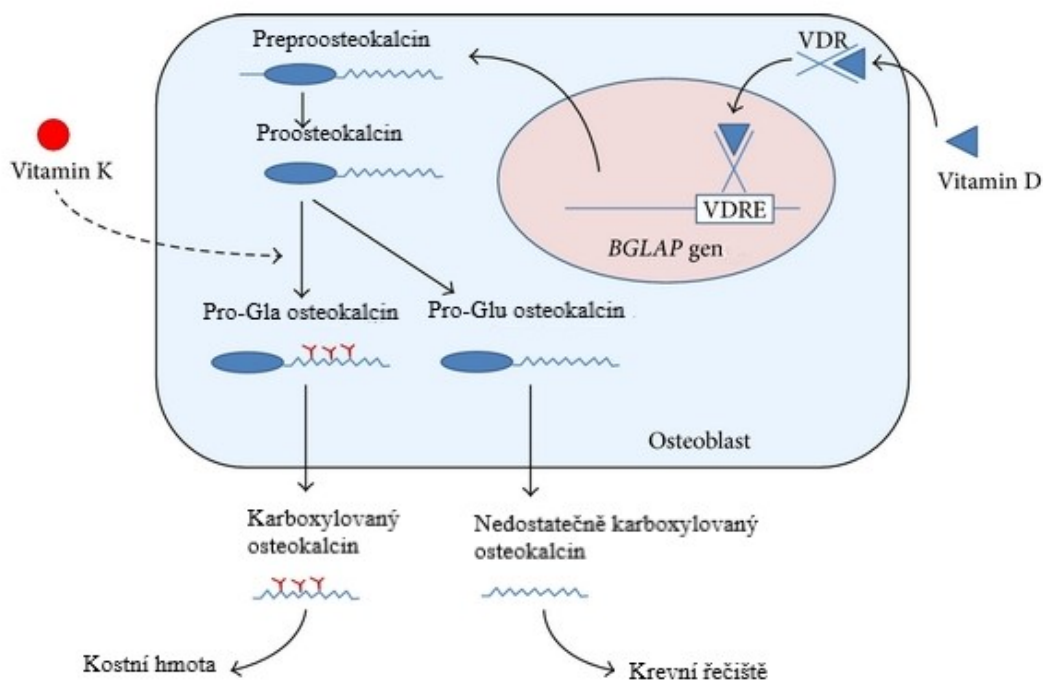
Tabulka 3 ukazuje přehled jednotlivých VKDP s uvedenými místy posttranslační γ -glutamylkarboxylace.

Tab. 3 Přehled vitamin K dependentních proteinů

Název VKDP	Počet aminokys. reziduí	Molekulová hmotnost (kDa)	Izoel. bod = pI	Lokalizace genu	Místo karboxylace
Osteokalcin	49	58,0	6,56	1q22	17, 21, 24
MGP	84	10,6	9,71	12p12.3	2, 37, 41, 48, 52
GRP	74	16,6	5,47	10p13	<i>neznámo</i>
Gas6	691	75,0	5,84	13q34	Gla doména 23 – 64
Periostin	815	93,0	7,27	13q13.3	<i>neznámo</i>
PLF	810	90,0	<i>neznámo</i>	<i>neznámo</i>	<i>neznámo</i>
Faktor II	579	72,0	5,64	11p11.2	6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32
Faktor VII	406	50,0	6,92	13q34	6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 35
Faktor IX	415	55,0	5,34	Xq27.1	7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36, 40
Faktor X	448	54,7	5,68	13q34	6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32, 39
Protein C	419	62,0	5,85	2q14.3	6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29
Protein S	635	69,0	5,48	3q11.1	6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32, 36
Protein Z	360	62,0	5,64	13q34	7, 8, 11, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 35, 40
PRGP1	198	23,0	5,13	Xp21.1	Gla doména 1 – 46
PRGP2	153	17,0	5,22	19q13.33	Gla doména 1 – 47
TMGP3	212	23,7	5,75	Xq28	3, 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32, 35, 39
TMGP4	177	19,9	7,08	11p13	9, 17, 19, 22, 23, 28, 29, 32, 37
Transtyretin	127	15,9	5,52	18q12.1	42

2.1. Osteokalcin

V literatuře se osteokalcin (OC) vyskytuje také pod názvem kostní Gla protein. Osteokalcin byl poprvé izolován z hovězích a kuřecích kostí v roce 1976 doktorem Pricem a jeho skupinou. Jako druhý byl z kosti izolován matrix Gla protein stejnou skupinou vědců v roce 1987. Maturovaný (funkční) lidský OC se skládá ze 49 aminokyselinových reziduí. Syntéza a sekrece probíhá v největší míře v osteoblastech, v menší míře v odontoblastech a buňkách hypertrofické chrupavky (Hall, 1991; Wen et al., 2018). Gen kódující lidský osteokalcin (BGLAP) se nachází na prvním chromozomu krátkého raménka v pozici 25-31. Je kódován 11 kD s 98 aminokyselinovými rezidui. Osteokalcin je po transkripci, která je stimulována $1\alpha,25$ -dihydroxyvitaminem D ($1,25$ -(OH) $_2$ vitamin D), syntetizován ve formě preproproteinu složeného ze signálního proteinu, obsahujícího 23 reziduí, propeptidu, obsahujícího 26 reziduí, a maturovaného proteinu, obsahujícího 49 reziduí. Preproosteokalcin je proteolyzován na propeptid s 23 aminokyselinovými rezidui a na proosteokalcin (pro-OC) se 75 aminokyselinovými rezidui. V endoplazmatickém retikulu nejdříve dochází k vytvoření disulfidických vazeb mezi cysteiny v pozicích 23 a 29. U myšího modelu bylo pozorováno, že furin slouží jako endopeptidáza zodpovědná za zpracování proproteinu v osteoblastech. Propeptid je rozpoznávacím signálem pro γ -glutamylkarboxylázu, která slouží ke karboxylaci glutamových reziduí v pozicích 17, 21 a 24. Podle stupně karboxylace může být pro-OC rozdělen do dvou skupin. Prvním typem je nedostatečně karboxylovaný pro-OC a následně z něj nedostatečně karboxylovaný osteokalcin (ucOC), který má nižší afinitu k hydroxyapatitu než dostatečně karboxylovaný osteokalcin (cOC) a je snadněji uvolňován do krevního oběhu. Nedostatečně karboxylovaná forma OC je aktivní hormonální formou OC. Druhým typem je maturovaný, karboxylovaný osteokalcin, který je schopen vázat vápenaté ionty a vyznačuje se vysokou aktivitou k hydroxyapatitu. Maturovaný OC je inkorporován do vezikul a sekretován do kostní matrix, kde zajišťuje její správnou mineralizaci (Shao et al., 2015; Zoch et al., 2016). **Obrázek 9** ukazuje, jak vzniká karboxylovaný a nedostatečně karboxylovaný osteokalcin.



Obr. 9 Vznik osteokalcinu

přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Patti et al., 2013)

(VDR – receptor vitaminu D, VDRE – částice na rozpoznání receptoru vitaminu D, BGLAP – gen kódující lidský osteokalcin)

2.1.1. Funkce osteokalcinu v kostním metabolismu

Nedostatečně karboxylovaný osteokalcin není schopen v plné míře vázat vápenaté ionty a hydroxyapatit (Palermo et al., 2017). Po karboxylaci je osteokalcin zabudován zejména do kostní matrix a pouze okolo 20 % OC je sekretováno do krevního oběhu. Některé studie uvádějí, že sérová hladina nedostatečně karboxylovaného osteokalcinu (ucOC) může sloužit jako biomarker pro osteoartritu (Naito, 2012; Wen et al., 2018). Publikace autorů Misra et al. (Misra et al., 2013) prokázala vyšší riziko rozvoje kolenní osteoartrity a defektů chrupavky u pacientů se subklinickým deficitem vitaminu K než u pacientů s adekvátní příjmem tohoto vitaminu. Některé objevené funkce OC vzešly z myšního modelu. Ovšem osteokalcin u myši se liší od lidského OC. Lidský OC je kódován pouze jedním genem, zatímco myšící osteokalcin je kódován pomocí třech genů. Gen pro osteokalcin je také regulován hladinami 1,25-(OH)₂ vitaminu D₃, kdy u lidí dochází ke zvýšení odpovědi a naopak u myši dochází k jejímu snížení (Wen et al., 2018).

2.1.2. Osteokalcin a glukózový metabolismus

Funkce osteokalcinu v glukózovém metabolismu byla objevena při pozorování následků deficitu tohoto proteinu u myši, které měly vyřazený gen pro OC (z angl. „*osteocalcin knockout*“). U myši s vyřazeným genem pro OC byla pozorována obezita s abnormální akumulací viscerálního tuku. Dále byl prokázán výskyt hyperglykémie a porušené glukózové tolerance v důsledku inzulínové nedostatečnosti a rezistence. Za sníženou proliferaci pankreatických β -buněk Langerhansových ostrůvků, sníženou sekreci inzulínu a zvýšenou inzulínovou rezistenci je zodpovědná redukováná exprese adiponektinu. Adiponektin patří mezi proteinové hormony, které se podílejí na mnoha metabolických procesech, jako je glukózová regulace a oxidace mastných kyselin (Kanazawa, 2015; Shao et al., 2015). Dalším významným rozdílem je vliv $1,25\text{-(OH)}_2$ vitamínu D_3 na OC – u lidí dochází pod vlivem $1,25\text{-(OH)}_2$ vitamínu D_3 ke zvýšení odpovědi u genu pro OC, zatímco u myši je opačný efekt a dochází ke snížení odpovědi genu pro OC na tento $1,25\text{-(OH)}_2$ vitamin D_3 (Wen et al., 2018). Přes tyto rozdíly byly pozorovány u lidí obdobné výsledky jako u myši. Bylo prokázáno, že hladina celkového OC nepřímo korelovala s koncentrací glukózy v plazmě a množstvím tukové hmoty u starší nediatetické populace. Dále byla pozorována asociace mezi celkovým osteokalcinem a citlivostí na inzulín u obdobné populace. Sérový celkový osteokalcin také nepřímo asociuje s viscerálním tukem a pozitivně se sérovou koncentrací adiponektinu (Kanazawa, 2015).

2.1.3. Osteokalcin a testikulární funkce

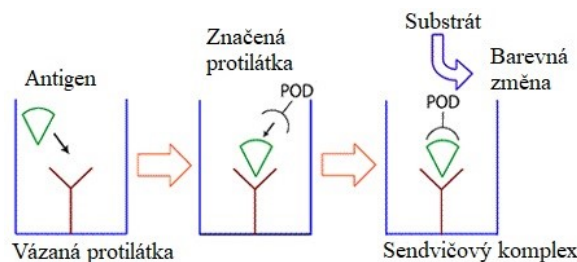
Vliv osteokalcinu na mužskou reprodukční soustavu byl pozorován na myším modelu. Samci myši, kteří měli vysokou aktivitu OC, měli zvýšený objem varlat a počet spermií. Zatímco u samců myši, kteří měli gen pro OC vyřazený, byla pozorována zmenšená varlata, nadvarlata a semenné vajíčky. Samice myši nevykazovaly při vyřazení genu pro OC žádné reprodukční abnormality. Na povrchu Leydigových buněk byl identifikován receptor pro ucOC, který se nazývá receptor spřažený s proteinem G (GPCR6A) (Shao et al., 2015). Myši s vyřazeným genem pro GPCR6A se fenotypově projevovaly jako myši s vyřazeným genem pro OC. Myši akumulovaly tuk, projevila se u nich hyperglykémie, glukózová intolerance i inzulínová rezistence. Dále docházelo k poklesu hladin testosteronu, což vedlo k demaskulinizaci (Zoch et al., 2016). Lze říci,

že deficit OC by mohl být hypoteticky nový patogenetickým faktorem zodpovědným za hypogonadismus u mužů. Avšak autoři El-Kamsoushi et al. (El-Kamshoushi et al., 2017) uvádějí, že nenalezli žádnou korelaci mezi sérovou hladinou ucOC a koncentrací spermií, jejich morfologií a hybností, ani jinou korelaci mezi sérovou hladinou ucOC a sérovou hladinou testosteronu. Dalším možným faktorem ve správném vývoji gonád by mohl být 1,25-(OH)₂ vitamin D, jehož receptory jsou přítomny v gonádách a spermiích. Zároveň se 1,25-(OH)₂ vitamin D podílí na modulaci syntézy pohlavních steroidů a také na kvalitě spermií. Proto je suplementace vitaminem D využívána při asistované reprodukci (Boisen et al., 2017; El-Kamshoushi et al., 2017; Zofkova, 2018).

2.1.4. Stanovení osteokalcinu

Osteokalcin je možné stanovit v různých formách, buď jako celkový osteokalcin (tOC), intaktní osteokalcin (1-49), který je velmi nestabilní. Dále lze stanovit N-terminální mid-fragment osteokalcinu (N-MID; aminokyseliny 1 – 43) nebo nedostatečně karboxylovaný OC. Stanovení N-MID fragmentu osteokalcinu se obvykle rutinně stanovuje v biochemických laboratořích. Jeho stanovení probíhá pomocí sendvičové imunoanalýzy, kde jsou využity biotinylované protilátky proti N-MID osteokalcinu. U této metody nedochází k ovlivnění výsledků ikerem, lipemii ani biotinem. Stanovení nedostatečně karboxylovaného osteokalcinu je také možné pomocí sendvičové imunoanalýzy, kde jsou využity 2 myši monoklonální protilátky anti-ucOC. První myši protilátka je imobilizována v mikrotitrační jamce, kde blokuje nespecifické vazby. Druhá myši protilátka je přidávána současně s peroxidasou. Peroxidasou dokáže reagovat se substrátem za vzniku barevného komplexu (Roche Diagnostics GmbH, 2017).

Obrázek 10 znázorňuje princip sendvičové imunoanalýzy pro stanovení ucOC nebo N-MID.



Obr. 10 Princip reakce stanovení ucOC nebo OC (sendvičová imunoanalýza)
 Přeloženo a upraveno ze zdroje: (Takara Bio USA, Inc., 2020)
 (POD – peroxidasa)

2.2. Matrix Gla protein (MGP)

Matrix Gla protein je druhým proteinem izolovaným z kostí. Syntéza MGP probíhá kromě kosti i v chrupavce, plicích, srdci a ledvinách. Hlavním zdrojem syntézy a sekrece jsou cévní buňky hladkého svalstva (VSMC). Maturovaný MGP se skládá z 84 aminokyselinových reziduí a jeho molekulová hmotnost je 10,6 kDa. Gen pro MGP je lokalizován na 12. chromozomu dlouhého raménka v oblasti p13.1-p12.3. MGP obsahuje devět glutamových reziduí (Glu) a pět serinových reziduí. Oproti osteokalcinu MGP podstupuje dvě posttranslační modifikace. Po translaci v endoplazmatickém retikulu dochází k první posttranslační modifikaci, která je stejná jako v případě osteokalcinu – γ -glutamylkarboxylace. Tuto karboxylaci podstupuje pět Glu reziduí v pozicích 2, 37, 41, 48 a 52. Druhou posttranslační modifikací je serinová fosforylace, kterou z pěti možných serinových reziduí postupují tři v pozicích 3, 6 a 9. Tato modifikace probíhá v Golgiho aparátu (Schurgers et al., 2008; Silaghi et al., 2019; Wei et al., 2019).

Díky posttranslačním modifikacím existuje několik typů MGP – nedostatečně karboxylovaný defosforylovaný MGP (uc-dpMGP), nedostatečně karboxylovaný fosforylovaný MGP (uc-pMGP), karboxylovaný defosforylovaný MGP (c-dpMGP), karboxylovaný fosforylovaný MGP (c-pMGP). Dále pak můžeme rozlišit skupiny MGP na: celkový defosforylovaný MGP (t-dpMGP), kam patří dp-ucMGP a dp-cMGP; celkový fosforylovaný MGP (t-pMGP), kam patří uc-pMGP a c-pMGP; pokud se na toto rozdělení přihlíží z druhé posttranslační modifikace, rozlišujeme celkový nedostatečně karboxylovaný MGP (t-ucMGP), kam patří uc-dpMGP a uc-pMGP; a celkový karboxylovaný MGP (t-cMGP), kam patří c-dpMGP a c-pMGP (Mayer, 2016). V *tabulce 4* je uveden přehled jednotlivých typů MGP s posttranslačními modifikacemi.

Tab. 4 Přehled typů MGP

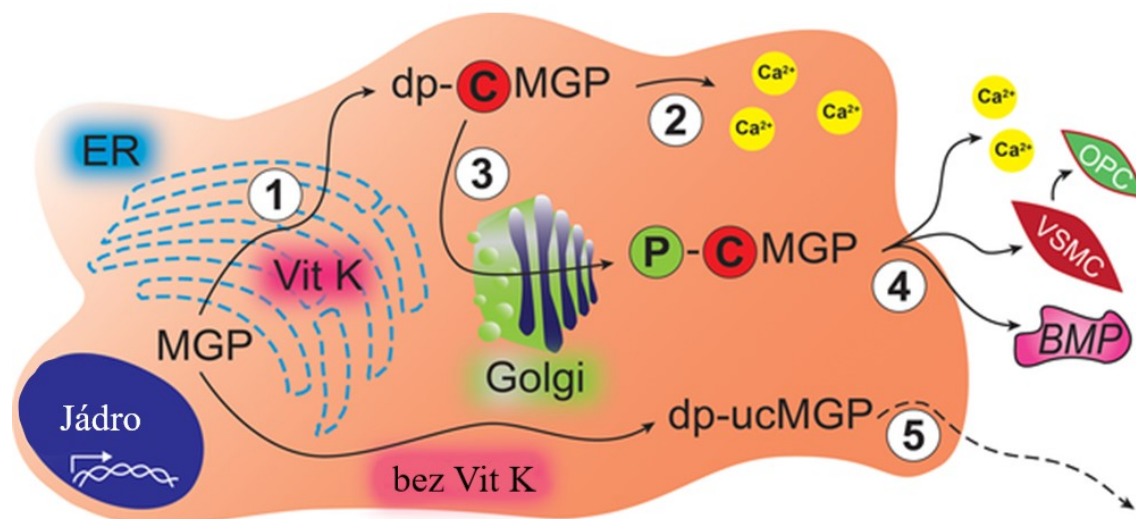
Posttranslační modifikace	Bez fosforylace	S fosforylací	
Bez karboxylace	uc-dpMGP	uc-pMGP	t-ucMGP
S karboxylací	c-dpMGP	c-pMGP	t-cMGP
	t-dpMGP	t-pMGP	

Na expresi genu MGP se mohou podílet některé vitaminy rozpustné v tucích jako je vitamin A a vitamin D. Ve fibroblastech, chondrocytech, osteoblastech a pneumocytech dokáže retinová kyselina zvýšit expresi mRNA pro MGP, zatímco v buňkách ledvin a VSMC má kyselina retinová opačný efekt. Aktivní forma vitamínu D₃ (1,25-(OH)₂ vitamin D₃) vykazovala vliv na zvýšenou expresi genu pro MGP u VSMC (Schurgers et al., 2008).

2.2.1. Izoformy matrix Gla proteinu a jejich funkce

Za plně biologickou aktivní izoformu MGP se považuje karboxylovaný fosforylovaný MGP (c-pMGP). Takto maturovaný MGP inhibuje produkci kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP-2), který je schopen antagonizovat tvorbu Gla-rich proteinu v chondrocytech a také je schopen podporovat osteogenní diferenciaci VSMC. Nedostatečně karboxylované izoformy MGP postrádají antikalcemickou aktivitu, přesto díky své fosforylaci jsou schopné adherence na kalciová depozita. Z tohoto důvodu lze asociovat jejich snížené hladiny se zvýšeným výskytem vaskulárních kalcifikací. I přesto, že izoforma c-dpMGP je karboxylovaná, chybějící druhá posttranslační modifikace (fosforylace) zapříčiní neschopnost adherence na kalcifikovanou strukturu. Z toho důvodu nemůže být uplatněna její antikalcemická aktivita. Izoforma uc-dpMGP, která není karboxylovaná ani fosforylovaná, je považována za inaktivní izoformu MGP a lze ji vnímat jako biomarker antikalcemické aktivity MGP. Tato izoforma odráží biologickou dostupnost vitamínu K v organismu. Při deficitu vitamínu K dochází k nedokonalému vyzrání MGP a následkem tohoto jevu je zvýšená kalcifikace měkkých tkání. Koncentrace izoformy uc-dpMGP často koreluje s rozsahem koronárních kalcifikací, kardiovaskulární mortalitou i morbiditou. S koncentrací uc-dpMGP koreluje také výskyt rizika kardiovaskulární příhody. U pacientů s chronickou renální insuficiencí koreluje

tato kombinace s mortalitou. Významná role uc-dpMGP byla pozorována u levého srdečního selhávání, kde se zhoršovalo srdeční selhávání včetně následků (Mayer, 2016). Izoforma uc-dpMGP je vnímána jako nejlepší nepřímý ukazatel deficitu vitamínu K. Cirkulující uc-dpMGP se zvyšuje s věkem a také při zhoršení renálních funkcí (Wei et al., 2019, 2018). **Obrázek 11** ukazuje hypotetický vznik maturovaného MGP (c-pMGP).



Obr. 11 Hypotetický vznik maturovaného MGP

Přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Wei et al., 2018)

(ER – endoplazmatické retikulum, MGP-matrix Gla protein, Vit K – vitamin K, Golgi – Golgiho aparát, dp-cMGP – defosforylovaný karboxylovaný MGP, p-cMGP – fosforylovaný karboxylovaný MGP, dp-ucMGP – defosforylovaný nedostatečně karboxylovaný MGP, VSMC – cévní buňky hladkého svalstva, BMP – kostní morfogenetický protein, OPC – osteochondrogenní progenitorové buňky)

2.2.2. Funkce matrix Gla proteinu v kardiovaskulárním systému

Významná funkce MGP byla pozorována na myším modelu při absenci genu pro syntézu MGP. Myši s chybějícím genem pro MGP byly postiženy masivními cévními kalcifikacemi, vaskulárními příhodami a předčasnými úmrtími. Význam přítomnosti vitamínu K pro správnou funkci MGP je pozorován v souvislosti s nežádoucími účinky warfarinu (antagonisty vitamínu K), kdy v důsledku nízké hladiny vitamínu K u uživatelů warfarinu dochází k patofyziologickým stavům např. kalcifikaci měkkých tkání. Hlavní vazebná místa pro kalciové ionty v MGP jsou zejména na γ -karboxyglutamátových reziduí. Druhá posttraslační modifikace (fosforylace) nemá zcela jasnou funkci v inhibici kalcifikace. Předpokládá se, že by mohla hrát roli v regulaci sekrece MGP

a/nebo zprostředkovávat vazbu cirkulujícího MGP na kalciové ionty (Mayer, 2016). V důsledku zvýšené kalcifikace stěn cév dochází i k rychlejšímu rozvoji tepenné tuhosti. Pacienti s vyšší koncentrací uc-dpMGP vykazovali zhruba o 70 % vyšší riziko zvýšené pulzové vlny, která je brána jako parametr tepenné tuhosti (Mayer, 2016; Pivin et al., 2015). Publikace autorů Dahlberg et al. (Dahlberg et al., 2018) připouští, že vyšší hladiny uc-dpMGP by mohly být ovlivněny vyšším věkem. Zvýšené hladiny uc-dpMGP byly také publikovány u pacientů s aterosklerózou. V publikaci autorů Nigwekar et al. (Nigwekar et al., 2017) byl publikován výpočet relativní koncentrace karboxylovaného MGP (cMGP), který je odvozen z cMGP a nedostatečně karboxylovaného MGP (ucMGP). Vztah pro výpočet relativní koncentrace karboxylovaného matrix Gla proteinu (rel cMGP) je uveden zde: $rel\ cMGP = \frac{cMGP}{cMGP + ucMGP}$. Tato relativní koncentrace cMGP byla vypočítána u pacientů na hemodialýze s výskytem a bez výskytu kalcifylaxe. Kalcifylaxe je vzácný syndrom, kde dochází k ukládání vápenatých iontů do stěn cév, následnému rozvoji ischemie až ke vzniku bolestivých kožních lézí. U pacientů s kalcifylaxemi byla pozorována snížená hladina relativní koncentrace cMGP oproti skupině pacientů bez kalcifylaxí. Navíc pacienti s tímto onemocněním měli statisticky významně nižší také sérové koncentrace 25-hydroxyvitaminu D (25-OH vitaminu D). Koncentrace 25-OH vitaminu D byly u pacientů s kalcifylaxí $18,0 \pm 2,5$ ng/ml, zatímco u kontrolní skupiny byly naměřeny hladiny $32,4 \pm 2,9$ ng/ml. Nepřímý ukazatel stavu hladiny vitaminu K – INR nevykazoval statisticky významný rozdíl mezi pacienty a kontrolní skupinou (Nigwekar et al., 2017).

2.2.3. Matrix Gla protein v kostním systému

Epidemiologické studie prokázaly, že snížená hladina vitaminu K je asociována s osteoartritidou (OA) v dlaních a kolenech. Při OA nejspíše dochází k vyšší produkci ucMGP. Vzhledem k nízkému příjmu vitaminu K nedochází ke karboxylaci ucMGP a důsledky onemocnění OA se zhoršují. Avšak všechny mechanismy produkce ucMGP a nedostatečné karboxylace tohoto proteinu u pacientů s OA nebyly zřetelně objasněny (Wen et al., 2018). V důsledku již zmiňovaného kalciového paradoxu může také docházet ke zvýšení rizika rozvoje osteoporózy (Gheorghe a Crăciun, 2016; Masterjohn, 2008).

2.2.4. Keutelův syndrom

Toto onemocnění získalo název po dětském kardiologu Jürgenu Keutelovi, který ho v roce 1971 se svými kolegy v Německu popsal. Keutelův syndrom je způsobený mutací v MGP genu na chromozomu 12 v místě p13.1-p12.3. Keutelův syndrom je vzácné autosomálně recesivní genetické onemocnění. Odhadovaná prevalence v celosvětové populaci je 1 pacient na 1 milion obyvatel (Keutel et al., 1972; Khosroshahi et al., 2014). Při tomto onemocnění dochází k abnormální kalcifikaci chrupavek, hypoplasii obličeje a ztrátě sluchu. Pacienti s tímto syndromem dále vykazují periferní plicní stenózu, mírnou mentální retardaci a postižení prstů ruky s krátkými distálními ohyby. Léčba je pouze symptomatická. Pacienti s tímto syndromem mají poměrně dobrou prognózu, která se odvíjí od míry kalcifikace tepen (Khosroshahi et al., 2014; Perrone et al., 2018).

2.2.5. Stanovení matrix Gla proteinu

Stanovení MGP je možné provést jako v případě osteokalcinu pomocí enzymové imunanalýzy, kde se k vytvoření barevného komplexu používá křenová peroxidasa (MyBioSource, 2020a).

2.3. Gla rich protein (GRP)

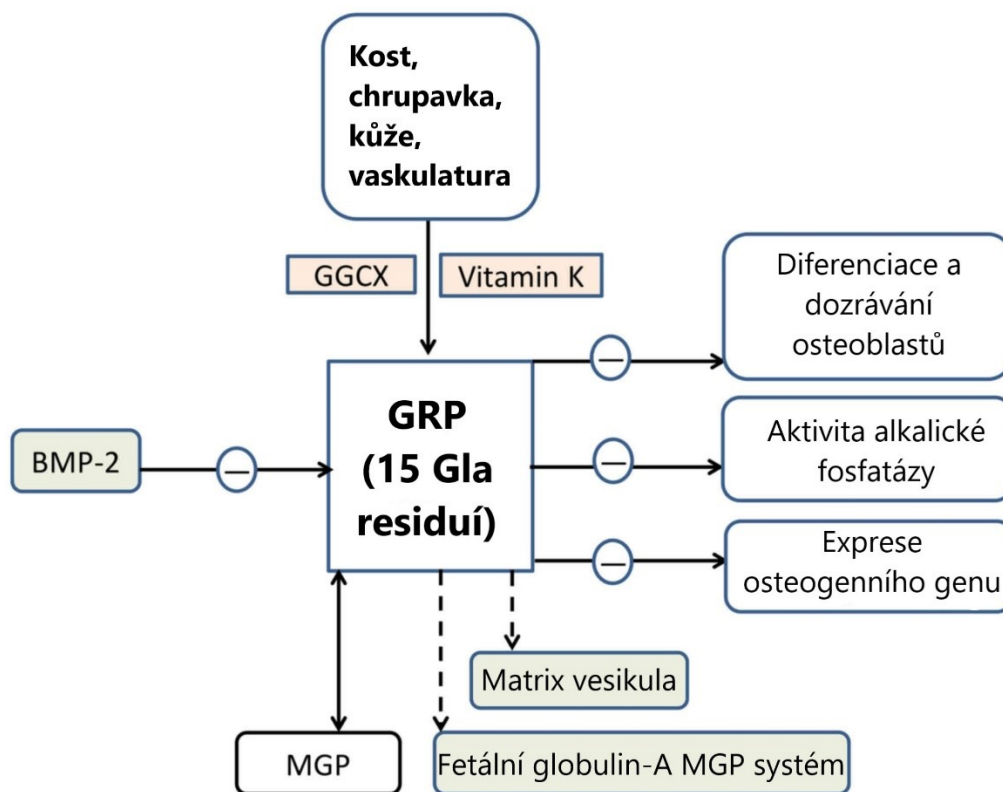
Gla rich protein je poslední identifikovaný protein ze skupiny VKDP. GRP byl získán z kalcifikované chrupavky jesetera. GRP pochází z prepropeptidu, který obsahuje zhruba 135 aminokyselinových reziduí. Po odstranění transmembránového signálního peptidu je zbylý proprotein štěpen furin-like proteázou na propeptid, obsahující 38 - 39 aminokyselinových reziduí, a maturovaný peptid, obsahující 67 - 74 aminokyselinových reziduí. Jeho název byl odvozen od vysokého počtu Gla reziduí (16 Gla reziduí), které obsahuje ve své molekule. U lidí se předpokládá, že molekula GRP obsahuje 15 Gla reziduí. Vzhledem k vysokému počtu Gla reziduí v molekule GRP je tento protein dnes řazen mezi proteiny s nejvyšším počtem Gla reziduí. Jiná posttranslační modifikace mimo γ -glutamylkarboxylaci není u tohoto proteinu prozatím známa (Cancela et al., 2012). Molekulová hmotnost GRP je 10,2 kDa a obsahuje 74 aminokyselinových reziduí. GRP se podílí na inhibici kloubní a kardiovaskulární kalcifikace. Kromě chrupavky se nachází

i v kůži, kostech, vaskulátorách (Viegas et al., 2014; Wen et al., 2018). Jeho funkce zatím není zcela objasněna. Dokáže působit jako negativní regulátor osteogenní diferenciace nebo jako modulátor kalciové dostupnosti v extracelulární matrix. Obdobně jako ucMGP je nedostatečně karboxylovaná forma GRP (ucGRP) asociována s onemocněními spojených s kalcifikacemi jako je např. kalcifikovaná stenóza aortální chlopně nebo osteoartritida. U některých nádorů byla také pozorována zvýšená hladina ucGRP. GRP jako součást MGP-fetuin A komplexu se považuje za silný antimineralizační systém. Všechny tyto tři proteiny vykazují vysokou kapacitu inhibice kalcifikace. Pokud nastanou podmínky pro kalcifikační promotory (urémie, zánět, oxidační stres, deficit vitamínu K, endoteliální dysfunkce, stárnutí), VSMC sníží expresi genů asociovaných s kontrakcí cév a zároveň zvýší expresi několika osteogenních markerů např. BMP-2, runt-related transkripčního faktoru 2 (Runx2), OC, osteopontinu. Poté dochází k uvolňování kalcifikačních extracelulárních vesíklů charakterizovaných snížením inhibitorů mineralizace a přítomností hydroxyapatitových krystalů, což má za následek extracelulární matrixovou mineralizaci a degradaci. V posledním kroku dochází až k buněčné apoptóze. U GRP byl pozorován také protizánětlivý efekt (Viegas a Simes, 2016; Viegas et al., 2014). Regulace genu GRP byla popisována u BMP-2, kdy BMP-2 působí jako antagonist exprese GRP v chondrocytech. Exprese genu pro GRP by mohla být zvýšena pomocí Runx2 a osterixu (Wen et al., 2018). GRP byl přítomen ve všech leukocytech při protizánětlivé odpovědi systému (Viegas et al., 2017).

2.3.1. Funkce Gla rich proteinu v kostním systému

Gla rich protein je považován jako negativní regulátor osteogenní diferenciace. GRP může zpomalit diferenciaci a dozrávání osteoblastů, snižuje aktivitu alkalické fosfatázy a expresi osteogenních genů. GRP vykazuje podobný efekt u OA jako MGP (Wen et al., 2018). Bylo publikováno, že GRP by mohl mít klíčovou roli v chondrogenezi (Cancela et al., 2012).

Na *obrázku 12* je znázorněno schéma funkcí GRP.



Obr. 12 Schéma funkcí Gla rich proteinu

Přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Wen et al., 2018)

(BMP-2 – kostní morfogenetický protein 2; MGP – matrix Gla protein; GRP – Gla rich protein; GGCX – γ -glutamylkarboxyláza; "znaménko minus" – inhibice)

2.3.2. Funkce Gla rich proteinu v kardiovaskulárním systému

V kardiovaskulárním systému funguje GRP jako regulátor VSMC diferenciace buněk podobným osteoblastům a dále jako regulátor vaskulární kalcifikace. Obdobně jako MGP dokáže GRP působit jako inhibitor kalcifikace v cévách a měkkých tkáních (Wen et al., 2018).

2.4. Specifický protein 6 zastavující růst (Gas6)

Specifický protein 6 zastavující růst (Gas6) obsahuje na N-konci Gla doménu s 11 – 12 Gla rezidui. Jeho molekulová hmotnost je 75 kDa. S antikoagulačním proteinem S se shoduje ve 44 %. Gas6 se skládá ze tří částí: aminoterminální části, oblasti s opakujícími se proteiny a karboxyterminální části. Gas6 byl izolován z fibroblastů. Gas6 byl pozorován i u endotelií, v hladkém cévním svalstvu, kostní dřeni a buňkách centrální nervové soustavy. Gas6 je mimo výše uvedené přítomen v srdci, plicích, střevu, ledvinách, mozku, slinivce, vaječnicích, varlatech, VSMC a makrofázích. Nízká exprese

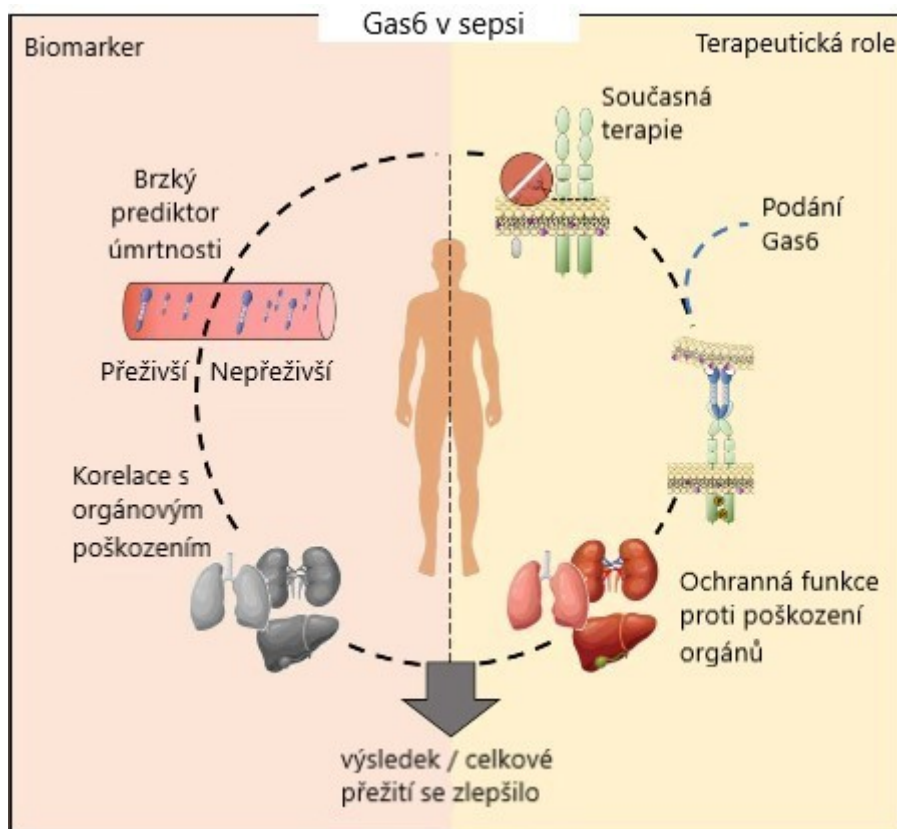
Gas6 je v játrech. Gas6 je zahrnut v mnoha buněčných procesech jako je buněčná diferenciacie, proliferace a aktivace, dále cévní adheze, chemotaxe, fagocytóza a ochrana proti apoptóze. Gas6 dokáže inhibovat cévní kalcifikaci pomocí inhibice VSMC apoptózy (Erdman et al., 2012; Mills et al., 2018; Silaghi et al., 2019; Stalder et al., 2016; Wen et al., 2018). Dokáže interagovat s tyrosinkinázovými receptory tzv. TAM rodiny (Tyro3, Axl, Mer), které představují distribuci makrofágů a dendritických buněk. Tento protein s jeho receptory je schopen regulovat zejména vrozenou imunitu, zahájit protizánětlivé odpovědi přes inhibici produkce cytosinů po antigen prezentující buňky. Systém Gas6-Axl dodává signály přes cestu PI3K/Akt (fosfatidylinositol-4,5-bifosfát-3-kinázy/proteinkináza B), kde poté dokáže ovlivňovat migraci buněk, buněčné metastázy a buněčnou adhezi. Tento systém podporuje invazi karcinomu orálních skvamózních buněk a cesta Gas6 / Axl-NF-KB (jaderný faktor-kappa B) zvyšuje schopnost invaze / migrace karcinomu orálních skvamózních buněk. Avšak prozatím není stále jasné, jak Gas6-Axl zprostředkovává buněčnou motilitu buněk spinocelulárního karcinomu jícnu, a jestli podporuje posílení těchto signálních drah. Zvýšená exprese PI3K a Akt byla pozorována u nádorových buněk jícnu. Tento systém může být blokován čínskou bylinou zvanou „*qigesan*“ (Hallajzadeh et al., 2015; Kong et al., 2019). Změněnou aktivitu nebo expresi Gas6/TAM komponentů lze pozorovat u zánětů, koagulopatií, nádorů, autoimunitních onemocnění, cévního onemocnění diabetiků a onemocnění ledvin. Další funkce Gas6 byla popsána v krevní koagulaci, kde se účastní adheze trombocytů k endotelu a stabilizace trombu - krevní zátky (Hallajzadeh et al., 2015; Stalder et al., 2016).

2.4.1. Význam Gas6 při sepsi

Sepse je jednou z celosvětově nejčastějších život ohrožujících stavů. Při sepsi je nejdůležitější rychlá diagnóza kvůli riziku vysoké komorbidity. Při septických stavech by mohl být využit Gas6 jako raný biomarker. Plazmatické koncentrace Gas6, měřené v době příjmu pacienta na oddělení intenzivní péče, mohou předpovídat úmrtnost a multiorgánové selhání. Vysoké hladiny Gas6 uvolňovaného v krevním oběhu během sepsy jsou zaměřeny na vyvažování dysfunkcí sepsy. Bohužel zánětlivé stimuly snižují odpověď TAM receptory, a proto i nadměrné uvolňování Gas6 bývá neúčinné. Terapie sepsy se zaměřuje na snižování zánětlivých podnětů. Podávání Gas6 septickým pacientům by mohlo fungovat na aktivovaných receptorech TAM a chránit orgány

před poškozením. Kombinace správné a včasné diagnózy a podání Gas6 by mohla zlepšit výsledek celkového přežití pacientů (Salmi et al., 2019).

Na **obrázku 13** je znázorněna funkce Gas6 v sepsi.



Obr. 13 Funkce Gas6 v sepsi

Přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Salmi et al., 2019)

2.4.2. Funkce Gas6 v kardiovaskulárním systému

Přítomnost Gas6 byla pozorována u cévní remodelace, homeostázy a aterosklerózy. Gas6 chrání endoteliální buňky a VSMC proti apoptóze. Zvýšená exprese genu pro Gas6 byla popsána u dilatační kardiomyopatie u lidí, kardiální hypertrofie u myší a v srdcích pacientů při léčbě angiotensinem II. Nedostatek Gas6 dokáže oslabit srdeční hypertrofii a fibrózu léčenou deoxykortikosteronem (Wen et al., 2018).

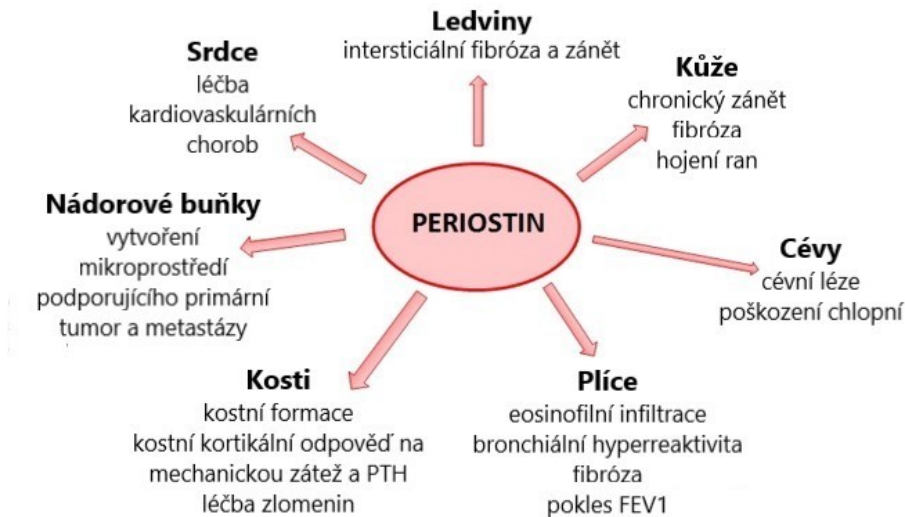
2.4.3. Funkce Gas6 při onemocnění ledvin

U pacientů s hemodialýzou a chronickým onemocněním ledvin byly nalezeny zvýšené hladiny Gas6, které byly nepřímo úměrně asociovány s odhadem glomerulární filtrace. Zvýšená hladina Gas6 nejspíše souvisí s endoteliální funkcí Gas6. Zvýšená hladina Gas6 v plazmě byla dále pozorována u pacientů s hantavirem, který způsobuje hemoragické horečky. Naopak snížená hladina Gas6 byla pozorována u pacientů s diabetickou neuropatií se ztrátami malého množství albuminu („mikroalbuminurie“) nebo s proteinurií oproti pacientům s diabetickou neuropatií, kteří měli fyziologickou proteinurii. Vyšší hladiny Gas6 byly asociovány s nižším rizikem rozvoje diabetické neuropatie, avšak bez jasného vysvětlení funkce (Silaghi et al., 2019).

Gas6 vykazuje potenciální význam v nádorech ledvin zejména v karcinomu renálních buněk, který patří mezi nejčastější typy renálních karcinomů. Inaktivace cesty Gas6/Axl v tomto typu karcinomu ukazuje zvrácení metastatických a invazivních buněčných fenotypů. Aktivace Axl zprostředkovaná Gas6 vede ke snížení migrační buněčné kapacity, vliv na invazi nebyl u této cesty pozorován (Silaghi et al., 2019).

2.5. Periostin a periostinu podobný faktor

Periostin byl poprvé prokázán v myších osteoblastech. Zatímco periostinu podobný faktor (PLF) byl identifikován v srdeční tkáni. Jeho molekulová hmotnost je zhruba 90 kDa. Název pochází z jeho vysoké exprese v periostu (Novosad et al., 2013). Někdy se v literatuře můžeme setkat i s druhým názvem periostinu - osteoblast-specifický faktor 2. Periostin obsahuje 150 aminokyselinových reziduí. Periostin je primárně sekretován osteoblasty a jeho prekuzorovými buňkami. Sekrece probíhá i ve fibroblastech. U dospělých savců je dále produkován srdeční chlopní. Periostin a PLF jsou přítomni u obratlovců. Periostin je adhezní molekula, která díky vazbám na povrchové receptory buněk podporuje diferenciaci, agregaci, adhezi a proliferaci osteoblastů (Wen et al., 2018).



Obr. 14 Funkce periostinu v organismu

Přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Reutova, 2019)

(FEV1 - usilovně vydechnutý objem za první sekundu; objem vzduchu vydechnutý s největším úsilím za 1. sekundu po maximální nádechu)

2.5.1. Periostin a periostinu podobný faktor v kostním systému

Zvýšená exprese periostinu může být vnímána jako marker trvalého velkého tlaku na kostní hmotu. Hladina PLF může být také použita jako včasný indikátor adaptivní kostní remodelace, která může pomoci včasné diagnostikovat a léčit nemoci pohybového aparátu. V dospělé kosti je PLF ve zvýšené expresi při léčbě zlomeniny. Ke zvýšené expresi periostinu a PLF dochází také při mechanickém přetížení kosti, při zranění nebo v rámci kostní remodelace (Wen et al., 2018).

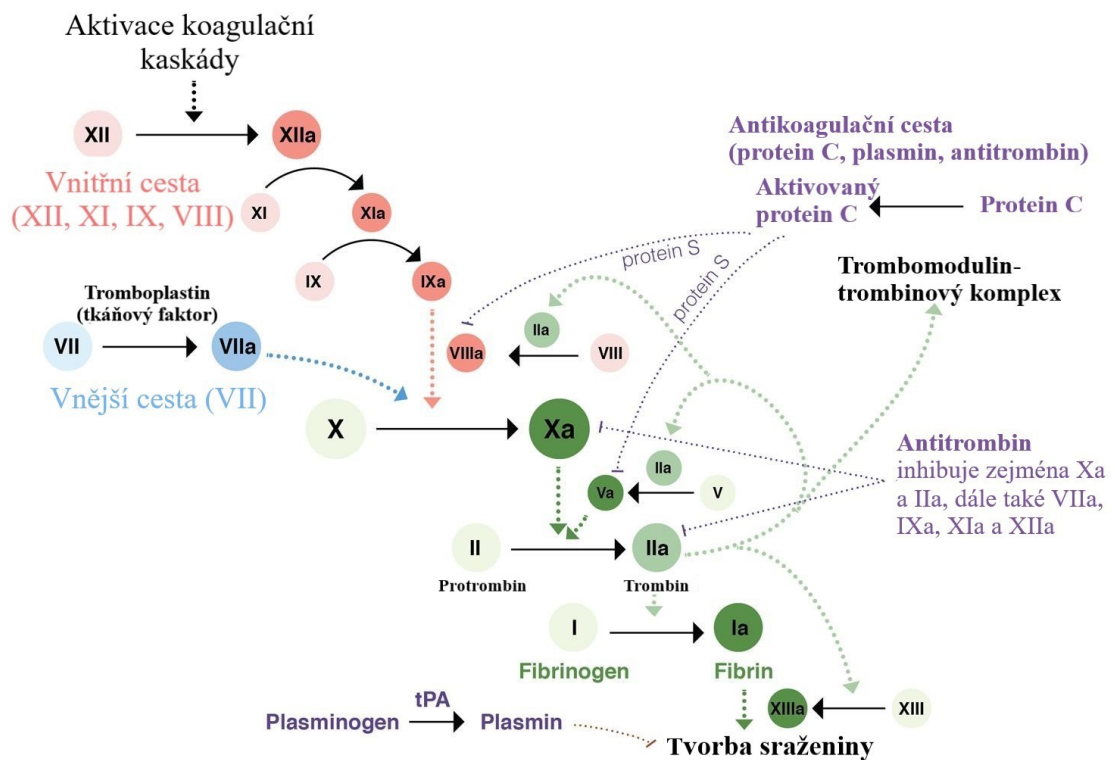
2.5.2. Periostin a periostinu podobný faktor v kardiovaskulárním systému

Periostin a PLF se podílí na vývoji srdce během embryogeneze a novorozeneckého období. U dospělých jedinců dochází k jejich zvýšení při kardiomyopatii (Zhu et al., 2008). Nadměra exprese periostinu v srdci vede k srdeční dysfunkci a významně zvyšuje riziko fibrózy. Na myším modelu s vyřazeným genem pro periostin docházelo k redukci fibrózy po dlouhodobé stresové zátěži. Periostin hraje důležitou roli v srdeční fibróze, ale je také klíčový faktor při rekonstrukci srdeční funkce u srdečního selhání po přetížení srdce. Vyšší exprese periostinu byla pozorována v glomerulech u pacientů s renální lézí (Wen et al., 2018).

Periostin má čtyři izoformy, které se značí Pn-1 až Pn-4. Rozdíl mezi jednotlivými izoformami je v přítomnosti/absenci exonů 17 a 21. První izoforma Pn-1 je jediná s přítomností obou exonů. Druhá izoforma Pn-2 nemá exon 17. U třetí izoformy Pn-3 chybí exon 21. A poslední izoforma Pn-4 nemá ani exon 17, ani exon 21. Tyto čtyři izoformy byly popsány v srdci u krysy, které prodělaly srdeční infarkt. Izoforma Pn-1 vykazovala inhibiční účinek na adhezi buněk srdečního fibroblastu a srdečních svalových buněk, naproti tomu izoforma Pn-2 vykazovala opačný účinek. Izoforma Pn-2 dále vykazovala vliv na zvýšení tvorby krevních cév (angiogeneze). Tento účinek nebyl u izoformy Pn-1 pozorován (Wen et al., 2018).

2.6. Vitamin K dependentní koagulační faktory a antikoagulační proteiny

Koagulační faktory jsou označeny římskými číslicemi dle časové posloupnosti jejich objevování. Aktivované formy koagulační faktorů se označují malým písmenem *a*. Většina koagulačních faktorů je tvořena v játrech. Čtyři koagulační faktory potřebují ke své syntéze vitamin K. Mezi tyto vitamin K dependentní koagulační faktory patří faktor II, VII, IX a X. Koagulační faktory jsou v plazmě přítomny v podobě koenzymu a ke své aktivaci vyžadují proteolytické štěpení. Vitamin K dependentní koagulační proteiny můžeme rozdělit do čtyř skupin: 1. koagulační proteiny související pouze s krvácením, 2. koagulační proteiny související jak s krvácením, tak s trombózou, 3. koagulační proteiny související pouze s trombózou a 4. koagulační proteiny pravděpodobně nesouvisející ani s krvácením ani s trombózou (Girolami et al., 2018).



Obr. 15 Schéma koagulační kaskády

Přeloženo a upraveno z původní zdroje: (Lui, 2019)
(tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu)

2.6.1. Koagulační proteiny související pouze s krvácením

Faktor X (FX) lze nazývat faktorem Stuarta-Prowerové. Název pochází z jmen pacientů, u kterých byla porucha FX poprvé zjištěna. Molekulová hmotnost FX je 58,9 kDa a jeho biologický poločas je 32 hodin. Plazmová koncentrace FX je 6 – 10 mg/l. Aktivace FX probíhá za účasti vnější nebo vnitřní tenázy. Aktivní FX je součástí enzymatického koagulačně aktivního komplexu protrombinázy, která katalyzuje přeměnu protrombinu na trombin. Aktivní FX může být inhibován proteinem Z, který zde hraje úlohu kofaktoru (Pecka, 2004).

Prevalence deficitu FX je zhruba 1:500 000 lidí. U tohoto typu deficitu je známo okolo 150 mutací. Ve většině případů je jedná o substituční bodovou mutaci (missense). Deficit FX je většinou sympomatický u homozygotů i heterozygotů. Nejčastější příznaky deficitu FX jsou krvácení do mozku, hemartóza a hluboké hematomy. Byly prezentovány dva typy defektu: typ 1 (snížená aktivita FX a zároveň snížená hladina antigenu FX) a typ 2 (nízká aktivita FX, ale antigen FX v normě). Oba dva typy způsobují prodloužení

aktivačního parciálního tromboplastionového času (aPTT) i protrombionového času (PT) (Pecka, 2004).

2.6.2. Koagulační proteiny související jak s krvácením, tak s trombózou

Do druhé skupiny, koagulační proteiny související jak s krvácením, tak s trombózou, patří faktor II (FII), faktor VII (FVII) a faktor IX (FIX) (Pecka, 2004).

2.6.2.1. Faktor II (FII) a protein indukovaný nedostatečností vitamínu K (PIVKA-II)

Faktor II se také nazývá protrombin. Účinkem protrombinázy se FII mění na trombin (FIIa). Molekulová hmotnost FII je 72 kDa a obsahuje 532 aminokyselin. Jeho koncentrace v plazmě je 100 – 200 mg/l. Biologický poločas je 48 hodin. Trombin dokáže působit koagulačně i inhibičně. Trombin štěpí fibrinogen (koagulační faktor I) na fibrin, dokáže aktivovat faktory V, VIII, IX a XIII, je významný aktivátor trombocytů, posiluje tvorbu a sekreci tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) na endotelu, a po vazbě na trombomodulin aktivuje protein C a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (Pecka, 2004).

Stav pacienta s deficitem FII je silně ovlivněn tím, jak je nízká hladina FII. Úplná absence FII se jeví jako neslučitelná se životem. Pokud jsou hladiny FII nižší než 10 % normální hladiny, dochází k silným krvácivým stavům. U heterozygotů s hladinami FII mezi 40 % a 60 % normální hladiny dochází ke zvýšenému krvácení během operací nebo zubních extrakcí (Girolami et al., 2018).

Byly publikovány protrombinové abnormality související s trombotickými stavy. Antitrombin je malý glykoprotein ($M_r = 5,8$ kDa) produkovaný játry. Ve spojení s heparinem dokáže silně působit na aktivitu FII a FX. Pokud nastane stav zvýšené rezistence na antitrombin, dochází k prodloužení trombinové aktivity, která vede k trombóze. Tento stav se nazývá „antitrombinová rezistence“. Relativní snížení antitrombinové aktivity je zapříčiněno přítomností abnormálně rezistentních FII, kteří mají mutaci. Tato mutace způsobí, že komplex antitrombin-trombin je vadný. Trombin přetrvávající v cirkulaci způsobí sníženou aktivitu protrombinu, a tím způsobí trombolýtický stav. Zatím není jasné, jaká mutace v kodónové sekvenci zapříčiní posun z krvácivých do trombolýtických stavů (Pecka, 2004).

Protein indukovaný nedostatečností vitamínu K či des- γ -karboxyprotrombin (PIVKA-II, z angl. *protein induced by vitamin K absence-II*) byl poprvé popsán roku 1968 jako abnormální protrombin s chybnou koagulační funkcí u pacientů léčených antagonisty vitamínu K. Jeho hladina by měla nepřímo vypovídat o koncentraci vitamínu K₁ v organismu. Dnes se tento protein společně s alfa-fetoproteinem (AFP) používá při diagnostice hepatocelulárního karcinomu (HCC), jelikož jeho hladiny u pacientů s HCC jsou výrazně zvýšené a dosahují až 100x vyšších hodnot oproti zdravé populaci. Dále také hladiny PIVKA-II dobře korelují se stádiu HCC. Dnes lze tento marker stanovit ručními či automatizovanými enzymovými analýzami (Abbott Laboratories, 2020; Kang et al., 2015; Saitta et al., 2017; Sharma et al., 2010; Svobodova et al., 2018). Stanovení PIVKA-II bylo například využito v publikaci autorů Nigwekar et al. (Nigwekar et al., 2017) u pacientů s kalcifylaxí. Autoři publikovali hladiny PIVKA-II $\geq 2,0$ ng/ml jako ukazatel deficitu vitamínu K. Zhruba 90 % pacientů s kalcifylaxí a s antikoagulační léčbou vykazovalo deficit vitamínu K. Pacienti s kalcifylaxí bez antikoagulační léčby dosahovali deficitu zhruba v 80 %. U kontrolní skupiny pacientů s antikoagulační léčbou bez kalcifylaxe byl díky stanovení PIVKA-II prokázán deficit zhruba v 50 % a u pacientů bez antikoagulační léčby pouze v necelých 40 % (Nigwekar et al., 2017).

2.6.2.2. Faktor VII (FVII)

Faktor VII zvaný též prokonvertin má molekulovou hmotnost 50 kDa a obsahuje 406 aminokyselin. Jeho biologický poločas je 4 – 6 hodin. Plazmatická koncentrace FVII je 2 – 5 mg/l. Celkem deset Glu v tomto faktoru podstupuje γ -karboxylace za účasti vitamínu K. FVII je aktivován v přítomnosti trombinu nebo některých z aktivovaných faktorů: FIXa, Xa a XIa. Aktivní forma FVII je stabilní zhruba 2,5 hodiny. Aktivní FVII spolu tkáňovým faktorem tvoří na negativním fosfolipidovém buněčném povrchu na kalcium závislý komplex (tzv. vnější tenáza), který katalyzuje přeměnu FIX a FX na jejich aktivní formy (Pecka, 2004).

Nedostatek FVII lze rozdělit vrozený a získaný. Míra krvácivosti u deficitu FVII je variabilní a není vždy striktně spojena s aktivitou FVII. U heterozygotů nedochází ke krvácivým stavům. Zhruba u 3 % pacientů s nedostatkem FVII dochází k trombotické manifestaci. Nedostatek FVII s trombotickými stavy je popisován u imobilizovaných pacientů, těhotných, pacientek s orální antikoncepcí nebo u pacientů po chirurgickém zásahu (Pecka, 2004).

2.6.2.3. Faktor IX (FIX)

Faktor IX lze v literatuře nalézt pod názvem Christmas faktor. Molekulová hmotnost FIX je 55 kDa a jeho biologický poločas je 24 hodin. V plazmě se nachází v koncentraci 3 – 5 mg/l. FIX je aktivován FXIa nebo vnější tenázou. Aktivní FIX tvoří koagulačně aktivní komplex aktivující přeměnu FII na FIIa (tzv. vnitřní cestou), která dokáže aktivovat FX na jeho aktivní formu.

Deficit faktoru IX je zodpovědný za hemofilii B, což je závažné krvácivé onemocnění vázané na chromozom X. Deficit FIX lze také rozdělit na dva typy. Stejně jako v případě mutace genu pro FII i zde závisí na místě mutace, která buď způsobí krvácivé nebo trombotické stavy (Pecka, 2004).

2.6.3. Koagulační proteiny související pouze s trombózou

Mezi proteiny související pouze s trombózou se řadí protein C (PC) a protein S (PS). PC, PS a antitrombin jsou přírodní antikoagulantia. Protein C se skládá ze 461 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 62 kDa. Biologický poločas je 5 – 7 hodin. V plazmě se nachází v koncentraci 4 – 5 mg/l. Protein C je součástí tzv. systému proteinu C, kde působí současně s PS a trombomodulinem. Systém PC je klíčovou složkou přirozené antikoagulační cesty. Aktivace systému PC probíhá díky vazbě povrchu endotelových buněk trombinem navázaným k trombomodulinu. Systém C dokáže inaktivovat některé koagulační faktory např. FVIIIa a FVa. Tím dochází i k regulaci tvorby trombinu. Protein S má molekulovou hmotnost 69 kDa a jeho biologický poločas je 60 hodin. Plazmová koncentrace celkového PS je 20 – 40 mg/l u žen. U mužů je tato hodnota zhruba o 10 – 15 % vyšší. PS v přítomnosti vápenatých iontů vykazuje afinitu k fosfolipidovým povrchům (Pecka, 2004).

2.6.4. Koagulační proteiny pravděpodobně nesouvisející ani s krvácením ani s trombózou

Protein Z (PZ) pravděpodobně nesouvisí ani s krvácivými stavy ani s trombotickými stavy. PZ je jednořetězcovitý glykoprotein s molekulovou hmotností 62 kDa. PZ je syntetizován játry. Na dlouhém raménku chromozomu 13 (13q34) se nachází gen kódující tento protein. PZ se uplatňuje v degradaci aktivního FX, kde je součástí protein Z dependentní inhibiční proteázy (Girolami et al., 2018).

2.7. Prolin rich Gla protein a transmembránové Gla proteiny

Dva integrální membránové proteiny s extracelulární aminoterminální doménou, která je bohatá na Gla rezidua se nazývají prolin rich Gla protein 1 (PRGP-1) a 2 (PRGP-2). Gen pro PRGP-1 je uložen na X chromozomu, zatímco gen pro PRGP-2 se nachází na chromozomu 19. Maturovaný PRGP-1 se skládá ze 198 aminokyselinových reziduí a jeho molekulová hmotnost je 23 kDa. Tento protein se ve fetálním i dospělém období vyskytuje zejména v ledvinách. Maturovaný PRGP-2 se skládá ze 153 aminokyselinových reziduí a jeho molekulová hmotnost je 17 kDa. PRGP-2 se vyskytuje v plicích, játrech, ledvinách a slinivce (Kulman et al., 2001, 1997; Zempleni et al., 2013).

Následně byly objeveny další dva transmembránové proteiny s Gla rezidui, které se nazývají transmembránový Gla protein 3 (TMGP-3) a 4 (TMGP-4). Gen pro TMGP-3 je uložen na dlouhém raménku chromozomu X (Xq28) a gen pro TMGP-4 je uložen na krátkém raménku chromozomu 11 (11p13).

Funkce této skupiny proteinů není prozatím zcela jasná a jejich chemická konfirmace nasvědčuje tomu, že by mohly být zahrnuty v buněčné signalizaci (Erdman et al., 2012; Kulman et al., 2001; Zempleni et al., 2013).

2.8. Transtyreтин

Transtyreтин je protein, u kterého byla nedávno nalezena Gla residua, avšak role vitamínu K je u tohoto proteinu prozatím nejasná (Rüggeberg et al., 2008).

Funkce jednotlivých vitamin K dependentních proteinů souhrnně ukazuje **tabulka 5**.

Tab. 5 Funkce VKDP v organismu

Oblast	VKDP	Funkce
Hepatická	Faktor II (protrombin)	Prokoagulační
	Faktor VII	Prokoagulační
	Faktor IX	Prokoagulační
	Faktor X	Prokoagulační
	Protein C	Antikoagulační, protizánětlivá, anti-apoptická
	Protein S	Kofaktor aktivovaného proteinu C, antikoagulační, protizánětlivá,
	Protein Z	Regulace koagulace, antitrombotická
Extrahepatická	Osteokalcin	Negativní regulátor kostní formace, mechanický stabilizátor kostní matrix, regulátor glukózového metabolismu
	MGP	Inhibitor kalcifikace měkkých tkání, modulátor angiogeneze
	Gas6	Regulátor proliferace, migrace, diferenciaci, adheze a apoptózy, protizánětlivá, aktivace krevních destiček, stabilizace trombu
	GRP	Inhibitor kalcifikace měkkých tkání a zrání a růstu minerálních krystalů v krvi, protizánětlivý
	Periostin	Regulátor interakce buňka-matrix, adheze, proliferace, diferenciaci, tkáňové remodelace, účast při hojení ran, angiogenezi
	PRGP-1, PRGP-2	Nejasná, pravděpodobně signální převod
	TGMP-3, TGMP-4	Nejasná, pravděpodobně signální převod
	Transtyretin	Nejasná

3. Metody stanovení vitamínu K

Přímé stanovení vitamínu K v biologickém materiálu je vzhledem k jeho nízkým koncentracím a nízké polaritě velice obtížné. Nejpoužívanější publikované metody na stanovení tohoto vitamínu jsou metody chromatografické s použitím různých typů detektorů. Publikované metody se mezi sebou odlišují nejen rozdílným typem použitého detektoru, různým složením mobilních fází, popřípadě jejich gradientem nebo použitým vnitřním standardem, ale i především postupem přípravy vzorku. Pro přímé stanovení vitamínu K₁ je na trhu dostupná souprava od firmy Immundiagnostik, která obsahuje již připravenou mobilní fázi a vnitřní standard, který by měl být analogem vitamínu K₁. Mez detekce je v této soupravě deklarovaná na hodnotu 0,15 ng/ml. K detekci vitamínu K₁ je v tomto případě použita postkolonová redukce zinkovým prachem s fluorescenční detekcí (Immundiagnostik, 2008).

Přímé stanovení vitamínu K bylo již publikováno roku 1986, kde autoři Haroon et al. využívali kapalinovou chromatografii s fluorescenční detekcí. V této publikaci je uvedeno pouze stanovení vitamínu K₁ v plazmě. Etanolvý roztok dihydro-vitamínu K₁ byl použit jako IS (Haroon et al., 1986). Stejný typ detekce stanovení vitamínu K₁ byl publikován autory Wang et al. (2004), kteří stanovovali tento vitamin nejen v plazmě, ale i v séru. V této studii byl použit postkolonový zinkový „reaktor“. MK-6 byl testován jako IS, avšak nakonec byl použit komerčně dostupný IS od firmy Immundiagnostik (Wang et al., 2004). Autoři Paroni et al. (2009) publikovali studii, kde použili stejné složení mobilní fáze A jako Wang et al. (2004). Mobilní fázi B představoval etanol. Vnitřní standard použili komerčně dodaný od firmy Immundiagnostik (Paroni et al., 2009). V roce 2005 publikovali autoři Kamao et al. (2005) stanovení nejen vitamínu K₁, ale také dvou forem vitamínu K₂ (MK-4 a MK-7). Autorům se však nepodařilo dostatečně oddělit MK-4 a MK-7 od interferujících složek nacházejících se ve vzorku (Kamao et al., 2005). Autoři Pérez-Ruiz et al. (2007) stanovovali vitamin K₁, MK-4 a vitamin K₃ v potravinách a užívaných přípravcích (Pérez-Ruiz et al., 2007). Fluorescenční detekci využili také autoři Marinova et al. (2011). Tito autoři stanovovali vitamin K₁ a MK-4. Jako IS používali analog vitamínu K₁ (Marinova et al., 2011).

Další vhodnou analýzou je použití chemiluminiscenčního detektoru. Autoři Ahmed et al. (2007) stanovili chemiluminiscenčně vitamin K₁, MK-4 a MK-7. Bylo dosaženo uspokojivého oddělení jednotlivých vitaminů a IS. Tato metoda byla doporučena

i pro klinické měření týkající se kostního metabolismu, avšak limity detekce zde přesahují 1,4 ng/ml (Ahmed et al., 2007).

V posledních letech jsou upřednostňována stanovení různých forem vitamínu K pomocí metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) z důvodu lepší citlivosti a selektivity. Autoři Tsugawa et al. (2006) stanovovali vitamín K₁, MK-4 a MK-7 pomocí HPLC s chemickou ionizací za atmosférického tlaku s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-APCI-MS) (Tsugawa et al., 2006). V publikaci autorů Karl et al. (2014) byla popsána metoda LC-APCI-MS na stanovení vitamínu K₁ a 10 forem vitamínu K₂ (MK4 až MK-13) ve stolici. Tato metoda vykazuje nízký limit detekce (Karl et al., 2014). Metodu LC-APCI-MS využili již v roce 2008 autoři Song et al., kteří stanovovali v plazmě vitamín K₁ s publikovaným limitem detekce 0,3 ng/ml (Song et al., 2008). Autoři Riphagen et al. stanovovali pomocí LC-MS vitamín K₁, MK-4 a MK-7, kde jako vnitřní standardy byly použity izotopově značené vitamíny. Mez detekce formy MK-7 dosahuje 4,4 nmol/l (tz. 2,9 ng/ml) (Riphagen et al., 2015).

Na trhu jsou již dostupné i sendvičové imunoanalýzy pro stanovení vitamínu K. I přes uváděnou nízkou citlivost metody (10 pg/ml) a malé množství vzorku (10 µl) je hlavní nevýhodou těchto souprav nemožnost oddělení jednotlivých forem vitamínu K (MyBioSource, 2020b).

K posouzení stavu vitamínu K v organismu lze využít nepřímé stanovení tohoto vitamínu – např. imunochemickým stanovením nedostatečně karboxylovaného osteokalcinu, nedostatečně karboxylovaného defosforylovaného MGP nebo PIVKA-II. Dalším nepřímým ukazatelem pro vyšetření hladin vitamínu K je protrombinový čas nebo vyšetření polymorfismů genu komplexu vitamínu K epoxid reduktázy podjednotky 1 pomocí komerčně dostupné soupravy (Cui et al., 2003; Fusaro et al., 2017; ViennaLab, 2020).

Možnosti přímého a nepřímého stanovení hladin vitamínu K jsou uvedeny v **tabulce 6**.

Tab. 6 Přímé a nepřímé metody stanovení vitamínu K

Stanovení	Stručná charakteristika metody
A. přímé	
HPLC s UV detekcí	Vyšší limity detekce a limity kvantifikace
HPLC s fluorescenční detekcí	Nejvíce používaná metoda, lepší citlivost a selektivita než při UV detekci, postkolonová redukce práškovým zinkem
HPLC s elektrochemickou detekcí	Postkolonová redukce práškovým zinkem na hydrochinon
LC-MS/MS	Nejcitlivější metoda v současnosti
ELISA	Nízká citlivost, malé množství biologického materiálu, nemožnost oddělit jednotlivé formy vitamínu K
B. nepřímé stanovení vitamínu K	
Nedostatečně karboxylovaný osteokalcin	Také ovlivňován vitamínem D
Defosforylovaný nedostatečně karboxylovaný MGP	Neinvazivní metoda
PIVKA-II	Teoreticky vyšší hladiny při deficitu vitamínu K
Protrombinový čas	Nespolehlivý ukazatel hladin vitamínu K
Polymorfismus genu VKORC1	Důležité při léčbě kumariny

3.1. Využití stanovení vitamínu K

Stanovení vitamínu K zažívá podobně jako vitamin D v posledních letech vzestup zájmu. Náročná příprava vzorků s vitamínem K brzdí jeho nástup do rutinního režimu klinických laboratoří. Sledování hladin vitamínu K je velmi důležité při léčbě některých onemocnění, kam se například řadí malabsorpční syndromy (např. cystická fibróza, Crohnova choroba, celiakie) nebo osteoporóza.

3.1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) patří mezi autosomálně recesivní onemocnění postihující zejména dýchací a trávicí ústrojí. CF byla popsána již v roce 1938 americkou patoložkou Dorothy Andersenovou. V roce 1953 byl objeven důležitý element – zvýšená koncentrace chloridů v potu, který se mohl využívat jako diagnostický marker pro potvrzení CF. V tomto období byly však diagnostikovány pouze těžší formy CF a pacienti s CF umíraly již v předškolním věku. Výskyt CF se objevuje ve vyšší míře u indoevropské populace,

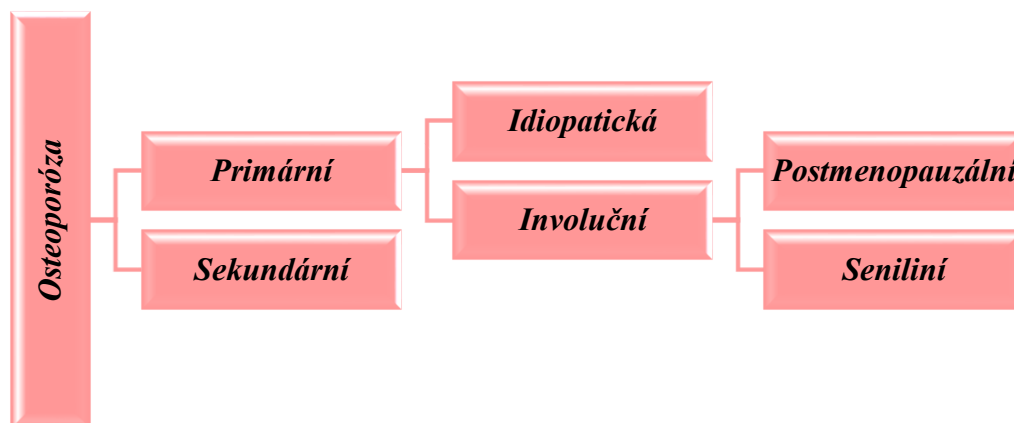
kde je počet zdravých nosičů mutované alely zhruba 3 – 4 % v celé populaci. Zatímco výskyt zdravých heterozygotů v Africe a Asii je odhadován pouze na tisícinu procenta. Prevalence CF dle novorozeneckého screeningového programu v České republice je 1:6888 narozených dětí. Díky zlepšující se kvalitě medicínské péče se nyní pacienti s CF dožívají věku okolo 35 let. Avšak i přes veškerou léčebnou snahu patří toto onemocnění mezi nevléčitelné choroby. V současné době je v České republice zaznamenáno v registru CF 736 žijících osob. Z toho je 663 pacientů postiženo klasickou formou CF. Celkem je v České republice 5 specializovaných poraden pro pacienty s CF – ve Fakultní nemocnici v Motole, Fakultní nemocnici Brno, Fakultní nemocnici Hradec Králové, Fakultní nemocnici Olomouc a Fakultní nemocnici Plzeň (CF registr, 2020; Fila, 2017; Jakubec, 2006; Skalická, 2014).

Při nedostatku lipofilních vitaminů u pacientů s CF dochází k dalším komplikacím tohoto onemocnění. Nedostatek vitaminu A u pacientů s CF způsobuje šeroslepost a má zřejmě vliv i na plicní funkce, kde mechanismus působení tohoto vitaminu není zcela jasný (Carr a Dinwiddie, 1996; Huet et al., 1997). U zhruba 40 % dospělých pacientů s CF je prokázána osteopénie a dalších 34 % trpí osteoporózou, která má v nadpoloviční většině těžký průběh. S onemocněním kostního aparátu je asociován deficit vitaminu D (Jakubec, 2006). Hematologické komplikace, jako např. oxidativní poškození erytrocytů, vznikají následkem nedostatku vitaminu E. Dlouhodobý nedostatek vitaminu E se může projevit neurologickou manifestací (např. ataxie, třesy, oftalmoplegie) zejména u starších pacientů s CF. Nedostatek vitaminu E také stojí za zhoršením imunitní odpovědi (Bye et al., 1985; Kowdley et al., 1992; Swann a Kendra, 1998).

U všech třech výše uvedených lipofilních vitaminů lze rutinně stanovit ve většině biochemických laboratořích jejich hladinu. Avšak hladiny vitaminu K se sledují u těchto pacientů přes nepřímé ukazatele jako je například protrombinový čas nebo některé nedostatečně karboxylované VKDP. U pacientů s CF je nedostatek vitaminu K v důsledku poškození střevní mikroflóry při antibiotické léčbě, nebo také v důsledku malabsorpce tuků. Nedostatek vitaminu K u této skupiny pacientů poté může vyvolat koagulopatie a podílí se na zhoršení kostních onemocněních (Mosler et al., 2003; J. W. Suttie, 1992).

3.1.2. Osteoporóza

Osteoporóza (OP) je definována dle WHO jako „*progresivní systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem kostní hmoty a poruchami mikroarchitektury kostní tkáně a následným zvýšením fragility kostí a zvýšeným rizikem zlomenin*“ (World Health Organization, 1994). Průměrně je osteoporózou ohrožena až třetina žen a pětina mužů ve věku nad padesát let. Nejohroženější skupinou jsou perimenopauzální a postmenopauzální ženy, jelikož u nich dochází k razantnímu snížení sekrece hormonu – estrogeneru. Tato razantní změna hladin hormonů zapříčiní vyšší odbourávání kosti. U mužů dochází ke snížené sekreci testosteronu. Na rozdíl od žen neprobíhá tato hormonální změna tak razantně, a proto jsou muži méně rizikováni na rozvoj osteoporózy. Osteoporóza patří mezi tzv. „tichá onemocnění“, jelikož z hlediska včasného zachytu nemoci jde o velmi závažný problém, protože osteoporóza bývá dlouhou dobu bezpříznaková. Dlouhodobé nerozpoznání onemocnění má za následek delší a náročnější léčbu pacientů (Better Health Channel, 2019; Broulík, 2009). Osteoporóza může nastat sekundárně v důsledku jiných onemocněních (např. při chronickém onemocnění ledvin nebo jater). Játra i ledviny patří mezi orgány, které jsou důležitou složkou při metabolismu jak vitamínu K, tak vitamínu D. Oba tyto lipofilní vitamíny se podílí na prevenci rozvoje osteoporózy. Primární osteoporózu lze dále dělit na idiopatickou, která probíhá bez jasné příčiny, a involuční neboli přirozenou (Broulík, 2009; National Institute of Health, 2020). Přirozená osteoporóza je dále dělena na postmenopauzální a senilní. Oba tyto typy osteoporózy postihují většinou ženy. Postmenopauzální osteoporóza postihuje pacientky ve věku 55 – 65 let. Senilní osteoporóza postihuje pacienty ve věku nad 70 let. U žen není možné jednoznačně odlišit, o jaký typ osteoporózy jde (zda postmenopauzální či senilní), jelikož postmenopauzální forma přechází do senilní (Broulík, 2009; National Institute of Health, 2020; Rosen, 2020).



Obr. 16 Klasifikace osteoporózy

U vitamínu K byl pozorován pozitivní účinek na kostní hmotu, kde působí na osteokalcin v průběhu jeho karboxylace a dále působí na zvýšení osteoblastické aktivity. Vitamin K má vliv na diferenciaci stromálních buněk transformujících se v osteoblasty, u nichž zároveň inhibuje jejich přeměnu v adipocyty. Na kostní novotvorbě se také podílí inhibicí osteoklastů, které odbourávají kostní hmotu. Hlavní formou, která má vliv na osteokalcin, je MK-7. Bylo prokázáno, že pravidelné užívání MK-7 vede ke zvýšení karboxylovaného osteokalcinu, a tím ke snížení rizika rozvoje osteoporózy. Prozatím v žádné publikaci nebylo jasně stanoveno doporučené denní dávkování pro jednotlivé formy vitamínu K (Masterjohn, 2008).

CÍLE PRÁCE

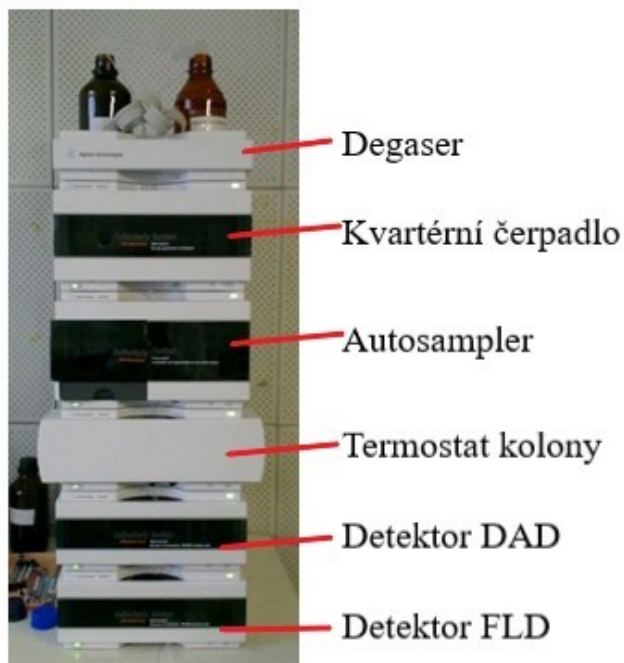
1. Stanovení vitamínu K u postmenopauzálních žen pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).
2. Vývoj a validace metody pro stanovení tří forem vitamínu K pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).
3. Stanovení vitamínu K u zdravé populace a vytvoření referenčního rozmezí pro jednotlivé formy vitamínu K.
4. Vliv užívání vitamínu K₂ na sérové hladiny vitamínu K a na kostní hmotu.
5. Stanovení hladin vitamínu K a proteinu indukovaného nedostatkem vitamínu K (PIVKA-II) u dětských pacientů s cystickou fibrózou a porovnání těchto výsledků se zdravou populací.
6. Porovnání stanovení koncentrací vitamínu K pomocí metod HPLC a LC-MS/MS.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Materiál a přístroje

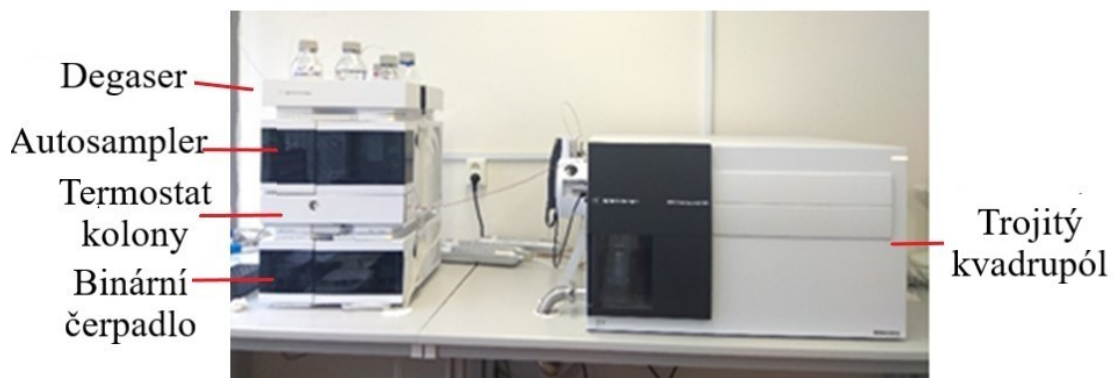
4.1. Přístroje

HPLC sestava Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA)



Obr. 17 HPLC sestava Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA)

C sestava Agilent 1290 a trojitý kvadрупól (TripleQuad Agilent 6470, Agilent Technologies, USA)



Obr. 18 LC sestava Agilent 1290 s detektorem 6470 – trojitý kvadрупól (Agilent Technologies, USA)

- Analytické váhy (Adventurer™Pro)
- Centrifuga MPW - 260R (MPW Med. instrument)
- Sušička s přívodem dusíku (Ecom)
- Třepačky (Velp, Scientifica; LT2)
- Výrobek superčisté vody pro LC (TKA – Smart2Pure, Německo)
- Zařízení pro extrakci vzorků na pevné fázi (Sigma-Aldrich)

4.2. Ostatní materiál

- automatické pipety BIOHIT
- špičky k pipetám
- skleněné pipety
- vialky
- skleněné inserty
- laboratorní sklo (zkumavky, odměrné válce,...)
- kolony pro vitamin K:
 - LiChroCART® 125 – 4, RP 18, Superspher® 100 (Merck) – pro HPLC
 - SB-C8, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm (Agilent Technologies) – pro LC-MS/MS
- postkolonový reaktor pro vitamin K – pro HPLC
- SPE kolony Sep-Pak Waters®
- Soupravy pro stanovení ostatních analytů:
 - Nedostatečně karboxylovaný osteokalcin – ELISA (TaKaRa, Japonsko)
 - PIVKA-II
 - automatizovaná CMIA (Abott, USA)
 - ELISA (MyBioSource, USA)
 - MGP – (MyBioSource, USA)
 - nedostatečně karboxylovaný MGP – (MyBioSource, USA)

4.3. Ostatní programy

- GraphPad 8.0. (statistický program)
- ChemSketch (pro nákresy molekul)
- R statistika (statistický program)

- UniProt (databáze proteinů)
- Zotero (citační program)

4.4. Reagencie pro HPLC

- 2-propanol (Sigma-Aldrich)
- acetonitril (Sigma-Aldrich)
- dietyleter (Sigma-Aldrich)
- dichlormetan (Sigma-Aldrich)
- etylalkohol (Penta)
- fylochinon – K₁ (TRC Canada)
- hexan (Sigma-Aldrich)
- chlorid zinečnatý (Merck)
- kyselina octová (Penta)
- menachinony – MK-4 a MK-7 (TRC Canada)
- metanol (Sigma-Aldrich)
- octan sodný (Penta)
- octan zinečnatý (Sigma-Aldrich)
- vitamin K₁ HPLC (Immundiagnostik)
 - INT STD (vnitřní standard)
 - CTRL 1 (kontrola 1)
 - CTRL 2 (kontrola 2)
- zinek, prášek 99,995 % (Sigma-Aldrich)

4.5. Reagencie pro LC-MS/MS

- 2-propanol pro LC-MS/MS (Honeywell)
- acetonitril pro LC-MS/MS (Honeywell)
- dietyleter pro LC-MS/MS (Honeywell)
- etylalkohol (Penta)
- fylochinon – K₁ (TRC Canada)
- hexan pro LC-MS/MS (Honeywell)
- izotopově značené vnitřní standardy fylochinon-d7 – K₁-d7 (TRC Canada)
- izotopově značený vnitřní standard menachinon-4-d7 – MK-4-d7 (TRC Canada)

- izotopově značený vnitřní standard menachinon-7-d7 – MK-7-d7 (TRC Canada)
- menachinony – MK-4 a MK-7 (TRC Canada)
- metanol pro LC-MS/MS (Honeywell)

4.6. Sběr vzorků a soubor pacientů

Všechny vzorky krve byly odebírány do červených zkumavek s akcelerátorem srážení (Vacuette, Německo) a zkumavky byly chráněny proti působení světla zabalením do aluminiové fólie. Centrifugace vzorků probíhala při 3727 g po dobu 10 minut. Po centrifugaci bylo získané sérum přeneseno do mikrozkušavek a zamraženo na -70 °C. Mikrozkušavky bylo nutno chránit před působením světla.

Vitamin K byl stanovován dvěma metodami (HPLC a LC-MS/MS) u různých skupin pacientů. Metodou HPLC bylo naměřeno celkem 350 vzorků pacientů, které byly rozděleny do dvou skupin – postmenopauzální ženy bez prokázané osteoporózy a pacienti s osteoporózou.

Metodou LC-MS/MS bylo naměřeno celkem 950 vzorků. Tento soubor byl složen z pacientů s osteoporózou, pacientů bez prokázané osteoporózy, pacientů s osteopénií, pacientů s cystickou fibrózou a zdravé populace.

V *tabulce 7* je uvedena základní charakteristika souboru pacientů.

Tab. 7 Základní charakteristika souboru pacientů

Metoda stanovení	Skupina	Věk (průměr ± SD)	Počet účastníků	Ženy (%)
HPLC	Postmenopauzální ženy s OP	67,6 ± 7,7	192	100
	Postmenopauzální ženy bez OP	64,6 ± 8,3	158	100
LC-MS/MS	Pacienti s OP	66,3 ± 7,9	149	100
	Pacienti bez OP	53,6 ± 18,4	318	80
	Zdraví dobrovolníci - referenční meze	51,2 ± 16,2	191	78
	Pacienti s CF	10,0 ± 5,5	252	60
	Zdraví dobrovolníci - Femoralex forte	27,2 ± 6,1	19	58
	Pacienti s osteopénií - Vigantol + Ca	58,2 ± 6,1	11	100
	Pacienti s osteopénií - Femoralex + Ca	59,1 ± 8,4	10	100

5. Metody a příprava reagensů pro HPLC

5.1. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze (MF) pro stanovení vitaminů K na sestavě HPLC dle firmy Craft Technologies Inc. (Craft a Park, 2011) se skládala z 85 % metanolu, 9 % 2-propanolu, 5 % acetonitrilu a 1 % roztoku v metanolu (10 mmol/l chlorid zinečnatý, 5 mmol/l octan sodný a 5 mmol/l kyseliny octové).

5.2. Příprava zásobních roztoků

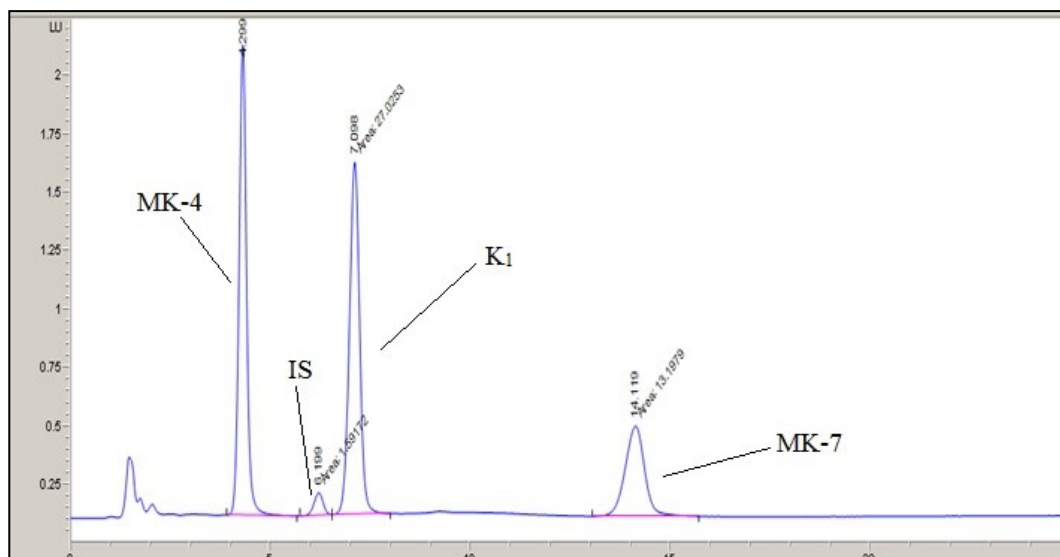
Standardy vitaminů K₁ i K₂ (forma MK-4 a MK-7) byly dodány firmou TRC Canada. Vitamin K₁ byl kvantitativně naředěn v etanolu do koncentrace 200 µg/ml. Vitaminy K₂ (MK-4 i MK-7) v podobě žlutých prášků byly rozpuštěny v etanolu a připraveny do koncentrace 200 µg/ml. Všechny tři roztoky (vitamin K₁, MK-4 a MK-7) byly ředěny do výsledné koncentrace 200 ng/ml.

5.3. Příprava vzorků pro analýzu

Pro stanovení hladin vitaminů K pomocí metody HPLC byla použita příprava vzorku dle publikace autorů Marinova *et al.* (Marinova et al., 2011). K 500 μ l séra bylo přidáno 20 μ l vnitřního standardu (IS), komerčně dodaného firmou Immundiagnostik, a 2 ml etanolu. Vzorek byl promíchán na třepačce po dobu 30 vteřin. Poté byly ke vzorku přidány 4 ml hexanu a vzorek se opět extrahoval po dobu 5 minut. Po extrakci byl vzorek přemístěn do centrifugy, kde byl stočen při 3727 g po dobu 10 minut při 4 °C. Po stočení byl supernatant přenesen do čistých skleněných zkumavek a zbylé množství vzorku bylo opět extrahováno s dalšími 4 ml hexanu. Po druhé extrakci a stočení vzorků byly druhé získané supernatanty spojeny s prvními. Supernatanty byly vysušeny pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Vysušené vzorky byly rozpuštěny ve 2 ml hexanu. Byla provedena extrakce na pevné fázi (SPE). SPE kolonky byly aktivovány 3 x 3 ml hexanu. Na aktivované kolonky byl aplikován rozpuštěný vzorek a 2 ml hexanu. Poté bylo na kolonky aplikováno opět 3 x 3 ml hexanu. Vzorek byl eluován pomocí 3 x 3 ml 3% dietyléteru v hexanu (v/v). Vzorek byl vysušen proudem dusíku při 50 °C. Vysušené vzorky byly rozpuštěny v 65 μ l 2-propanolu a nastříkovány na kolonu.

5.4. Chromatografická analýza vzorků

Chromatografická analýza pomocí HPLC probíhala při 246 nm excitační a 430 nm emisní vlnové délce. Kolona byla temperována na 22 °C. MF dosahovala průtoku 0,8 ml/min. Analýza vzorku trvala 20 minut. Objem vzorku nástřiku na kolonu činil 50 μ l. Forma MK-4 byla eluována ve 4. minutě analýzy, IS v 6. minutě analýzy, K₁ v 7. minutě analýzy a forma MK-7 ve 14. minutě analýzy. Na **obrázku 19** je vidět chromatografický záznam analýzy s píky jednotlivých vitaminů a píkem komerčně dodaného IS.



Obr. 19 Analýza směsi standardů vitamínu K pomocí HPLC

6. Metody a příprava reagentů pro LC-MS/MS

6.1. Příprava mobilní fáze

Na sestavě LC-MS/MS byl použit gradient mobilních fází. MF A se skládala z 50% LC-MS/MS metanolu s příměsí 0,1% roztoku NH_4F (1 M) a MF B byla tvořena 100% LC-MS/MS metanolem s příměsí 0,1% roztoku NH_4F (1 M).

6.2. Příprava zásobních roztoků

Izotopově značené standardy $\text{K}_1\text{-d}_7$, MK-4-d_7 a MK-7-d_7 byly dodány firmou TRC Canada. Všechny tři standardy byly ředěny etanolem do výsledné koncentrace 500 ng/ml. Zásobní standardy vitamínu K_1 , MK-4 a MK-7 byly připraveny stejným způsobem jako při přípravě zásobních standardů vitamínu K pro stanovení metodou HPLC (viz *kapitola 5.2.*)

6.3. Příprava vzorků pro analýzu

Pro stanovení hladin vitamínů K pomocí LC-MS/MS byla použita stejná příprava vzorku jako při přípravě vzorků s vitamínem K pro HPLC, která se lišila pouze množstvím a

typem IS. Při stanovení hladin vitamínu K metodou LC-MS/MS byly použity izotopově značené IS v množství 10 µl od každé stanovované formy vitamínu K.

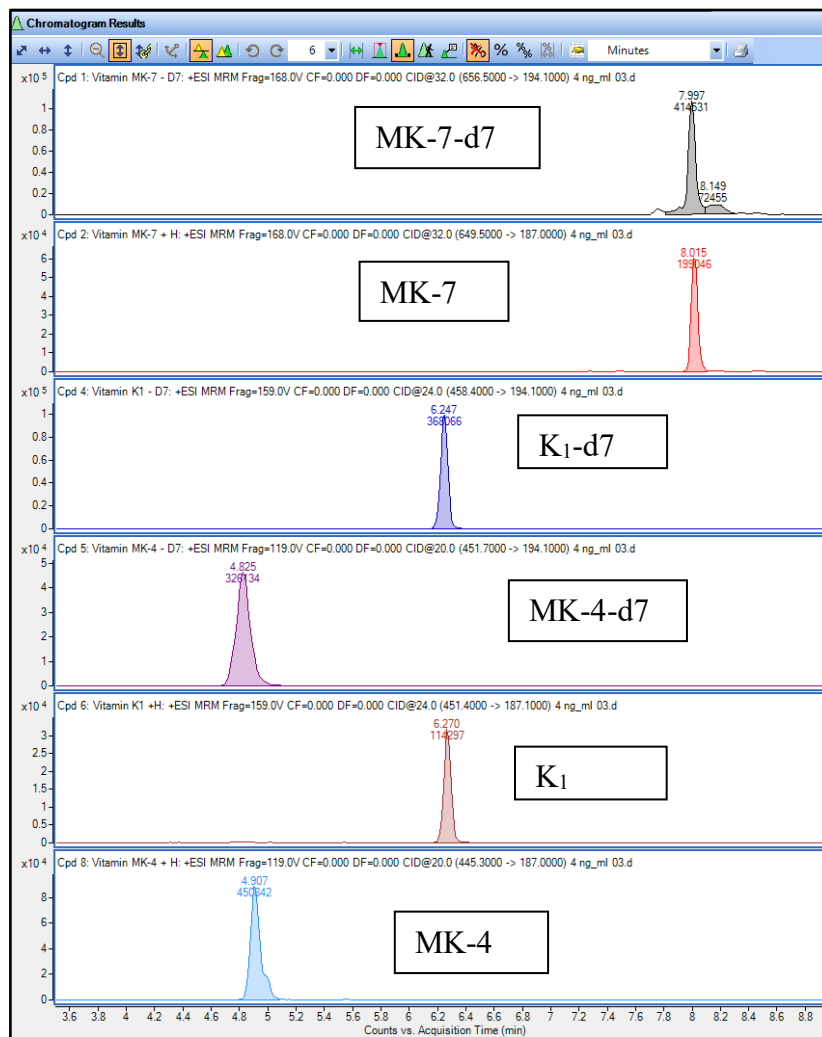
6.4. Chromatografická analýza vzorků

Chromatografická analýza pomocí LC-MS/MS probíhala na koloně SB-C8, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm (Agilent Technologies) při 30 °C. Byl použit gradient MF s průtokem 0,4 – 0,6 ml/min. Gradient MF je uveden v *tabulce 8*.

Tab. 8 Gradient mobilních fází

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)	Průtok (ml/min)
0	15	85	0,40
1	15	85	0,40
8	0	100	0,40
9	0	100	0,50
9,1	0	100	0,60
11,5	0	100	0,60

Analýza vzorku trvala 9 minut. Objem vzorku nástřiku na kolonu činil 5 µl. Forma MK-4 a jeho izotopově značený standard (MK-4-d7) byl eluován v 5. minutě analýzy, vitamín K₁ a jeho izotopově značený standard (K₁-d7) v 6. minutě a forma MK-7 a jeho izotopově značený standard (MK-7-d7) v 8. minutě. Na *obrázku 20* vidíme píky jednotlivých vitamínů a jejich izotopově značených standardů.



Obr. 20 Analýza směsi standardů vitamínu K pomocí LC-MS/MS

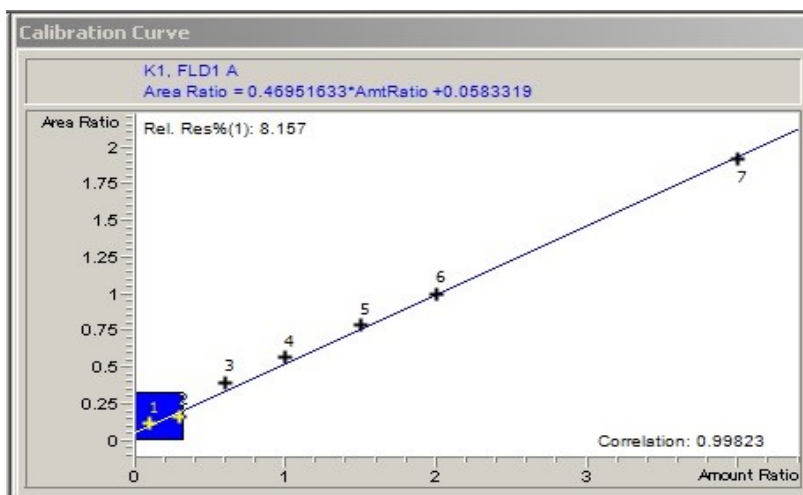
VÝSLEDKY A DISKUZE

7. Metoda HPLC

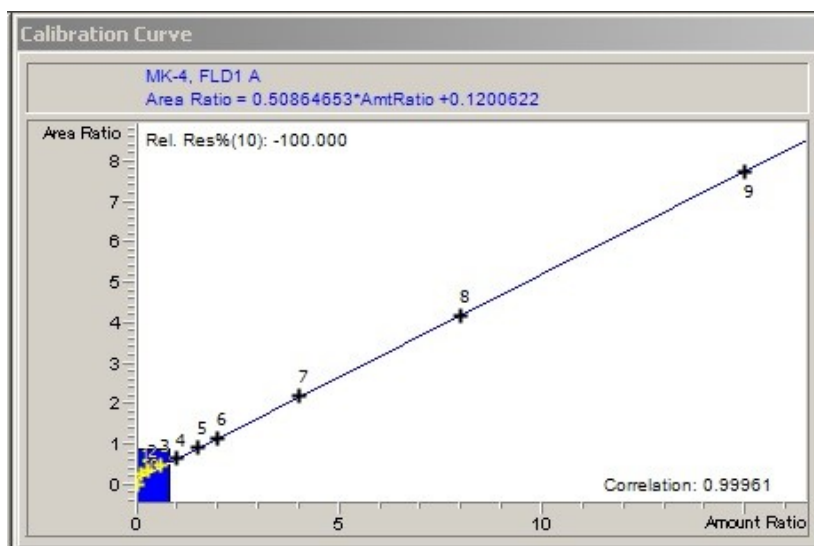
Stanovení tří forem vitamínu K za pomoci HPLC bylo prováděno na přístroji Agilent 1260 s fluorescenčním detektorem (FLD) a s využitím postkolonové redukce zinkovým prachem. V této metodě byl používán komerčně dodaný vnitřní standard, který je analogem vitamínu K₁ od firmy Immundiagnostik GA (Německo). Z tohoto důvodu bylo nutné dostatečně chromatograficky separovat pík IS od píku vitamínu K₁. Parametry chromatografické analýzy včetně retenčních časů jednotlivých analytů jsou uvedeny v *kapitole 5.4*. Příprava vzorků pro stanovení vitamínu K je uvedena v *kapitole 5.3*.

7.1. Kalibrace

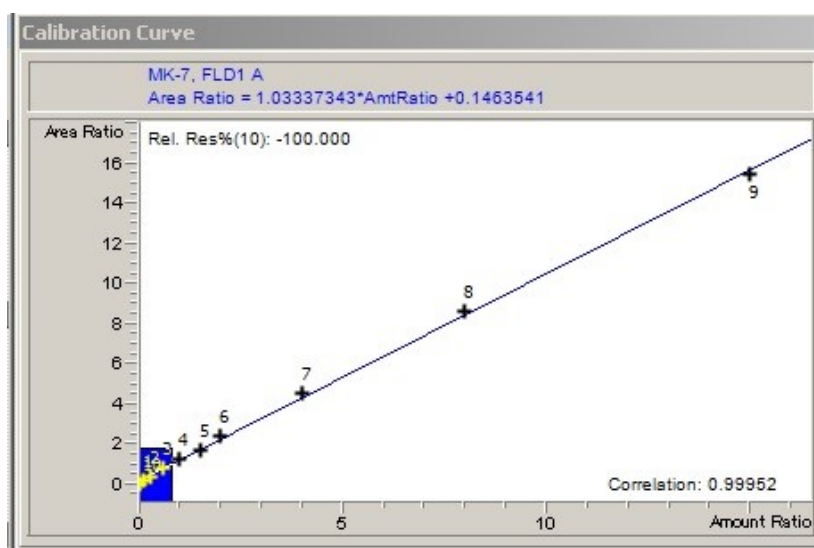
Pro kvantitativní stanovení vitamínu K₁ byla připravena osmi bodová kalibrace. Pro kvantitativní stanovení vitamínů K₂ byla připravena deseti bodová kalibrace. Všechny kalibrační body byly připraveny v dubletu ze zásobního standardního roztoku všech forem vitamínu K. Kalibrační roztoky pro vitamín K₁ byly v následujících koncentracích: 0; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0 a 4,0 ng/ml. Kalibrační roztoky pro vitaminy K₂ (MK-4 a MK-7) byly ve stejných koncentracích jako kalibrační roztoky pro vitamín K₁ navíc rozšířené o 2 následující koncentrace: 8,0 a 15,0 ng/ml. Všechny kalibrační křivky vitamínu K byly lineární v celém testovaném rozsahu. Pro výpočet koncentrace vitamínu K₁ byla použita rovnice regrese $y = 0,4615 \cdot x + 0,0583$, u výpočtu koncentrace vitamínu MK-4 byla použita rovnice regrese $y = 0,5086 \cdot x + 0,1201$ a pro výpočet koncentrace MK-7 byla použita rovnice regrese $y = 1,0334 \cdot x + 0,1464$, kde x představuje koncentraci stanovovaného vitamínu a y uvádí poměr ploch píku stanovovaného vitamínu ku komerčně dodanému IS. Hodnoty regresních koeficientů jsou 0,9982 pro vitamín K₁, 0,9961 pro MK-4 a 0,9995 pro MK-7. **Obrázky 21 - 23** ukazují jednotlivé kalibrační křivky. Modře ohraničené obrazce označují nejnižší kalibrační bod.



Obr. 21 Kalibrační křivka vitamínu K_1



Obr. 22 Kalibrační křivka menachinonu-4 (vitamin K_2)



Obr. 23 Kalibrační křivka menachinonu-7 (vitamin K_2)

7.2. Opakovatelnost měření

Opakovatelnost je definována jako přesnost měření vzorků v sérii za podmínek opakovatelnosti. Podmínky opakovatelnosti jsou: příprava vzorků stejnou osobou, měření vzorků na stejném přístroji, stejnou obsluhou a za stejných podmínek v rámci jednoho dne. V této disertační práci byla opakovatelnost metody stanovena na sérii kontrol kvality na dvou koncentračních hladinách. Série obsahovala 15 vzorků od každé kontroly kvality. Nízká hladina kontroly byla připravena v koncentraci 0,5 ng/ml pro jednotlivé formy vitamínu K a vysoká hladina kontroly byla připravena v koncentraci 1,5 ng/ml pro jednotlivé formy vitamínu K. Z výsledků byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka výběrová (SD), variační koeficient (CV) a bias. Směrodatná odchylka představuje míru rozptylu hodnot od střední hodnoty, to znamená, čím je SD nižší, tím je měření preciznější. Variační koeficient je podíl SD a průměrné hodnoty měření. Hodnota CV by neměla přesáhnout 15 % (European Medicines Agency, 2011). Na nízké hladině kontroly bylo dosaženo hodnot CV 6,8 % pro K₁, 8,3 % pro MK-4 a 9,3 % pro MK-7. Na vysoké hladině kontroly bylo dosaženo hodnot CV 7,8 % pro K₁, 8,5 % pro MK-4 a 6,4 % pro MK-7. Výsledky opakovatelnosti uvedené v **tabulce 9** odpovídají požadavkům úspěšné validace.

Tab. 9 Opakovatelnost stanovení vitamínu K pomocí HPLC

Název	Nízká kontrola (0,5 ng/ml)			Vysoká kontrola (1,5 ng/ml)		
	Pořadí	K ₁	MK-4	MK-7	K ₁	MK-4
1	0,54	0,61	0,55	1,39	1,65	1,45
2	0,51	0,56	0,48	1,54	1,66	1,51
3	0,54	0,57	0,54	1,62	1,66	1,46
4	0,52	0,55	0,55	1,54	1,62	1,65
5	0,46	0,54	0,57	1,67	1,68	1,64
6	0,47	0,43	0,43	1,54	1,62	1,66
7	0,57	0,5	0,59	1,38	1,38	1,45
8	0,48	0,5	0,5	1,65	1,34	1,66
9	0,47	0,49	0,49	1,59	1,38	1,51
10	0,56	0,47	0,52	1,42	1,42	1,64
11	0,48	0,53	0,49	1,58	1,44	1,58
12	0,5	0,55	0,49	1,38	1,45	1,65
13	0,51	0,52	0,46	1,69	1,41	1,65
14	0,54	0,54	0,56	1,67	1,41	1,38
15	0,53	0,53	0,59	1,35	1,39	1,47
Průměr	0,51	0,53	0,52	1,53	1,50	1,56
SD	0,03	0,04	0,05	0,12	0,13	0,10
CV (%)	6,8	8,3	9,3	7,8	8,5	6,4
Bias (%)	5,2	5,2	4,1	2,3	0,0	3,8

7.3. Reprodukovatelnost měření

Stanovení reprodukovatelnosti představuje měření série vzorků za podmínek reprodukovatelnosti. Podmínky reprodukovatelnosti vznikají porušením jedné z podmínek opakovatelnosti. V této disertační práci byla reprodukovatelnost měřena sérií 15 kontrolních vzorků na dvou koncentračních hladinách obdobně jako u opakovatelnosti měření. Byly připraveny kontrolní vzorky v koncentracích pro jednotlivé formy vitamínu K: 0,5 ng/ml pro nízkou kontrolu kvality a 1,5 ng/ml pro vysokou kontrolu kvality. Všechny vzorky pro stanovení reprodukovatelnosti byly připraveny v jeden den a uloženy do hlubokomrazicího boxu při cca -70 °C. Reprodukovatelnost této metody byla stanovována v různé dny. Každý den byl měřen jeden vzorek nízké a jeden vzorek vysoké kontroly kvality. Ostatní podmínky měření (stejný analyzátor, stejná obsluha) byly zachovány. Z výsledků byl jako v případě opakovatelnosti vypočítán průměr, SD, CV a bias. V *tabulce 10* jsou uvedeny všechny naměřené hodnoty a vypočítané parametry.

Pro nízkou hladinu kontroly bylo dosaženo hodnot CV 9,2 % pro K₁, 9,7 % pro MK-4 a 9,7 % pro MK-7. Pro vysokou hladinu kontroly bylo dosaženo CV 9,2 % pro K₁, 9,3 % pro MK-4 a 8,7 % pro MK-7. Vypočítané parametry splňují podmínky úspěšné validace metody.

Tab. 10 Reprodukovatelnost stanovení vitamínu K pomocí HPLC

Název	Nízká kontrola (0,5 ng/ml)			Vysoká kontrola (1,5 ng/ml)		
Pořadí	K ₁	MK-4	MK-7	K ₁	MK-4	MK-7
1	0,51	0,44	0,55	1,67	1,65	1,49
2	0,49	0,45	0,55	1,35	1,33	1,51
3	0,47	0,53	0,45	1,57	1,68	1,45
4	0,46	0,44	0,45	1,39	1,7	1,47
5	0,45	0,44	0,47	1,42	1,34	1,45
6	0,43	0,51	0,47	1,5	1,41	1,48
7	0,57	0,48	0,56	1,61	1,65	1,68
8	0,56	0,47	0,55	1,43	1,54	1,73
9	0,55	0,46	0,49	1,38	1,62	1,72
10	0,57	0,45	0,58	1,69	1,61	1,74
11	0,56	0,56	0,48	1,73	1,41	1,74
12	0,57	0,5	0,53	1,71	1,67	1,69
13	0,54	0,56	0,58	1,46	1,37	1,44
14	0,52	0,57	0,46	1,41	1,4	1,45
15	0,53	0,46	0,57	1,35	1,39	1,38
Průměr	0,52	0,49	0,52	1,51	1,52	1,56
SD	0,05	0,05	0,05	0,14	0,14	0,14
CV (%)	9,2	9,7	9,7	9,2	9,3	8,7
Bias (%)	3,7	2,4	3,2	0,8	1,2	4,1

7.4. Pravdivost měření (bias)

Pravdivost měření ukazuje těsnost shody mezi střední hodnotou výsledků měření a přijatou referenční hodnotou. Mírou pravdivosti je bias, který odhaduje hodnotu systematické chyby měření. Hodnota bias byla vypočtena jak pro opakovatelnost, tak pro reprodukovatelnost měření, a je uvedena v *tabulkách 9 a 10*. Za střední referenční hodnotu je považována hodnota 0,5 ng/ml pro nízkou kontrolu kvality a 1,5 ng/ml pro vysokou kontrolu kvality.

Vypočítané hodnoty bias u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti nepřesahují u žádného stanovaného vitamínu hodnotu 10 %, a proto splňují podmínky úspěšné validace.

7.5. Mez detekce

Mez detekce (LOD – z angl. limit of detection) je vyjádřena jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno a kdy je analytický signál dostatečně odlišitelný od šumu. Mez detekce se zjišťuje analýzou tzv. blanku tvořeného sérem bez obsahu vitamínu K, ale s obsahem vnitřního standardu. U blanků byla odečtena výška píku šumu a byla vypočtena průměrná hodnota píků šumu. Mez detekce se počítá z níže uvedeného vzorce z osmi nebo deseti bodové kalibrační křivky. Vzorec pro výpočet LOD je uveden níže:

$$LOD = \frac{3 \cdot h}{b_1}$$

kde h odpovídá výšce píků šumu blanků a b_1 představuje směrnici kalibrační přímky, kdy b_1 musí vycházet z koncentrační závislosti $y = b_1 \cdot x$, kde y je výška chromatografického píku analytu.

Mez detekce byla stanovována z pěti blanků, které byly připraveny stejným postupem jako patientské vzorky. U těchto pěti vzorků byla odečtena výška píku šumu, který byl v retenčním čase jako stanovaný vitamín. Výška píku šumu je vyjádřena v luminiscenčních jednotkách (LU, z angl. *luminescence unit*). V **tabulce 11** je uveden vypočítaný průměr výšek píků pěti blanků. Námi stanovená mez detekce byla pro vitamín K₁ 0,0103 ng/ml, pro MK-4 0,0140 ng/ml a pro MK-7 0,0100 ng/ml.

Tab. 11 Výška píků šumu blanků

Výška píků šumu blanků (LU)			
Vzorek	K ₁	MK-4	MK-7
1	0,0016	0,0012	0,0014
2	0,0011	0,0012	0,0012
3	0,0010	0,0011	0,0012
4	0,0010	0,0013	0,0010
5	0,0014	0,0012	0,0013
Průměr	0,0012	0,0012	0,0012
3.h	0,0036	0,0037	0,0036

7.6. Mez kvantifikace

Mez kvantifikace (LOQ – z angl. limit of quantification) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení s dostatečnou přesností. Opakovatelnost pro mez kvantifikace vyjádřené pomocí CV by neměla přesáhnout hodnotu 20 % (European Medicines Agency, 2011). Pro výpočet meze kvantifikace byl použit vzorec:

$$LOQ = 3.LOD$$

Limity kvantifikace byly pro vitamin K₁ 0,03 ng/ml, pro MK-4 0,04 ng/ml a pro MK-7 0,03 ng/ml.

7.7. Výtěžnost metody

Výtěžnost metody (z angl. recovery) udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě. Výtěžnost u vitaminu K₁ dosahovala hodnot 100,7 – 104,0 %. Výtěžnost u vitaminu K₂ dosahovala hodnot 98,0 – 106,0 % pro MK-4 a 104,0 – 104,1 % pro MK-7.

Hodnoty výtěžnosti by se měly pohybovat v rozmezí 90 – 110 %, tudíž naše hodnoty výtěžnosti splňují podmínky pro úspěšnou validaci.

7.8. Robustnost metody

Robustnost metody charakterizuje, jak je vzorek citlivý na změny podmínek v postupu nebo analýze. Za změny podmínek postupu lze považovat např. vystavení vzorku slunečnímu svitu, skladování při různých teplotách a jiné. Robustnost demonstruje, jak je metoda spolehlivá při běžném používání. V této disertační práci testována stabilita skladovaných vzorků při třech různých teplotách. Stanovení vitamínu K v tomto pokusu bylo prováděno na tzv. směsném patientském vzorku, který byl rozdělen do deseti zkumavek. Všechny deset zkumavek bylo chráněno před působením světla. Tři zkumavky směsného patientského vzorku byly skladovány v lednici při teplotě cca 4 °C po dobu sedmi dnů. Další tři zkumavky směsného patientského vzorku byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C po dobu sedmi dnů a poslední tři zkumavky byly skladovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě cca -70 °C po dobu tří měsíců. U směsného patientského vzorku byla nejprve stanovena počáteční hladina jednotlivých forem vitamínu K. Vzorky uskladněné v lednici a mrazicím boxu byly měřeny po dvou, pěti a sedmi dnech. Vzorky uskladněné v hlubokomrazicím boxu byly měřeny po jednom, dvou a třech měsících. V *tabulkách 12 – 14* jsou uvedeny naměřené hodnoty v daných dnech či měsících. Z naměřených hodnot byla vypočítaná procentuální změna oproti původní hodnotě vzorku.

Z naměřených hodnot v *tabulce 12* je na první pohled patrné, že skladování v lednici při teplotě cca 4 °C způsobuje po sedmi dnech výrazný pokles hladin zejména u MK-4, kde byly hladiny sníženy oproti původní hodnotě o 52 %. Druhý nejvyšší pokles po sedmi dnech byl zaznamenán u MK-7, kde došlo ke snížení o 23 % oproti vstupní hodnotě. Nejmenší rozdíl je doložen u vitamínu K₁, kde došlo ke snížení o 17 % oproti původní hodnotě.

Tab. 12 Koncentrace vitamínů K skladovaného při cca 4 °C

Vzorky skladované při cca 4 °C						
čas (dny)	K ₁ (ng/ml)	K ₁ δ (%)	MK-4 (ng/ml)	MK-4 δ (%)	MK-7 (ng/ml)	MK-7 δ (%)
0	1,051	100,0	1,004	100,0	1,320	100,0
2	1,029	97,9	0,864	86,1	1,242	94,1
5	0,927	88,2	0,658	65,5	1,131	85,7
7	0,874	83,2	0,486	48,4	1,016	77,0

Tabulka 13 ukazuje stabilitu jednotlivých forem vitamínu K při uchování vzorku při cca -20 °C. Největší rozdíl mezi původní a měřenou hladinou byl prokázán u formy MK-7 po sedmi dnech, kdy došlo ke snížení hladiny zhruba o 25 % oproti původní hodnotě. Ostatní dvě formy vitamínu K byly po sedmi dnech sníženy o 12 % u K₁ a 19 % u MK-4.

Tab. 13 Koncentrace vitamínů K skladovaného při cca -20 °C

Vzorky skladované při cca -20 °C						
čas (dny)	K ₁ (ng/ml)	K ₁ δ (%)	MK-4 (ng/ml)	MK-4 δ (%)	MK-7 (ng/ml)	MK-7 δ (%)
0	1,051	100,0	1,004	100,0	1,320	100,0
2	0,971	92,4	0,942	93,8	1,234	93,5
5	0,943	89,7	0,881	87,7	1,143	86,6
7	0,923	87,8	0,813	81,0	1,002	75,9

Při skladování v hlubokomrazicím boxu po dobu tří měsíců nedochází k žádným výrazným změnám oproti vstupním hladinám jednotlivých forem vitamínu K, což dokládá **tabulka 14**. U všech forem vitamínu K nedošlo k většímu poklesu hladin než 1 %. Z tohoto důvodu je vhodné skladovat vzorky k analýze při -70 °C a dostatečně je chránit před světlem např. aluminiovou fólií.

Tab. 14 Koncentrace vitamínů K skladovaného při cca -70 °C

Vzorky skladované při cca -70 °C						
čas (měsíce)	K ₁ (ng/ml)	K ₁ δ (%)	MK-4 (ng/ml)	MK-4 δ (%)	MK-7 (ng/ml)	MK-7 δ (%)
0	1,051	100,0	1,004	100,0	1,320	100,0
1	1,029	97,9	1,002	99,8	1,320	100,0
2	1,000	95,1	1,000	99,6	1,318	99,8
3	1,045	99,4	0,996	99,2	1,311	99,3

7.9. Shrnutí validace HPLC metody

Podarilo se úspěšně vyvinout a validovat HPLC metodu na stanovení vitamínu K₁ a dvou forem vitamínu K₂ (MK-4 a MK-7). Tato metoda disponuje nízkým LOQ, což je velmi důležité pro stanovení těchto vitamínů. Některé odborné publikace, které se zabývají stejným typem použité metody a stanovením těchto forem vitamínu K, nedosahují takových validačních parametrů jako tato metoda. Dlouhá doba analýzy, která je popsána v publikaci autorů Kamao *et al.* (Kamao *et al.*, 2005), ztěžuje použití stanovení těchto vitamínů v rutinním režimu klinických laboratoří. Autoři Marinova *et al.* (Marinova *et al.*, 2011), od kterých se odvíjí naše příprava vzorků s vitamínem K, se dostali na podobné LOQ u vitamínu K₁ a MK-4. Tito autoři ovšem nestanovovali formu MK-7, která patří mezi nejdůležitější formu vitamínu K. Místo FLD lze také využít ve spojení s HPLC chemiluminiscenční detekcí. HPLC s chemiluminiscenční detekcí byla využita v publikaci autorů Ahmed *et al.* (Ahmed *et al.*, 2007), kde stanovovali stejné formy vitamínu K jako my. Avšak jejich LOQ pro jednotlivé formy vitamínu K výrazně přesahují 1,0 ng/ml, což je velká nevýhoda pro rutinní stanovování těchto forem vitamínu K. Další výraznou nevýhodou této metody je vyšší spotřeba biologického materiálu a delší doba analýzy oproti naší metodě.

8. Metoda LC-MS/MS

Stanovení jednotlivých forem vitamínu K pomocí metody LC-MS/MS by mělo být citlivější a přesnější z důvodů použití izotopově značených standardů pro každou stanovovanou formu vitamínu K a nižší míry interference ve vzorku. Tyto izotopově značené standardy minimalizují případné chyby či změny v průběhu extrakce vzorku. Chromatografické podmínky včetně použité kolony jsou popsány v *kapitole 6*.

Z ionizačních módů byla zvolena elektrosprejová ionizace v pozitivním módu (AJS ESI+, z angl. *Agilent Jet Stream with electrospray ionization*) s parametry iontového zdroje: teplota sušícího plynu 340 °C, průtok sušícího plynu 8 l/min. Dusík byl použit jako kolizní plyn. Nebulizer byl nastaven na 28 psi, teplota přídavného plynu 380 °C a průtok přídavného plynu 12 l/min. Vyhodnocování bylo prováděno pomocí softwaru MassHunter, verze A 00.08.24 (Agilent Technologies). Byl také testován jiný druh ionizace (ionizace za atmosférického tlaku, APCI) vzhledem k povaze analytu (menší polarita). Avšak zvolená ionizace za atmosférického tlaku vykazovala mnohem nižší

senzitivitu než ESI+. Ke kvantifikaci byla použita vysoce specifická a senzitivní metoda vyhodnocování – dynamická multiplexní analýza (dMRM, z angl. *Dynamic Multiple Reaction Monitoring*), kdy analytický systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Principem dMRM módu je izolace specifického analytu (stanovované látky) definovaného pomocí hmotnosti a náboje (m/z) na prvním kvadrupólu, jeho podrobení srážkově-indukované disociaci (CID) v kolizní cele na druhém kvadrupólu a detekci produktového iontu definovaného pomocí m/z na posledním z trojitého kvadrupólu.

Tabulka 15 ukazuje detekci izotopově značených standardů a vitaminů K na kvantifikačních a konfirmačních přechodech včetně retenčních časů (RT) a kolizní energie.

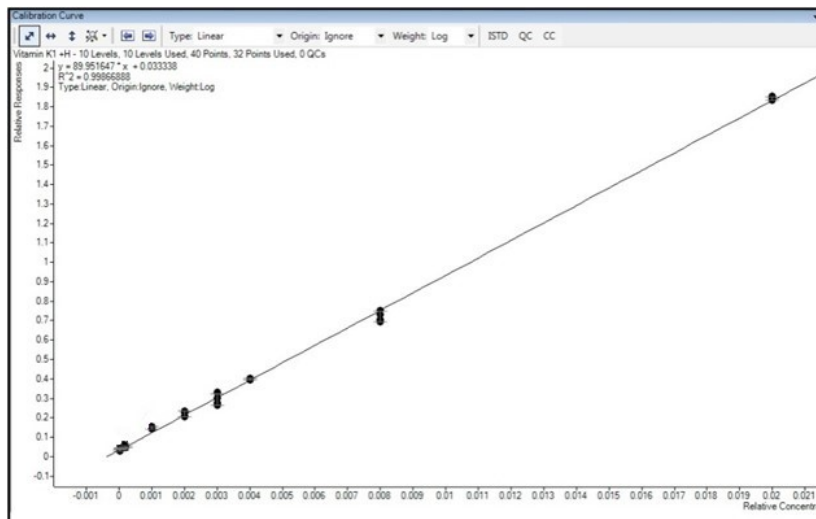
Tab. 15 Kvantifikační a konfirmační přechody forem vitaminu K (kvantifikační přechody jsou označeny *)

Název analytu	Prekursorový ion	Produktový ion	RT (min)	Kolizní energie
K ₁ -d7	458.3	194.1	4.8	24
Vitamin K ₁	451.4	199.2	4.8	32
Vitamin K ₁ *	451.4	187.1	4.8	24
MK-4-d7	452.4	194.1	3.1	20
MK-4	445.3	227.1	3.1	24
MK-4 *	445.3	187	3.1	20
MK-7-d7	656.5	194.1	7.9	32
MK-7	649.5	227.2	7.9	32
MK-7 *	649.5	187	7.9	32

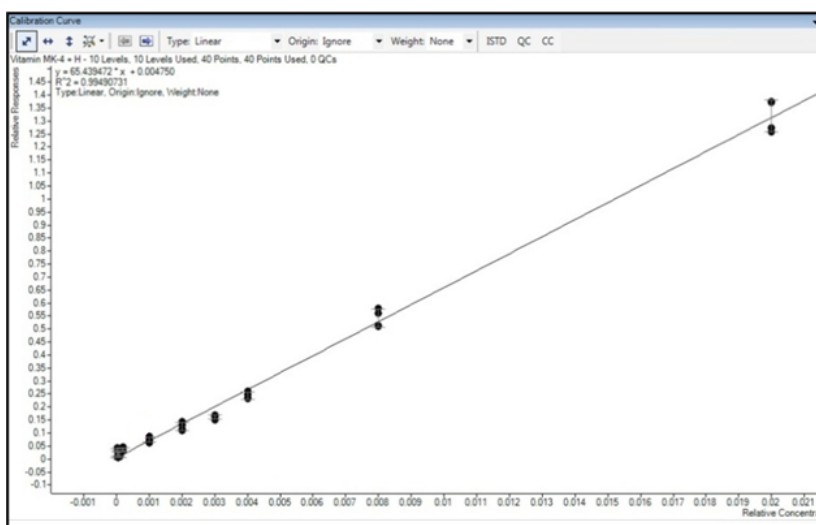
8.1. Kalibrace

Pro kvantitativní stanovení jednotlivých forem vitaminu K byla připravena jedenácti bodová kalibrace připravená ze zásobních roztoků v dubletu. Kalibrační roztoky byly připraveny v následujících koncentracích: 0; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 a 10,0 ng/ml. Výpočet koncentrace vitaminu K₁ vychází z rovnice regrese $y = 89,9516.x + 0,0333$. Regresní rovnice pro výpočet koncentrací vitaminů K₂ jsou: $y = 65,4395.x + 0,0048$ pro MK-4 a $y = 87,8625.x + 0,0007$ pro MK-7, kde x představuje koncentraci stanovovaného vitaminu a y uvádí poměr ploch píku stanovovaného vitaminu k danému izotopově značenému standardu.

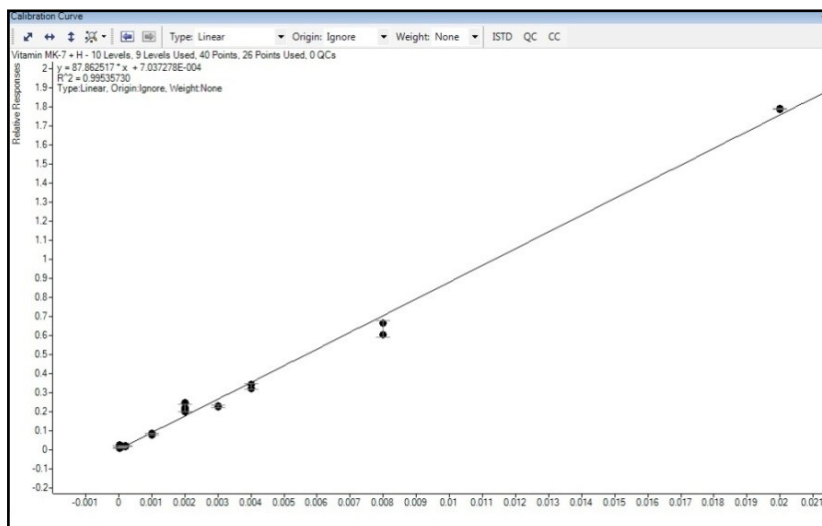
Všechny kalibrační křivky vitamínu K byly lineární v celém testovaném rozsahu. Hodnoty regresních koeficientů jsou 0,9967 pro vitamin K₁, 0,9949 pro MK-4 a 0,9964 pro MK-7. Jednotlivé kalibrace jsou uvedeny níže na **obrázcích 24 – 26**.



Obr. 24 Kalibrace vitamínu K₁ metodou LC-MS/MS



Obr. 25 Kalibrace MK-4 (vitamin K₂) metodou LC-MS/MS



Obr. 26 Kalibrace MK-7 (vitamin K_2) metodou LC-MS/MS

8.2. Opakovatelnost

V této disertační práci byla opakovatelnost LC-MS/MS metody stanovena na sérii deseti vzorků kontrol kvality na třech koncentračních hladinách za zachování podmínek opakovatelnosti jako v případě opakovatelnosti metody HPLC viz *kapitola 7.2*. Nízká hladina kontroly byla připravena v koncentraci 0,05 ng/ml pro jednotlivé formy vitaminů K, střední kontrola kvality byla připravena v koncentraci 0,5 ng/ml pro jednotlivé formy vitaminů K a vysoká hladina kontroly byla připravena v koncentraci 1,5 ng/ml pro jednotlivé formy vitaminů K. Z naměřených dat byl vypočítán průměr, SD, CV a bias. Na nízké hladině kontroly jsme dosáhli CV 9,2 % pro vitamin K_1 , 14,2 % pro MK-4 a 10,6 % pro MK-7. Na střední hladině kontroly byl dosažen CV 3,2 % pro vitamin K_1 , 3,2 % pro MK-4 a 6,0 % pro MK-7. Na vysoké hladině kontroly jsme dosáhli CV 2,3 % pro vitamin K_1 , 6,7 % pro MK-4 a 6,8 % pro MK-7. Výsledky opakovatelnosti uvedené v *tabulce 16* odpovídají požadavkům úspěšné validace.

Tab. 16 Opakovatelnost měření pomocí LC-MS/MS

Název	Nízká kontrola (0,05 ng/ml)			Střední kontrola (0,5 ng/ml)			Vysoká kontrola (1,5 ng/ml)		
	Pořadí	K ₁	MK-4	MK-7	K ₁	MK-4	MK-7	K ₁	MK-4
1	0,041	0,038	0,044	0,54	0,49	0,55	1,54	1,63	1,60
2	0,047	0,053	0,054	0,51	0,50	0,46	1,52	1,48	1,65
3	0,047	0,051	0,057	0,54	0,50	0,51	1,53	1,42	1,67
4	0,045	0,063	0,055	0,52	0,49	0,55	1,54	1,62	1,48
5	0,060	0,058	0,060	0,50	0,49	0,50	1,52	1,41	1,49
6	0,049	0,054	0,046	0,51	0,53	0,49	1,54	1,65	1,51
7	0,050	0,054	0,047	0,51	0,51	0,52	1,55	1,44	1,51
8	0,053	0,059	0,058	0,50	0,52	0,49	1,58	1,45	1,47
9	0,054	0,044	0,059	0,51	0,52	0,49	1,46	1,41	1,74
10	0,049	0,050	0,054	0,49	0,53	0,47	1,48	1,41	1,74
Průměr	0,052	0,052	0,053	0,51	0,51	0,50	1,53	1,49	1,59
SD	0,05	0,007	0,006	0,02	0,02	0,03	0,03	0,10	0,11
CV (%)	9,2	14,2	10,6	3,2	3,2	6,0	2,3	6,7	6,8
Bias (%)	3,7	4,8	6,8	2,6	1,6	0,6	1,7	0,5	5,7

8.3. Reprodukovatelnost měření

Reprodukovatelnost byla stanovena na sérii deseti vzorků na třech koncentračních hladinách za podmínek reprodukovatelnosti. Všechny vzorky pro stanovení reprodukovatelnosti byly připraveny v jeden den a uloženy do hlubokomrazacího boxu při cca -70 °C. Reprodukovatelnost této metody byla stanovována v různé dny. Každý den byl měřen jeden vzorek nízké, jeden vzorek střední a jeden vzorek vysoké kontroly kvality. Ostatní podmínky měření (stejný analyzátor, stejná obsluha) byly zachovány. Z výsledků byl jako v případě opakovatelnosti vypočítán průměr, SD, CV a bias. V *tabulce 17* jsou uvedeny všechny naměřené hodnoty a vypočítané parametry. Na nízké hladině kontroly jsme dosáhli CV 11,8 % pro vitamin K₁, 11,8 % pro MK-4 a 12,7 % pro MK-7. Střední kontrola kvality vykazovala v reprodukovatelnosti hodnoty CV 8,8 % pro vitamin K₁, 5,6 % pro MK-4 a 6,2 % pro MK-7. Na vysoké hladině kontroly jsme dosáhli CV 2,5 % pro vitamin K₁, 4,4 % pro MK-4 a 5,5 % pro MK-7. Vypočítané parametry splňují podmínky úspěšné validace metody.

Tab. 17 Reprodukovatelnost měření pomocí LC-MS/MS

Název	Nízká kontrola (0,05 ng/ml)			Střední kontrola (0,5 ng/ml)			Vysoká kontrola (1,5 ng/ml)		
	Pořadí	K ₁	MK-4	MK-7	K ₁	MK-4	MK-7	K ₁	MK-4
1	0,061	0,050	0,051	0,50	0,49	0,50	1,53	1,44	1,43
2	0,063	0,042	0,057	0,51	0,52	0,49	1,61	1,45	1,51
3	0,048	0,058	0,053	0,51	0,50	0,52	1,52	1,41	1,47
4	0,050	0,053	0,057	0,50	0,48	0,51	1,51	1,48	1,65
5	0,053	0,057	0,055	0,51	0,50	0,49	1,56	1,54	1,67
6	0,057	0,055	0,042	0,48	0,46	0,47	1,57	1,55	1,51
7	0,060	0,064	0,063	0,56	0,55	0,47	1,55	1,48	1,49
8	0,043	0,062	0,052	0,58	0,52	0,56	1,63	1,58	1,48
9	0,060	0,062	0,060	0,60	0,47	0,45	1,58	1,61	1,45
10	0,055	0,054	0,043	0,60	0,53	0,49	1,54	1,55	1,60
Průměr	0,055	0,056	0,053	0,54	0,50	0,50	1,56	1,51	1,53
SD	0,006	0,007	0,007	0,05	0,03	0,03	0,04	0,07	0,08
CV (%)	11,8	11,8	12,7	8,8	5,6	6,2	2,5	4,4	5,5
Bias (%)	10,0	11,4	6,6	7,0	0,4	1,0	4,0	0,6	1,7

8.4. Pravdivost měření (bias)

Pravdivost měření ukazuje těsnost shody mezi střední hodnotou výsledků měření a přijatou referenční hodnotou. Mírou pravdivosti je bias, který odhaduje hodnotu systematické chyby. Hodnota bias byla vypočtena jak pro opakovatelnost, tak pro reprodukovatelnost měření, a je uvedena v *tabulkách 16 a 17*. Za střední referenční hodnotu je považována hodnota 0,05 ng/ml pro nízkou kontrolu kvality, 0,5 ng/ml pro střední hodnotu a 1,5 ng/ml pro vysokou kontrolu kvality.

Vypočítané hodnoty bias u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti nepřesahují u žádného stanovaného vitamínu hodnotu 12 %, a proto splňují podmínky úspěšné validace.

8.5. Mez detekce

Mez detekce se u chromatografických metod s tandemovou hmotnostní detekcí stanovuje ředěním nejnižšího kalibračního bodu, pokud je odezva analytu nejnižšího kalibračního

bodů (0,03 ng/ml) alespoň pětikrát vyšší než odezva vzorku bez analytu (European Medicines Agency, 2011).

Postupným ředěním byla stanovena mez detekce 0,0019 ng/ml pro vitamin K₁ a 0,0038 ng/ml pro obě stanovované formy vitamínu K₂. Mez detekce byla stanovena s dostatečným rozlišením poměru signálu k šumu.

8.6. Mez kvantifikace

Za mez kvantifikace se u chromatografických metod s tandemovou hmotnostní detekcí považuje nejnižší kalibrační bod, který v této disertační práci odpovídá koncentraci 0,03 ng/ml.

8.7. Výtěžnost metody

Výtěžnost u vitamínu K₁ dosahovala hodnot 98,2 – 109,6 %. Výtěžnost u vitamínu K₂ dosahovala hodnot 99,5 – 111,2 % pro MK-4 a 99,0 – 106,8 % pro MK-7.

Hodnoty výtěžnosti by se měly pohybovat v rozmezí 90 – 110 %, pokud se ale používají hodnoty blízké LOQ, pak je povolené rozmezí výtěžnosti metody 80 – 120 % (European Medicines Agency, 2011). To je zde v případě formy MK-4, kde hodnota výtěžnosti 111,2 % byla získána u vzorku s koncentrací 0,05 ng/ml, která je blízká LOQ.

8.8. Robustnost metody

Vliv teploty skladování na stabilitu vitamínu K v séru byl testován již u metody HPLC viz *kapitola 7.8*.

U této metody jsme se rozhodli otestovat stabilitu připraveného vzorku skladovaného v chlazeném automatickém podavači vzorků (autosampleru) při teplotě cca 4 °C po dobu 7 dnů. Tento pokus byl proveden na sérii 10 připravených vzorků, kdy během sedmi dnů došlo k maximálnímu poklesu o 11 % oproti původní hodnotě. Série deseti vzorků byla měřena každý den.

8.9. Shrnutí validace LC-MS/MS metody

Metoda na stanovení tří forem vitamínu K byla vyvinuta a úspěšně validována. Oproti dřívější metodě HPLC má tato metoda nižší LOD. Příprava vzorků zůstává jako v případě HPLC poměrně časově náročná. Porovnání LOD, LOQ a výtěžnosti obou vyvinutých metod ukazuje *tabulka 18*.

Tab. 18 Porovnání LOD, LOQ a výtěžnosti metod HPLC s FLD a LC-MS/MS

Validační parametr	Metoda	Vitamin K		
		K ₁	MK-4	MK-7
LOD (ng/ml)	HPLC s FLD	0,0103	0,0140	0,0100
	LC-MS/MS	0,0019	0,0038	0,0038
LOQ (ng/ml)	HPLC s FLD	0,03	0,04	0,04
	LC-MS/MS	0,03	0,03	0,03
Výtěžnost (%)	HPLC s FLD	100,7 - 104,0	98,0 - 106,0	104,0 - 104,1
	LC-MS/MS	98,2 - 109,6	99,5 - 111,2	99,0 - 106,8

Některé publikace uvádějí snazší a rychlejší přípravu vzorků s vitamínem K, avšak jejich limity kvantifikace jsou často několikanásobně vyšší, což znemožňuje použití těchto metod u vzorků s nízkými koncentracemi (Riphagen et al., 2015).

Stanovení vitamínu K metodou LC-MS/MS provádíme na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol od roku 2017. Do roku 2017 probíhalo stanovení vitamínu K výhradně metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Vzhledem k nízkých sérovým koncentracím tohoto vitamínu jsme potřebovali metodu s nižším limitem detekce a s minimálním rizikem interferencí v analýze. Z důvodu zachování minimálních interferencí jsme museli ponechat stejnou přípravu vzorku i pro metodu LC-MS/MS. Metoda s hmotnostní detekcí je i přesnější vzhledem k použitím IS ke každému analytu, které minimalizují chyby při náročné přípravě vzorku.

9. Přímé stanovení vitamínu K pomocí HPLC s FLD

Přímé stanovení vitamínu K u postmenopauzálních žen je velmi důležité, jelikož vitamín K₂ zejména forma MK-7 má pozitivní účinek na formaci kostní hmoty. V odborné literatuře se můžeme setkat s naměřenými hodnotami vitamínu K₂, které právě bývají u pacientů s příznaky osteoporózy snižené oproti kontrolní skupině (Hart et al., 1985; Kanai et al., 1997; Rosen et al., 1993; Sato et al., 1998). Vybrané hodnoty MK-7 jsou uvedeny v *tabulce 19*.

Tab. 19 Hladiny vitamínu K₁ a MK-7 u pacientů s osteoporózou a u kontrolní skupiny bez osteoporózy

Zdroj	Oblast	Skupina	MK-7 (ng/ml, průměr ± SD)
(Rosen et al., 1993)	Lyon, Francie	starší ženy bez zlomeniny (n = 38)	0,226 ± 0,178
		starší ženy se zlomeninou kyčle (n = 51)	0,120 ± 0,084
(Hart et al., 1985)	Tokyo, Japonsko	starší ženy bez zlomeniny (n = 36)	6,260 ± 5,620
		starší ženy se zlomeninou obratle (n = 24)	3,290 ± 3,630
(Kanai et al., 1997)	Osaka, Japonsko	postmenopauzální ženy s normální BMD (n = 52)	1,100 ± 0,590
		postmenopauzální ženy se sníženou BMD	0,750 ± 0,130
(Sato et al., 1998)	Osaka, Japonsko	starší muži s normální BMD (n = 15)	1,440 ± 0,850
		starší muži se sníženou BMD (n = 12)	0,710 ± 0,350

Pro vitamín K₂ neexistují referenční meze, a proto interpretace těchto výsledků bývá složitější. Stanovení vitamínu K u postmenopauzálních žen bylo nejprve prováděno pomocí metody HPLC s fluorescenční detekcí s postkolonovou redukcí zinkovým prachem a později pomocí metody LC-MS/MS. Celkem bylo pomocí HPLC metody stanoveno 192 vzorků sér pacientů s osteoporózou a 158 postmenopauzálních žen bez diagnostikované osteoporózy.

Nejčastěji se naměřená data porovnávají s naměřenými daty zdravé populace, kde jsou však tyto skupiny většinou velmi malé. V této práci (viz *kapitola 10.3.*) jsou uvedeny referenční intervaly pro střeoevropskou populaci, které jsme si sami stanovili z dat naměřených pomocí metody LC-MS/MS.

U skupiny pacientů s osteoporózou a postmenopauzálních žen byla pomocí Shapirova-Wilkova testu analyzována normalita rozložení dat. Naměřená data pomocí HPLC metody byla rozložena nerovnoměrně (p-hodnota <0,0001), a proto jsou k hodnocení použity mediány a mezikvartilová rozpětí. Hladiny vitaminů K u pacientů s osteoporózou dosahovaly hodnot mediánu 0,27 ng/ml pro vitamin K₁, 0,87 ng/ml pro MK-4 a 0,60 ng/ml pro MK-7. Pomocí Mann-Whitneyova testu jsme neprokázali rozdílnost dat během ročních období jako je to například typické pro vitamin D. P-hodnota u vitaminu K₁ byla 0,8628, u MK-4 0,1044 a u MK-7 0,8526. Námi naměřené hladiny vitaminu K₁ odpovídají hodnotám vitaminu K₁ uvedených v publikaci autorů (Rosen et al., 1993), kde průměrná hodnota tohoto vitaminu u 51 starších žen s prokázanou zlomeninou kyčle dosahovala 0,336 ng/ml. Hodnota MK-7 je u této populace výrazně nižší oproti našim datům. Autoři uvádějí průměrnou hodnotu MK-7 0,120 ng/ml.

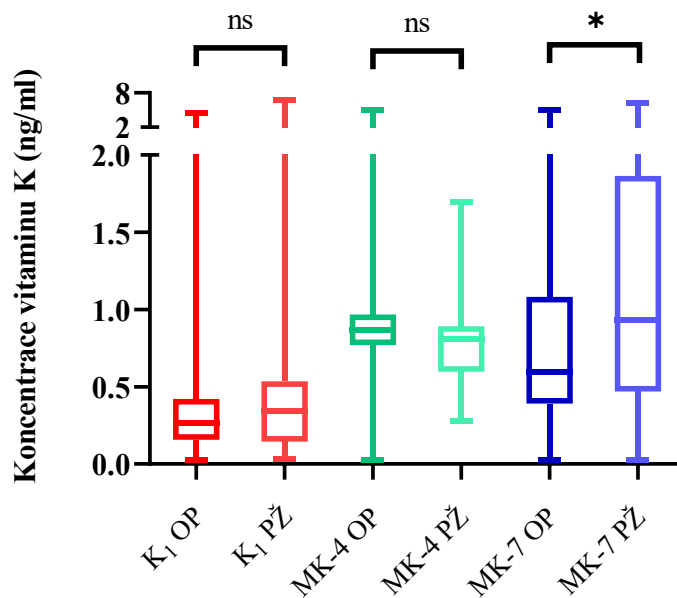
Pomocí HPLC metody jsme také stanovili koncentraci vitaminu K u postmenopauzálních žen bez prokázané osteoporózy, kde hodnoty mediánu byly u vitaminu K₁ 0,34 ng/ml, u MK-4 0,81 ng/ml a u MK-7 0,93 ng/ml. V **tabulce 20** jsou uvedeny průměry, SD, mediány, 1. kvartily (Q1) a 3. kvartily (Q3) naměřených dat pomocí HPLC metody.

Tab. 20 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů vitaminů K u pacientů s osteoporózou a postmenopauzálních žen analyzovaných pomocí HPLC metody

Soubor	Pacientky s osteoporózou (n = 192)			Postmenopauzální ženy (n = 158)		
	K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)	K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
Průměr	0,43	0,89	1,00	0,49	0,83	1,19
SD	0,39	0,29	1,02	0,40	0,27	1,08
Medián	0,27	0,87	0,60	0,34	0,81	0,93
Q1	0,16	0,77	0,39	0,15	0,60	0,47
Q3	0,42	0,97	1,08	0,53	0,89	1,87

Na **obrázku 27** je znázorněn krabicový graf s vyznačeným mediánem, prvním a třetím kvartilem, minimální a maximální hodnotou. Pomocí nepárového neparametrického testu (Mann-Whitney test) jsme porovnali jednotlivé formy vitaminu K pro každou skupinu pacientek. Statisticky významný rozdíl byl u formy MK-7, kde

p-hodnota byla 0,0467. U vitaminu K₁ a MK-4 jsme neprokázali statisticky významný rozdíl dat. Potvrdila se naše hypotéza, že pacientky s osteoporózou budou mít nižší hladiny MK-7.



Obr. 27 Krabicový graf vitaminů K u pacientek s osteoporózou a postmenopauzálních žen

(OP – pacientky s osteoporózou, PŽ – postmenopauzální ženy bez diagnostikované osteoporózy, ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, * - statisticky významný rozdíl dat)

Zcela odlišné koncentrace vitaminu K jsou publikovány u japonské populace autory Kamao et al. (Kamao et al., 2005) a Suhara et al. (Suhara et al., 2005). Oba kolektivy autorů naměřily hladiny vitaminu K u 20 zdravých jedinců. Hladiny vitaminu K₁ u japonské zdravé populace jsou oproti naší populaci minimálně dvakrát vyšší a dosahují hladin od $1,22 \pm 0,57$ ng/ml do $1,81 \pm 1,11$ ng/ml. U formy MK-4 jsou hladiny zdravé japonské populace naopak nižší, zde dosahují hladin od $0,15 \pm 0,17$ ng/ml až po $0,39 \pm 0,46$ ng/ml. V důsledku zvýšené konzumace fermentovaných potravin zejména natto, které je velmi bohaté na MK-7, jsou hladiny MK-7 u japonské zdravé populace mnohonásobně vyšší $6,37 \pm 7,45$ ng/ml do $16,27 \pm 20,58$ ng/ml (Kamao et al., 2005; Suhara et al., 2005).

Dále u vybrané skupiny pacientek ($n = 38$) byly kromě vitaminu K naměřeny hladiny OC, ucOC, 25-OH vitaminu D, PIVKA-II, MGP a ucMGP. OC a 25-OH vitamin D byl stanovován na automatizovaných analyzátoch na ÚLCHKB. Referenční hodnoty pro OC jsou $11,00 - 43,00$ $\mu\text{g/l}$ pro ženy ve věku 20 – 55 let a $15,00 - 46,00$ $\mu\text{g/l}$ pro ženy ve věku 56 – 99 let. Fyziologické rozmezí 25-OH vitaminu D je $50 - 250$ nmol/l (Fuschová

et al., 2013; Roche Diagnostics GmbH, 2017). Hladiny ucOC u zdravé populace byly publikovány autory van Summeren et al. (van Summeren et al., 2007). U 30 zdravých dospělých dobrovolníků byla vyhodnocena fyziologická koncentrace ucOC $3,6 \pm 2,5$ ng/ml (průměr \pm SD). Autoři publikace stanovovali ucOC na komerční ELISA soupravě od firmy Takara (Japonsko). Další skupina autorů Dahlberg et al. (Dahlberg et al., 2018), kteří taktéž použili soupravu pro stanovení ucOC od firmy Takara (Japonsko), uváděli referenční rozmezí pro ucOC 2 – 4 ng/ml naměřené u zdravé populace ve věku do 40 let. Tento typ ELISA soupravy byl použit při stanovení koncentrací ucOC v této práci. Další analyty – PIVKA-II, MGP a ucMGP byly také stanovovány pomocí komerčně dodaných souprav pro neautomatizované enzymové imunoanalýzy. Autoři Ebrahimzadeh Attari et al. (Ebrahimzadeh Attari et al., 2019) uvádějí fyziologické rozmezí ucMGP < 4 ng/ml. Autoři Silaghi et al. (Silaghi et al., 2019) stanovili u 124 zdravých jedinců referenční rozmezí pro celkové MGP, které bylo 6 – 108 ng/ml. Fyziologické hladiny PIVKA-II uvádí publikace autorů Krzyżanowska et al. (Krzyżanowska et al., 2018), kde jsou popsány fyziologické hladiny < 2 ng/ml.

Tab. 21 Přehled fyziologických mezí u OC, ucOC, MGP, ucMGP, PIVKA-II

Fyziologické rozmezí		
Osteokalcin (ng/ml)	ženy 20 - 55 let	11 - 43
Osteokalcin (ng/ml)	ženy 56 - 99 let	15 - 46
ucOC (ng/ml)		2 - 4
MGP (ng/ml)		6 - 108
ucMGP (ng/ml)		< 4
PIVKA-II (ng/ml)		< 2

Skupina pacientek byla rozdělena na dva soubory. První soubor (n = 19) byl tvořen pacientkami bez prokázané osteoporózy. Druhý soubor (n = 19) byl tvořen pacientkami s prokázanou osteoporózou. Hodnoty průměrů, SD, mediánů a kvartilů jsou uvedeny v **tabulkách 22 – 23**.

Tab. 22 Přehled průměru, SD, mediánu a kvartilů pro OC, ucOC, PIVKA-II, MGP, ucMGP u pacientů bez prokázané osteoporózy a u pacientů s prokázanou osteoporózou (PŽ – postmenopauzální ženy bez prokázané osteoporózy, OP – pacientky s osteoporózou, ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, * - statisticky významný rozdíl dat)

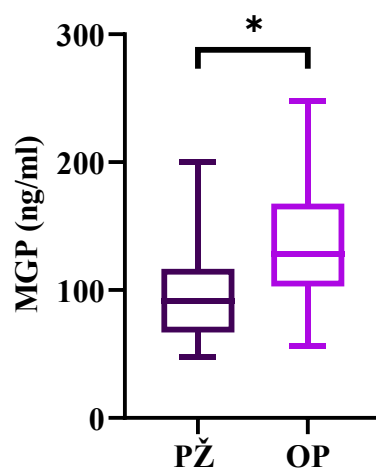
Analyt		OC (ng/ml)	ucOC (ng/ml)	ucOC/ OC (%)	PIVKA-II (ng/ml)	MGP (ng/ml)	ucMGP (ng/ml)	ucMGP / MGP (%)
Postmenopauzální ženy	Průměr	17,89	4,00	30,94	1,055	101,20	9,08	10,88
	SD	10,52	2,45	25,52	1,096	42,23	4,66	4,83
	Medián	15,41	3,91	21,88	0,707	91,22	7,96	12,53
	Q1	11,24	1,86	12,37	0,609	68,27	5,45	7,07
	Q3	23,01	6,45	40,36	1,019	113,95	11,09	14,16
Pacienti s OP	Průměr	22,29	2,87	14,12	0,888	131,50	10,66	10,54
	SD	9,51	1,90	8,93	0,338	50,78	4,36	7,45
	Medián	18,24	2,91	15,11	0,914	127,77	10,56	8,39
	Q1	14,91	1,05	5,96	0,762	104,34	6,92	5,94
	Q3	31,14	4,43	19,72	1,076	161,31	14,31	11,50
Rozdíl		ns	ns	ns	ns	*	ns	ns

Tab. 23 Přehled průměrů, SD, mediánu a kvartilů pro 25-OH vitaminu D a vitaminy K u pacientů bez prokázané osteoporózy a u pacientů s prokázanou osteoporózou (PŽ – postmenopauzální ženy bez prokázané osteoporózy, OP – pacientky s osteoporózou, ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, * - statisticky významný rozdíl dat)

Analyt		25-OH vitamin D (nmol/l)	MK-4 (ng/ml)	K ₁ (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
Postmenopauzální ženy	Průměr	76,95	0,131	0,884	0,419
	SD	20,65	0,132	0,695	0,285
	Medián	81,8	0,084	0,726	0,370
	Q1	72,4	0,048	0,522	0,275
	Q3	91,9	0,130	0,977	0,424
Pacienti s OP	Průměr	76,79	0,160	1,105	0,411
	SD	18,42	0,133	0,699	0,152
	Medián	83,2	0,114	0,984	0,378
	Q1	74,0	0,077	0,678	0,295
	Q3	87,4	0,140	1,270	0,483
Rozdíl		ns	ns	ns	ns

Námi stanovené hodnoty mediánů u analytů OC, ucOC a PIVKA-II jsou ve výše uvedených fyziologických rozmezech. Je zajímavé, že u této malé skupiny pacientů jsou hladiny vitamínu K vyšší u pacientek s osteoporózou než u postmenopauzálních zdravých žen, a přesto nejsou tato data statisticky významně odlišná. Proto jsou třeba tato měření provádět na větších skupinách pacientů. Hodnota mediánu MGP u pacientů s osteoporózou je vyšší než uvedené fyziologické rozmezí. U obou skupin mediány ucMGP překračují fyziologické rozmezí. Zvýšená koncentrace ucMGP by měla souviset s nízkou koncentrací vitamínu K₂, kdy nedochází k dostatečné karboxylaci Glu. Mediány 25-OH vitamínu D a vitamínu K jsou v obou skupinách ve fyziologickém rozmezí.

Statisticky významné rozdíly dat byly u všech analytů testovány pomocí nepárového neparametrického testu (Mann-Whitney test). Pouze u MGP byl prokázán statisticky významný rozdíl dat (p-hodnota 0,0497). Znázorněné mediány MGP s kvartily, maximální a minimální hodnotou jsou zobrazeny na **obrázku 28**.



Obr. 28 Krabicový graf MGP u postmenopauzálních žen bez osteoporózy a u pacientek s osteoporózou

(OP – pacientky s osteoporózou, PŽ – postmenopauzální ženy bez diagnostikované osteoporózy, * - statisticky významný rozdíl dat)

10. Přímé stanovení vitamínu pomocí metody LC-MS/MS

Při stanovení koncentrace vitamínu K pomocí metody LC-MS/MS se nám podařilo stanovit tento vitamin u 149 vzorků pacientů s osteoporózou, 337 vzorků zdravých jedinců bez prokázané osteoporózy, 191 vzorků zdravých dobrovolníků pro stanovení referenčních mezí vitamínů K, 21 vzorků pacientů s osteopénií a 252 vzorků pacientů s CF.

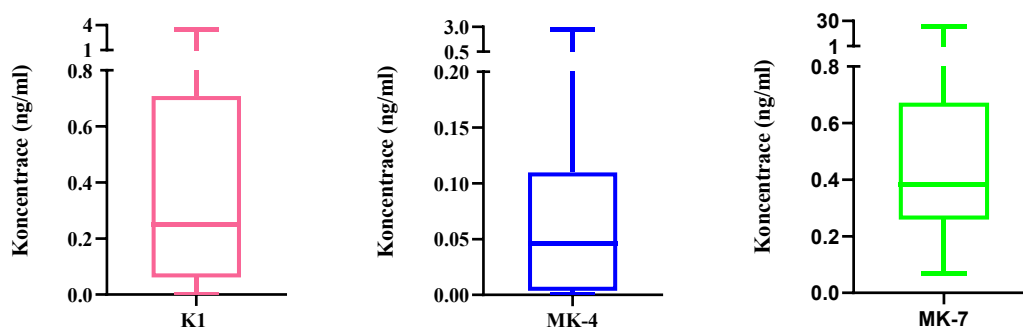
10.1. Vitamin K u pacientů s osteoporózou

U skupiny pacientů s osteoporózou byla pomocí Shapiro-Wilkova testu analyzována normalita rozložení dat. Všechny tři stanovované formy vitamínu K vykazovaly nerovnoměrnost rozložení dat (p -hodnota $<0,0001$). U každé formy vitamínu K byl vypočítán medián. Medián u vitamínu K_1 byl 0,250 ng/, u formy MK-4 0,046 ng/ml a u formy MK-7 0,383 ng/ml. **Tabulka 24** ukazuje vypočtené průměry, SD, mediány, 1. a 3. kvartil.

Tab. 24 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů s osteoporózou změřených pomocí LC-MS metody

Pacienti s osteoporózou (n = 149)			
Vitamin K	K_1 (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
Průměr	0,464	0,113	1,015
SD	0,583	0,275	2,547
Medián	0,250	0,046	0,383
Q1	0,061	0,004	0,259
Q3	0,708	0,110	0,672

Na **obrázku 29** jsou znázorněna naměřená data v podobě krabicových grafů s vyznačeným mediánem, prvním a třetím kvartilem, minimální a maximální hodnotou u pacientů s osteoporózou.

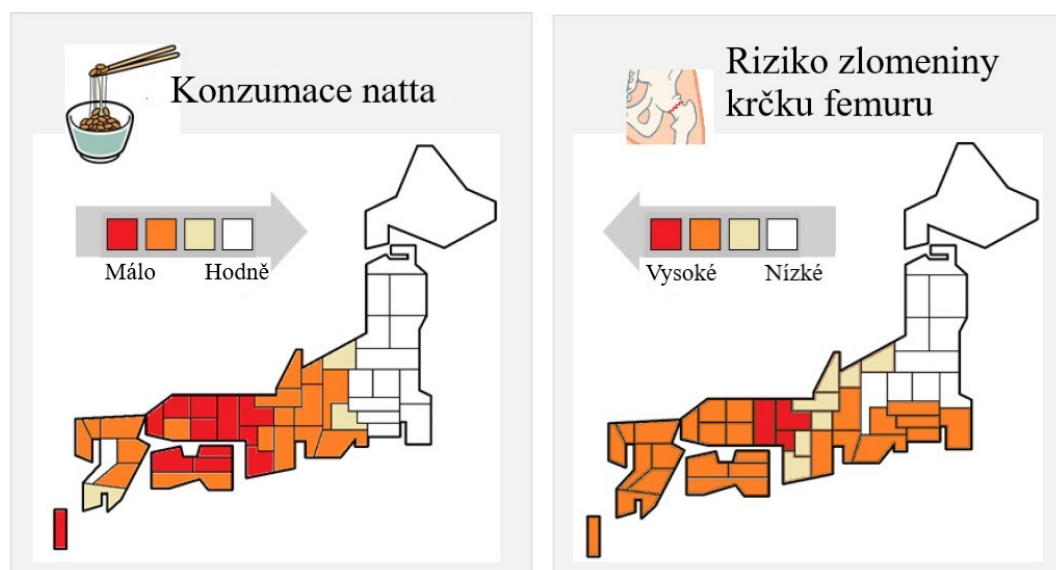


Obr. 29 Porovnání dat vitamínů K_1 , MK-4 a MK-7 u pacientů s osteoporózou

Autoři Kawana et al. (Kawana et al., 2001) publikovali naměřená data 51 postmenopauzálních žen ve věku 66 – 93 let se zlomeninou kyčle nebo obratlů, kde hodnoty vitamínu K₁ dosahovaly hodnot $0,095 \pm 0,081$ (průměr \pm SD) ng/ml. Hladiny MK-7 u této japonské populace byly $0,428 \pm 0,649$ (průměr \pm SD) ng/ml. Hladiny MK-4 se u této populace nepodařilo detekovat. Je vidět, že i přes odlišnou stravu, která je v Japonsku bohatá zejména na formu MK-7, tato skupina vykazovala obdobné výsledky koncentrace formy MK-7 jako naše skupina. Vitamin K₁ byl u japonských postmenopauzálních žen výrazně nižší. Tato publikace navíc uvádí průměr a směrodatnou odchylku i přes nerovnoměrné rozložení dat. Další výsledky získané ze skupiny 19 japonských postmenopauzálních žen s nízkou kostní denzitou uvádí publikace autorů Kanai et al. (Kanai et al., 1997). U této skupiny byly měřeny hladiny vitamínu K₁ a MK-7. Forma MK-4 nebyla stanovována. Koncentrace vitamínu K₁ naměřené u této populace byly $0,081 \pm 0,009$ ng/ml (průměr \pm SD) a koncentrace formy MK-7 $1,084 \pm 0,045$ ng/ml (průměr \pm SD). Vitamin K₁ odpovídá hladinám naměřeným v publikaci Kawana et al. (Kawana et al., 2001). Zatímco hladiny MK-7 značně převyšují i naše získaná data. Vliv na tyto vyšší hladiny MK-7 bude mít nejen menší testovaná skupina, ale i nižší věk, který je u této skupiny $55 \pm 1,3$ roků (průměr \pm SD). Autoři Kamao et al. (Kamao et al., 2005) publikovali výsledky 10 japonských pacientů s osteoporózou. Při přímém stanovení vitamínu K pomocí metody HPLC s FLD byly hladiny vitamínu K₁ u této populace $0,62 \pm 0,25$ ng/ml, MK-4 $46,83 \pm 46,41$ ng/ml a MK-7 $4,18 \pm 6,28$ ng/ml. Při použití metody LC-APCI/MS uvádí autoři koncentrace u vitamínu K₁ $0,85 \pm 0,27$ ng/ml, u formy MK-4 $51,89 \pm 44,88$ ng/ml a u MK-7 $4,13 \pm 6,37$ ng/ml. Tyto hladiny všech tří forem vitamínu K u obou metod výrazně převyšují naše získané hodnoty, což opět může být způsobeno odlišnými stravovacími návyky. Navíc těchto deset pacientů s osteoporózou bylo léčeno denní dávkou 45 mg MK-4, což vysvětluje dosažené vysoké hladiny této formy vitamínu K.

Avšak i v rámci japonské populace se výsledky MK-7 mohou od sebe značně lišit, což dokládá publikace autorů Kaneki et al. (Kaneki et al., 2001). V této publikaci jsou naměřeny 2 skupiny postmenopauzálních žen. Jedna skupina 49 žen je z Tokia a druhá skupina 25 žen z Hirošimy. Hladiny MK-7 u tokijské skupiny postmenopauzálních žen dosahují hodnot $1,538 \pm 1,785$ ng/ml, zatímco u hirošimské skupiny žen dosahují hodnoty tohoto vitamínu „pouze“ $0,357 \pm 0,539$ ng/ml. Vitamin K₁ se v obou skupinách příliš neliší. Postmenopauzální ženy z Tokia mají hladiny vitamínu K₁ $0,149 \pm 0,095$ ng/ml a

u žen z Hirošimy byly naměřeny hladiny tohoto vitamínu $0,149 \pm 0,117$ ng/ml. Hladiny MK-4 nebyly v této publikaci stanovovány. Rozdíl získaných dat mezi danými skupinami může být způsoben odlišným stravováním v jednotlivých částech Japonska. Vyšší míra konzumace natto je právě v oblasti na sever od Tokia, zatímco v oblasti Hirošimy se natto konzumuje méně. V oblasti jižní části Japonska včetně Hirošimy je vyšší výskyt fraktur kyčlí v porovnání se severní částí Japonska (Kaneki et al., 2001; Sato et al., 2020). Na **obrázku 30** je uvedeno schéma Japonska a četnost výskytu zlomenin krčku femuru závislou na míře konzumace natta.



Obr. 30 Vliv konzumace natto na riziko zlomeniny krčku femuru přeloženo a upraveno z původního zdroje: (Sato et al., 2020)

U evropské populace byly publikovány výsledky z Velké Británie u 31 postmenopauzálních žen ve věku 48 – 84 let v publikaci autorů Kaneki et al. (Kaneki et al., 2001), kde byla naměřena koncentrace vitamínu K_1 $0,104 \pm 0,108$ ng/ml a koncentrace formy MK-7 $0,110 \pm 0,058$ ng/ml. Oproti naší naměřené skupině jsou tyto koncentrace nižší než vypočtený medián u naší skupiny. Hladiny MK-4 nebyly v publikaci těchto autorů stanovovány (Kaneki et al., 2001). Nízké hladiny vitamínu K_1 jsou uvedeny v publikaci autorů Beavan et al. (Beavan et al., 2005), kde jsou zhodnocena data 31 britských postmenopauzálních žen, jejichž koncentrace vitamínu K_1 byly $0,063 \pm 0,005$ ng/ml. V této publikaci je dále uvedena i skupina 50 postmenopauzálních žen, jejichž koncentrace vitamínu K_1 jsou $0,072 \pm 0,009$ ng/ml, a jsou tudíž obdobné předchozí britské skupině. Hladiny vitamínu K_2 nebyly u těchto skupin stanovovány.

Autoři Thane et al. (Thane et al., 2002) publikovali výsledky měření 385 mužů a 493 žen ve věku nad 65 let, kde byl stanovován pouze vitamin K₁. U mužů byly naměřeny koncentrace tohoto vitamínu s průměrem 0,153 ng/ml a s celkovým rozpětím 0,027 – 0,829 ng/ml a u žen s průměrem 0,168 ng/ml a s celkovým rozpětím 0,027 – 0,928 ng/ml. Tyto hodnoty se příliš neliší od hodnot získaných v naší skupině pacientů s osteoporózou. V další publikaci autorů Yan et al. (Yan et al., 2004) jsou uvedena data britské populace od 67 mužů ve věku 60 – 83 let a stejně velké skupiny žen. I v této publikaci byl stanovován pouze vitamin K₁, kdy u mužů byly koncentrace tohoto vitamínu $0,297 \pm 0,338$ ng/ml (průměr \pm SD) a u žen $0,329 \pm 0,379$ ng/ml (průměr \pm SD). V této publikaci jsou dále uvedena data 86 mužů a 96 žen z Číny ve věku 65 – 75 let, kdy hodnoty vitamínu K₁ statisticky významně převyšují hodnoty evropské populace. Koncentrace vitamínu K₁ u čínských mužů byly $0,85 \pm 0,99$ ng/ml a u žen $1,12 \pm 1,45$ ng/ml. Data vitamínu K₁ u této populace jsou vyšší než naše získaná data, avšak musíme brát na zřetel rozdílnost vyhodnocování zejména při použití průměrů.

V publikaci autorů Klapkova et al. (Klapkova et al., 2018) jsou uvedeny výsledky získané metodou HPLC s FLD u 192 žen s osteoporózou (viz **kapitola 9**). Hladiny vitamínu K₁ dosahují $0,43 \pm 0,39$ ng/ml (medián 0,27 ng/ml), což odpovídá i získaným datům metodou LC-MS. Hladiny vitamínu K₂ se liší. Forma MK-4 dosahuje ve zmíněné publikaci hodnot $0,89 \pm 0,29$ ng/ml (medián 0,87 ng/ml). Tyto hladiny jsou výrazně vyšší než hladiny získané metodou LC-MS/MS. Hladiny MK-7 získané metodou HPLC s FLD dosahují $1,00 \pm 1,02$ ng/ml (medián 0,60 ng/ml). I v tomto případě jsou hladiny MK-7 získané metodou LC-MS/MS nižší. Pomocí nepárového neparаметrického testu (Mann-Whitney test) byla analyzována statisticky významná odlišnost dat. P-hodnota u MK-4 byla $< 0,0001$ a u MK-7 0,0013. Významná rozdílnost dat u MK-4 může být dána nejen jiným rozsahem měřených pacientů s osteoporózou, ale i použitou metodou. O rozdílnosti dat MK-4 mezi našimi vyvinutými metodami pojednává **kapitola 11**.

Publikace autorů Booth et al. (Booth et al., 2004) uvádí data velkého souboru postmenopauzálních žen. Skupina 269 postmenopauzálních žen na léčbě estrogény měla hladiny vitamínu K₁ $0,658 \pm 0,563$ ng/ml a skupina 424 postmenopauzálních žen bez léčby estrogény měla hladiny tohoto vitamínu $0,635 \pm 0,694$ ng/ml. Z této publikace lze usoudit, že léčba estrogény nemá vliv na koncentraci vitamínu K₁. Průměrné hodnoty obou skupin významně převyšují medián vitamínu K₁ u naší skupiny pacientů. Naproti

tomu v publikaci autorů Shea et al. (Shea et al., 2015) je uvedena skupina 791 pacientů s osteoartrózou, u které byly naměřeny koncentrace K_1 $0,361 \pm 0,406$ ng/ml. Tato skupina se svou průměrnou hodnotou vitamínu K_1 přibližuje mediánu tohoto vitamínu u našich pacientů s osteoporózou.

Je nutné podotknout, že většina publikací uvádí průměrnou hodnotu \pm výběrovou směrodatnou odchylku, přestože se jedná o nerovnoměrné rozložení dat. Naše výsledky jsou vyjádřeny jako mediány. Rozdílný přístup v hodnocení souboru přináší nevýhody při porovnání s publikovanými daty. Dalšími nevýhodami při porovnávání našich výsledků s odbornými publikacemi je, že některé publikace uvádějí příliš malé soubory (Beavan et al., 2005; Kamao et al., 2005; Kanai et al., 1997; Kaneki et al., 2001) a pouze některé publikace uvádějí obě stanovované formy MK-4 a MK-7 (Kamao et al., 2005; Kawana et al., 2001; Klapkova et al., 2018). Také různé postupy přípravy vzorku a zvolené analytické metody znesnadňují porovnání mezi jednotlivými soubory pacientů. **Tabulka 25** uvádí přehled jednotlivých koncentrací publikovaných v literatuře.

Tab. 25 Publikované hladiny koncentrací vitamínu K u pacientů s osteoporózou (PŽ – postmenopauzální ženy, výsledky vyjádřené jako průměr ± SD)

Publikace	Oblast	Populace	K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
(Kanai et al., 1997)	Japonsko	PŽ 55 ± 1,3 let (n = 19)	0,081 ± 0,009	neměřeno	1,084 ± 0,045
(Kaneki et al., 2001)	Japonsko (Tokio)	PŽ 50 – 84 let (n = 49)	0,149 ± 0,095	neměřeno	1,538 ± 1,785
(Kaneki et al., 2001)	Japonsko (Hirošima)	PŽ 51 – 66 let (n = 25)	0,149 ± 0,117	neměřeno	0,357 ± 0,539
(Kaneki et al., 2001)	Velká Británie	PŽ 48 – 84 let (n = 31)	0,104 ± 0,108	neměřeno	0,110 ± 0,058
(Kawana et al., 2001)	Japonsko	PŽ 60 – 93 let (n = 51)	0,095 ± 0,081	< LoD	0,428 ± 0,649
(Thane et al., 2002)	Velká Británie	Ženy > 65 let (n = 493)	0,027 – 0,928	neměřeno	neměřeno
(Thane et al., 2002)	Velká Británie	Muži > 65 let (n = 385)	0,027 – 0,829	neměřeno	neměřeno
(Booth et al., 2004)	USA	PŽ 58 ± 7 let užív. estrogeny (n = 269)	0,658 ± 0,563	neměřeno	neměřeno
(Booth et al., 2004)	USA	PŽ 63 ± 8 let bez estrogenů (n = 424)	0,635 ± 0,694	neměřeno	neměřeno
(Yan et al., 2004)	Velká Británie	Muži 60 – 83 let (n = 67)	0,297 ± 0,338	neměřeno	neměřeno
(Yan et al., 2004)	Velká Británie	Ženy 60 -83 let (n = 67)	0,329 ± 0,379	neměřeno	neměřeno
(Yan et al., 2004)	Čína	Muži 65 – 75 let (n = 86)	0,85 ± 0,99	neměřeno	neměřeno
(Yan et al., 2004)	Čína	Ženy 65 – 75 let (n = 96)	1,12 ± 1,45	neměřeno	neměřeno
(Beavan et al., 2005)	Velká Británie	PŽ 67 ± 7 let (n = 31)	0,063 ± 0,005	neměřeno	neměřeno
(Beavan et al., 2005)	Gambie	PŽ 68 ± 8 let (n = 50)	0,072 ± 0,009	neměřeno	neměřeno
(Kamao et al., 2005)	Japonsko	Pacienti s osteoporózou (n = 10)	0,62 ± 0,25	46,83 ± 46,41	4,18 ± 6,28
(Dalmeijer et al., 2014)	Nizozemsko	PŽ 57 ± 5 let (n = 508)	0,487 ± 0,464	neměřeno	neměřeno
(Shea et al., 2015)	USA	Pacienti s osteoartrózou 70 -79 let (n = 791)	0,361 ± 0,406	neměřeno	neměřeno
(Klapkova et al., 2018)	Česká republika	Osteoporotické ženy (n = 192)	0,43 ± 0,39	0,89 ± 0,29	1,00 ± 1,02

10.2. Přímé a nepřímé stanovení vitamínu K u pacientů a dobrovolníků užívajících formu MK-7

10.2.1. Hladiny vitamínů K u pacientů bez prokázané osteoporózy

Během přípravy této disertační práce bylo naměřeno celkem 318 pacientů bez prokázané osteoporózy pomocí LC-MS/MS metody. Tento soubor však zahrnuje nejen zdravé dobrovolníky, ale i pacienty s některými typy metabolických onemocněních (např. poruchy lipidového spektra). Vzhledem k různým diagnózám pacientů nebylo možné tuto skupinu dále členit do jednotlivých skupin. U této skupiny byla pomocí Shapiro-Wilkova testu analyzována normalita rozložení dat. Všechny tři stanovované formy vitamínu K vykazovaly nerovnoměrnost rozložení dat (p -hodnota $< 0,0001$), a proto je k vyhodnocení použit opět medián. Hodnoty mediánu byly u vitamínu K₁ 0,360 ng/ml, u MK-4 0,090 ng/ml a u MK-7 0,259 ng/ml. Největší mezikvartilové rozpětí (IQR) bylo vypočteno u vitamínu K₁ 0,643 ng/ml. Zatímco u vitamínu K₂ je hodnota IQR menší. IQR bylo u MK-4 0,162 ng/ml a u MK-7 0,259 ng/ml.

Všechny mediány vypočtené u tohoto souboru pacientů jsou v námi stanoveném referenčním rozmezí zdravé populace. Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů je uveden v *tabulce 26*.

Tab. 26 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů bez prokázané osteoporózy

Pacienti bez osteoporózy (n = 318)			
Vitamin K	K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
Průměr	0,758	0,268	0,399
SD	2,068	0,616	0,704
Medián	0,360	0,090	0,259
Q1	0,140	0,047	0,168
Q3	0,796	0,210	0,424

10.2.2. Užívání Femoralexu forte u zdravých dobrovolníků

U vybrané skupiny zdravých dobrovolníků ($n = 19$) byl testován vliv tříměsíčního denního užívání doplňku stravy Femoralexu forte, který obsahuje 800 IU vitamínu D₃ a 45 µg vitamínu K₂ formy MK-7 v jedné tabletě (PharmaSuisse Laboratories, 2020). Všichni dobrovolníci užívali 1 tabletu denně. U dobrovolníků byl proveden první odběr před zahájením užívání a druhý odběr po tříměsíčním užívání tohoto doplňku stravy. Ze vzorků séra se kromě vitamínu K stanovoval 25-OH vitamin D, OC, ucOC, MGP, ucMGP a PIVKA-II. U všech stanovovaných analytů byla pomocí Shapiro-Wilkova testu analyzována rovnoměrnost rozložení dat. Vitaminy K (všechny stanovované formy) a PIVKA-II vykazovaly nerovnoměrnost rozložení dat (p -hodnota $< 0,0001$), a proto byly k vyhodnocení využity mediány.

Pro porovnání dat byl využit párový neparametrický test (Wilcoxonův test). U naměřených dat byly zjištěny statisticky významné rozdíly u MK-7 (p -hodnota 0,0124) a 25-OH vitamínu D (p -hodnota 0,0007), čímž se potvrdil náš předpoklad. Nepřímé ukazatele stavu vitamínu K vykazovaly statisticky významnou odlišnost pouze v případě ucOC (p -hodnota 0,0420), který ovšem může být ovlivněn i hladinou vitamínu D. Koncentrace PIVKA-II nevykazovaly statisticky významný rozdíl, přestože se tento nepřímý analyt někdy využívá k posouzení hladin vitamínu K u pacientů, kteří jsou sledováni kvůli jeho případnému nedostatku např. pacienti s CF či pacienti s malabsorpčními syndromy (Krzyżanowska et al., 2018, 2015).

Velkou nevýhodou nepřímých ukazatelů stavu vitamínu K je jejich pomalá odezva při zvýšení nebo snížení dávky vitamínu K (Fusaro et al., 2017). Z tohoto experimentu je zřejmé, že ačkoli se PIVKA-II využívá jako nepřímý ukazatel stavu zásob vitamínu K v organismu, tak tříměsíční užívání formy MK-7 nemělo vliv na změnu koncentrace tohoto markeru. Jak je popisováno v literatuře, PIVKA-II by měla vykazovat změny hladin zejména při změně koncentrace vitamínu K₁. Prozatím není stále jasné, jak PIVKA-II reaguje na případné změny koncentrace vitamínu K₁, který je teoreticky schopen konverze na vitamin K₂ (Nigwekar et al., 2017; Sato et al., 2012).

V *tabulkách 27 - 28* je uveden přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u dobrovolníků užívající Femoralex forte po dobu tří měsíců.

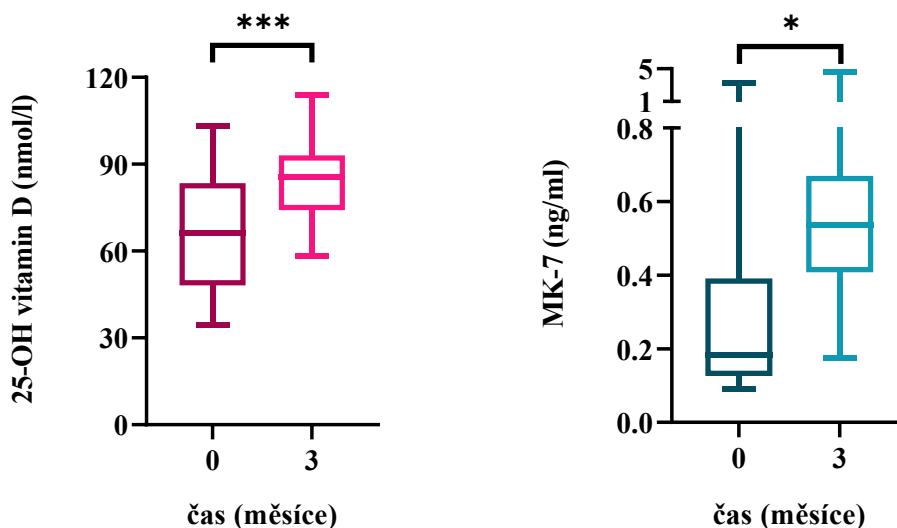
Tab. 27 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u dobrovolníků užívající tři měsíce přípravek Femoralex forte – první část
(ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, * a *** – statisticky významný rozdíl dat)

Analyt		OC (ug/l)	ucOC (ng/l)	ucOC/OC (%)	PIVKA-II (ng/ml)	MGP (ng/ml)	ucMGP (ug/ml)	ucMGP/MGP (%)
Před zahájením	Průměr	20,79	5,25	29,68	1,72	118,80	9,67	10,84
	SD	6,52	2,10	16,66	2,08	39,51	4,89	10,00
	Medián	19,46	5,69	25,82	0,91	116,92	8,18	6,20
	Q1	16,19	3,79	22,45	0,51	96,58	6,40	4,63
	Q3	25,51	6,53	29,44	1,83	140,75	11,29	15,76
Po třech měsících	Průměr	20,16	4,34	23,39	1,83	142,84	11,18	9,29
	SD	6,60	1,84	9,95	2,46	53,66	4,55	5,63
	Medián	18,04	4,96	24,23	0,94	144,88	10,34	7,74
	Q1	16,17	2,92	17,26	0,54	86,62	6,84	4,15
	Q3	24,54	5,62	29,83	1,73	193,61	15,43	14,62
Rozdíl		ns	*	ns	ns	ns	ns	ns

Tab. 28 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u dobrovolníků užívající tři měsíce přípravek Femoralex forte – druhá část
(ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, * a *** – statisticky významný rozdíl dat)

Analyt		25-OH vitamin D (nmol/l)	MK-4 (ng/ml)	K ₁ (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
Před zahájením	Průměr	67,62	0,074	0,506	0,492
	SD	21,48	0,068	0,480	0,803
	Medián	66,35	0,046	0,360	0,182
	Q1	48,33	0,030	0,263	0,144
	Q3	83,34	0,087	0,459	0,339
Po třech měsících	Průměr	83,30	0,091	0,767	0,845
	SD	13,74	0,070	0,525	0,997
	Medián	85,78	0,074	0,680	0,537
	Q1	75,87	0,045	0,572	0,415
	Q3	91,41	0,098	0,818	0,666
Rozdíl		***	ns	ns	*

Obrázek 31 ukazuje rozdíly 25-OH vitamínu D a MK-7 před zahájením užívání a po tříměsíčním užívání přípravku Femoralexu forte v podobě krabicových grafů s vyznačenou minimální hodnotou, maximální hodnotou a mediánem s IQR.



Obr. 31 Porovnání dat 25-OH vitamínu D a vitamínu MK-7 u dobrovolníků užívajících Femoralex forte

10.2.3. Užívání Femoralexu forte u pacientů s osteopénií

Další skupinou, která užívala potravinový doplněk Femoralex forte, byli pacienti s diagnostikovanou osteopénií, u kterých jsme chtěli prokázat, zda má vitamin K (MK-7) obsažený ve Femoralexu forte vliv na kostní denzitu. Tito pacienti ($n = 10$) absolvovali denzitometrické vyšetření před zahájením užívání Femoralexu forte a byla jim doporučena strava obsahující vysoké množství vápníku. Po skončení užívání preparátu podstoupili pacienti druhé kontrolní denzitometrické vyšetření, aby se prokázal případný pozitivní vliv na kostní hmotu. Přípravek Femoralex forte byl užíván po dobu šesti měsíců.

Kontrolní skupinu tvořili pacienti s osteopénií ($n = 11$), kteří byli léčeni standardním postupem, a to vitamínem D (Vigantol) a stravou bohatou na vápník. Tento experiment probíhal po dobu šesti měsíců, aby bylo možné zachytit nějaké změny na denzitometrickém vyšetření.

V *tabulkách 29 – 30* je uveden přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů užívajících Femoralex forte a u kontrolní skupiny užívající vitamin D. U všech

stanovovaných analytů byla pomocí Shapiro-Wilkova testu analyzována rovnoměrnost rozložení dat. Vitamin K, 25-OH vitamin D a OC vykazovaly nerovnoměrnost rozložení dat (p -hodnota $<0,0001$), a proto byly k vyhodnocení využity mediány.

Hodnocení stavu kvality kostní hmoty (BMD) neprobíhá pouze z laboratorního vyšetření sérových hladin analytů souvisejících s kostní remodelací, ale i pomocí stupně úbytku kostní hmoty. Hodnocení BMD se vyjadřuje při denzitometrickém vyšetření pomocí tzv. T-skóre. T-skóre vyjadřuje hodnotu standardní odchylky od průměrné hladiny BMD u zdravé populace. Fyziologický nález BMD je při T-skóre $> -1,0$ SD, osteopénie při T-skóre mezi $-1,0$ a $-2,5$ SD. Nález BMD s T-skóre $< -2,5$ SD patří mezi jeden z příznaků osteoporózy. Pokud je při tomto nálezu přítomna i nízkozátěžová zlomenina, lze hovořit o těžké osteoporóze (Čepová et al., 2012).

Ve skupině užívající Femoralex forte byl pomocí párového neparametrického testu (Wilcoxonův test) prokázán statisticky významný rozdíl u MK-7 (p -hodnota 0,0313). Ve skupině užívající vitamin D byl prokázán statisticky významný rozdíl u osteokalcinu (p -hodnota 0,0195) a u vitaminu D (p -hodnota 0,0137).

Tab. 29 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů užívajících Femoralex forte (ns – statisticky nevýznamný rozdíl, * – statisticky významný rozdíl)

Pacienti užívající Femoralex forte		K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)	25-OH vitamin D (nmol/l)	OC (ng/ml)
Před léčbou	Průměr	0,286	0,030	0,875	61,80	20,51
	SD	0,454	0,027	1,181	12,78	7,00
	Medián	0,100	0,030	0,372	64,55	20,18
	Q1	0,030	0,030	0,262	51,53	14,73
	Q3	0,553	0,054	1,401	75,70	32,31
Po léčbě	Průměr	0,186	0,030	1,908	71,53	15,52
	SD	0,323	0,039	1,437	23,66	2,14
	Medián	0,030	0,030	1,668	74,70	16,04
	Q1	0,030	0,030	0,668	53,25	13,31
	Q3	0,385	0,047	2,817	99,10	17,21
Rozdíl		ns	ns	*	ns	ns

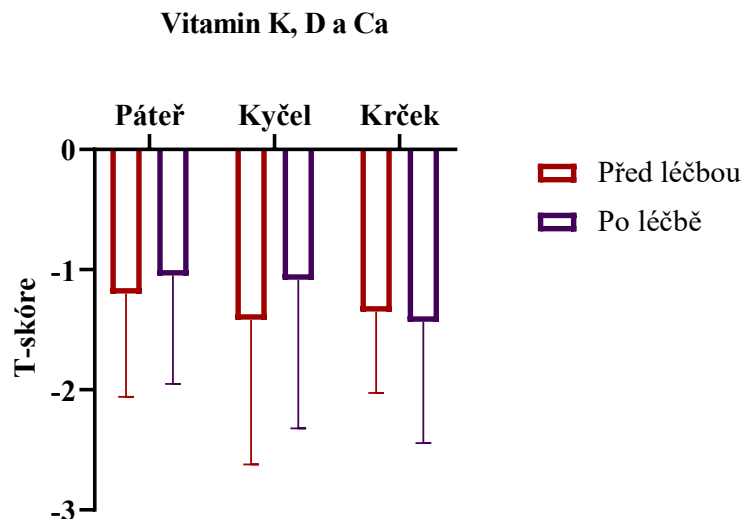
Tab. 30 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u kontrolní skupiny (u pacientů užívajících vitamin D)

(ns – statisticky nevýznamný rozdíl, * – statisticky významný rozdíl)

Pacienti užívající vitamin D		K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)	25-OH vitamin D (nmol/l)	OC (ng/ml)
Před léčbou	Průměr	0,276	0,039	2,709	58,92	27,69
	SD	0,423	0,063	6,776	21,00	8,77
	Medián	0,127	0,030	0,390	57,40	25,42
	Q1	0,030	0,030	0,249	45,10	23,10
	Q3	0,299	0,178	1,375	77,10	33,65
Po léčbě	Průměr	0,320	0,030	1,809	86,66	23,11
	SD	0,331	0,063	4,224	16,07	9,95
	Medián	0,179	0,030	0,409	86,75	22,32
	Q1	0,140	0,030	0,243	71,75	16,00
	Q3	0,377	0,080	0,937	117,60	29,95
Rozdíl		ns	ns	ns	*	*

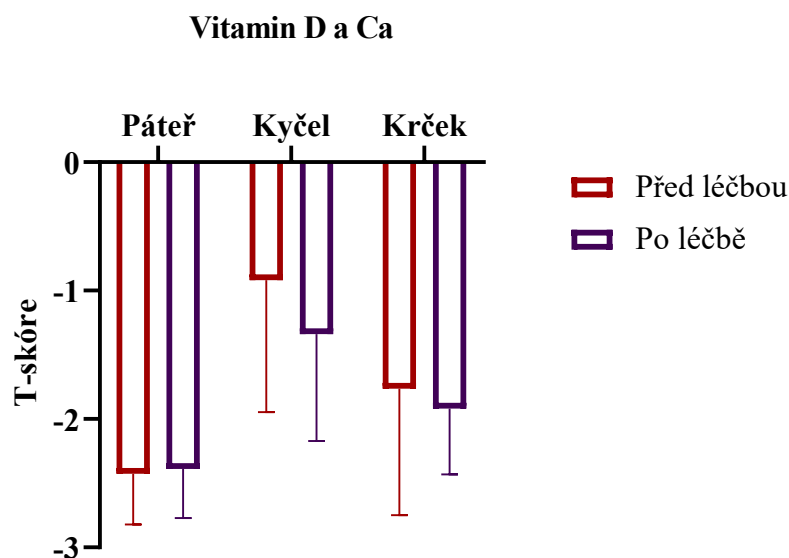
Statisticky významný rozdíl u MK-7 ve skupině užívající Femoralex forte byl očekávaný vzhledem ke složení tablety. Je zajímavé, že nedošlo k statisticky významnému zvýšení hladin 25-OH vitaminu D. Statisticky významný rozdíl 25-OH vitaminu D v kontrolní skupině také potvrdil náš předpoklad. Osteokalcin patří mezi markery kostní novotvorby a jeho statisticky významný rozdíl u kontrolní skupiny nejspíše souvisí se změnou hladin 25-OH vitaminu D.

Při porovnání denzitometrického vyšetření, kde bylo hodnoceno T-skóre v oblasti páteře, femuru a krčku femuru, bylo prokázáno, že u pacientů užívající preparát Femoralex forte došlo k mírnému zlepšení T-skóre v oblasti páteře a femuru. Jak je z obrázku patrné, někteří pacienti dokonce dosáhli po léčbě fyziologických hladin T-skóre. **Obrázek 32** znázorňuje mediány a mezikvartilová rozpětí před léčbou a po léčbě.



Obr. 32 Porovnání T-skóre u pacientů užívající Femoralex forte a stravu bohatou na vápník

U pacientů užívajících vitamin D s vápníkem došlo pouze k mírnému zlepšení T-skóre v oblasti páteře. U zbylých testovaných oblastí došlo k mírnému zhoršení hodnoty T-skóre. **Obrázek 33** ukazuje mediány a mezikvartilová rozpětí před léčbou a po léčbě.



Obr. 33 Porovnání T-skóre u pacientů užívající vitamin D a stravu bohatou na vápník

Z tohoto experimentu je patrné, že u pacientů užívajících vitamin K (MK-7) došlo za šest měsíců ve dvou oblastech měření k mírnému zlepšení T-skóre, zatímco u pacientů užívajících pouze vitamin D bylo prokázáno ve dvou testovaných oblastech mírné zhoršení T-skóre.

Veškeré změny T-skóre v obou skupinách pacientů nebyly statisticky významně rozdílné. Porovnání vlivu Femoralexu forte vůči kontrolní skupině užívající „pouze“ vitamin D bylo prováděno na malém souboru pacientů, a to z důvodu časové náročnosti tohoto experimentu, ale i z důvodu finanční náročnosti a nízké míry spolupráce vybraných pacientů.

Autoři Ushiroyama et al. (Ushiroyama et al., 2002) prokázali zlepšení BMD u pacientů s osteopénií, kteří užívali 45 mg formy MK-4 společně s vitaminem D₃ po dobu dvou let. Hodnoty BMD byly zvýšeny přibližně o 5 %. Stejně tak Shiraki et al. (Shiraki et al., 2007) publikovali výsledky studie, kdy denní příjem 45 mg MK-4 po dobu dvou let měl vliv na zlepšení hodnot BMD a na pokles hladin ucOC. V dnešní době jsou na trhu ale preparáty obsahující především formu MK-7 z důvodu delšího biologického poločasu a lepší biologické dostupnosti. Autoři Knapen et al. (Knapen et al., 2013) prokázali vliv 180 µg formy MK-7 na zlepšení BMD. Pacienti užívali tuto formu po dobu tří let. Zhang et al. (Zhang et al., 2020) testovali vliv 50 µg a 90 µg MK-7 na skupině postmenopauzálních žen a mužů. Autoři prokázali vliv denní dávky 90 µg MK-7 na BMD u skupiny postmenopauzálních žen. Ale tato dávka neměla vliv na zlepšení hodnot BMD mužů. V současné době tento experiment pokračuje a pacienti budou vyhodnoceni po roce užívání Femoralexu forte.

10.3. Stanovení referenčních mezí tří forem vitamínu K

V průběhu tří let se podařilo nasbírat 191 vzorků od zdravých dobrovolníků. Tito dobrovolníci v čase odběru netrpěli žádným metabolickým nebo malabsorpčním onemocněním (celiakie, Crohnova choroba, cystická fibróza či jiné poruchy vstřebávání tuků) a žádný z dobrovolníků neměl onkologické onemocnění. Tito dobrovolníci neužívali žádné vitaminové doplňky stravy. V této skupině převažovaly ženy, které tvořily 78 % skupiny (n = 149) a zbytek skupiny (n = 42) tvořili muži. Dle schválené metodiky Světové zdravotnické organizace byl proveden Wilcoxonův test s korekcí kontinuity k výpočtu referenčních mezí. Všechny statistické výpočty byly prováděny pomocí statistického programu R statistical suite (R Core Team, 2015). Pouze u vitamínu K₁ byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi ženami a muži, kde p-hodnota činila $5,387 \cdot 10^{-6}$. **Tabulka 31** ukazuje referenční rozmezí všech tří stanovovaných forem vitamínu K u střeoevropské populace.

Tab. 31 Referenční rozmezí vitamínu K₁, MK-4 a MK-7

	Vitamin K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
Fyziologické rozmezí	0,044 – 1,357 (ženy) 0,030 – 1,214 (muži)	0,050 – 1,598	0,074 – 0,759
Medián	0,200	0,090	0,190

V odborné literatuře není publikováno referenční rozmezí pro vitamin K₂. Pro vitamin K₁ lze referenční rozmezí dohledat, avšak jednotlivé publikace se velmi odlišují. Odlišnost výsledků přímého stanovení vitamínu K je způsobena tím, že neexistuje standardizovaná metoda, ani postup přípravy vzorku pro přímé stanovení jednotlivých forem vitamínu K. Navíc naměřená data jsou ovlivněna také malým testovaným souborem pacientů nebo dobrovolníků.

Autoři Sadowski et al. (Sadowski et al., 1989) publikovali referenční rozmezí vitamínu K₁ 0,11 – 1,01 ng/ml, zatímco autor Kraemer publikoval referenční rozmezí pro tento vitamin 0,1 – 3,2 ng/ml (Kraemer, 2015). Obě publikovaná referenční rozmezí byla stanovena pomocí HPLC metod.

Někteří autoři měřili vitamin K₁ na poměrně malých skupinách pacientů, např. autoři Tsugawa et al. (Tsugawa et al., 2006) publikovali naměřené hodnoty u 52 premenopauzálních žen ve věku 30 – 49 let, kde se hodnoty vitamínu K₁ nacházely v rozmezí 0,50 – 2,54 ng/ml. Hladiny vitamínu K₁ u skupiny 20 zdravých jedinců publikovali autoři Kamao et al. (Kamao et al., 2005) a Suhara et al. (Suhara et al., 2005). Autoři Kamao et al. (Kamao et al., 2005) uvádí hladiny vitamínu K₁ v rozmezí 0,70 – 2,92 ng/ml. Autoři Suhara et al. (Suhara et al., 2005) naměřili hladiny tohoto vitamínu v rozmezí 0,65 – 1,79 ng/ml.

Publikované koncentrace vitamínu K₂ u zdravé populace vykazují velké rozdíly v získaných datech. Ve většině případů naměřená data z Japonska silně převyšují hladiny získané z evropské populace. Autoři Kamao et al. (Kamao et al., 2005) stanovili hladiny MK-7 od 20 zdravých jedinců v koncentracích $16,27 \pm 20,58$ ng/ml. Tyto koncentrace mohou být způsobeny rozdílnými stravovacími návyky. V Japonsku jsou fermentované potraviny součástí běžné denní stravy. Fermentované potraviny jsou zvláště bohaté na přítomnost vitamínu K₂. Hladiny MK-4 uváděné v této publikaci v koncentraci $0,15 \pm 0,17$ ng/ml jsou vzhledem k našemu referenčnímu rozmezí spíše u spodní hranice.

Vyšší hladiny MK-4 jsou uvedeny v publikaci autorů Sato et al. (Sato et al., 2012), kde hladiny tohoto vitamínu dosahují koncentrace $2,20 \pm 0,38$ ng/ml. Avšak data pro výpočet těchto hladin byla získána ze vzorků od 10 zdravých japonských žen. V této publikaci se nepodařilo stanovit MK-7 na limitem detekce, který byl 0,04 ng/ml. Publikace autorů Fusaro et al. (Fusaro et al., 2012) uvádí získaná data od 62 zdravých starších jedinců. Publikace také uvádí mediány 1,13 ng/ml pro vitamin K₁, 0,84 ng/ml pro MK-4 a 1,43 ng/ml pro MK-7. Hladiny vitamínu K₁ a MK-4 jsou srovnatelné s našimi získanými daty. Medián hodnot pro MK-7 je u této populace vyšší než v naší populaci. To může být opět způsobeno odlišným stravováním, zejména vyšším příjmem zeleniny, sýrů a ryb. Jak již bylo zmíněno v *kapitole 1.7.*, je také možné, že vyšší příjem zeleniny obsahující vitamin K₁ se může v organismu konvertovat na vitamin K₂. Nízké hladiny MK-7 jsou publikovány u 11 mladých zdravých jedinců autorem Suttie (Suttie, 1992), kde je uvedena koncentrace MK-7 $0,29 \pm 0,18$ ng/ml. Forma MK-4 nebyla v této publikaci stanovována. Hladiny vitamínu K₁ zde dosahují $0,51 \pm 0,37$ ng/ml.

Tabulka 32 ukazuje přehled jednotlivých publikací a jejich výsledků. Na stanovení referenčního rozmezí je dle WHO potřeba skupina minimálně 120 jedinců zahrnující jak ženy, tak muže. To žádná z uvedených publikací nesplňuje.

Tab. 32 Hladiny vitamínu K u zdravé populace

Publikace	Oblast	Populace	K ₁ (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
(Suttie, 1992)	Velká Británie	Mladá populace (n = 11)	0,51 ± 0,37	neměřeno	0,29 ± 0,18
(Kamao et al., 2005)	Japonsko	Zdravá populace (n = 20)	1,81 ± 1,11	0,15 ± 0,17	16,27 ± 20,58
(Suhara et al., 2005)	Japonsko	Zdravá populace (n = 20)	1,22 ± 0,57	0,39 ± 0,46	6,37 ± 7,45
Tsugawa et al., 2006)	Japonsko	Premenopauzální ženy 30 – 49 let (n = 52)	1,52 ± 1,02	0,07 ± 0,14	4,96 ± 6,93
(Tsugawa et al., 2006)	Japonsko	Postmenopauzální ženy 50 – 80 let (n = 344)	0,32 ± 0,24	0,02 ± 0,04	1,97 ± 2,80
(Ahmed et al., 2007)	Japonsko	Zdravá populace (n = 6)	1,21 ± 0,15	0,65 ± 0,19	1,51 ± 0,34
(Suttie, 2009)	Velká Británie	Zdravá populace (n = 6)	1,04 ± 0,22	0,41 ± 0,18	1,18 ± 0,22
(Fusaro et al., 2012)	Itálie	Zdravá populace 57 ± 4 roky (n = 62)	1,36 ± 1,08	0,91 ± 0,85	1,95 ± 1,37
(Sato et al., 2012)	Japonsko	Zdravé ženy (n = 10)	neměřeno	2,20 ± 0,38	< LOD (0,04)
(Klapkova et al., 2018)	Česká republika	Postmenopauzální ženy (n = 158)	0,49 ± 0,40	0,83 ± 0,27	1,19 ± 1,08

Námi stanovené referenční rozmezí je uváděno z dat získaných metodou LC-MS/MS. Je nutné podotknout, že publikované hodnoty vitamínu K byly stanoveny většinou za použití HPLC metod s různými postupy přípravy vzorku na poměrně malých skupinách jedinců. Některé publikace se zaměřují při stanovení vitamínů K pouze na ženskou populaci (Klapkova et al., 2018; Sato et al., 2012; Tsugawa et al., 2006). Porovnání našich metod HPLC a LC-MS/MS je uvedeno v *kapitole 11*.

10.4. Pacienti s CF

V období srpen 2018 až červen 2020 bylo nashromážděno 252 vzorků od dětských pacientů z Centra cystické fibrózy FN Motol. U těchto pacientů byly rutinně stanovovány hladiny vitamínu A, vitamínu E a 25-OH vitamínu D. Dále u vybrané skupiny pacientů s CF bylo provedeno stanovení PIVKA-II. Z laboratorního informačního systému byla dohledána hladina protrombinového testu vyjádřeného pomocí INR (z angl. *international normalized ratio*, mezinárodní normalizovaný poměr). Pomocí Shapiro-Wilkova testu

byly analyzovány normality rozložení dat. Pomocí Shapiro-Wilkova testu bylo prokázáno nerovnoměrné rozložení dat u všech tří stanovovaných forem vitamínu K a u 25-OH vitamínu D a vitamínu A (p-hodnota <0,0001). U vitamínu E byla data rozložena rovnoměrně (p-hodnota 0,1217). Z naměřených dat jsme vypočítali průměr, SD, medián a mezikvartilové rozpětí. **Tabulka 33** ukazuje naměřená data pacientů s CF.

Tab. 33 Koncentrace lipofilních vitamínů a hladina INR u pacientů s CF

	Vitamin K (ng/ml)			25-OH vit.D (nmol/l)	Vitamin A (μmol/l)	Vitamin E (μmol/l)	INR
	K ₁	MK-4	MK-7				
Průměr	4,951	0,072	0,325	64,58	1,44	22,0	1,05
SD	14,003	0,095	0,823	24,20	0,48	7,8	0,09
CV	2,828	1,318	2,536	0,37	0,33	0,4	0,08
Medián	0,434	0,045	0,146	61,80	1,40	21,4	1,03
Q1	0,127	0,021	0,077	50,20	1,10	17,3	0,99
Q3	1,933	0,089	0,269	74,95	1,70	26,4	1,08
Rovnoměrnost rozložení dat	NE	NE	NE	NE	NE	ANO	ANO

Hodnoty mediánu u vitamínu K jsou 0,434 ng/ml pro K₁; 0,045 ng/ml pro MK-4 a 0,146 ng/ml pro MK-7. U 25-OH vitamínu D je hodnota mediánu 61,80 nmol/l. Medián vitamínu A byl 1,40 μmol/l a průměrná hodnota vitamínu E 22,0 μmol/l. Substituce vitamínu A, D a E je dětským pacientům podávána na základě výsledků stanovení hladin jednotlivých vitamínů a dalších klinických symptomů onemocnění. Poslední sloupec tabulky hodnotí INR – nepřímý ukazatel stavu hladin vitamínu K v organismu.

Hodnoty vitamínů A, D, E a hodnoty INR jsou v referenčním rozmezí. **Tabulka 34** uvádí jednotlivá referenční rozmezí pro dané vitamíny stanovované na ÚLCHKB 2. LF UK a FN Motol a pro hodnotu INR stanoveném na Oddělení klinické hematologie 2. LF UK a FN Motol.

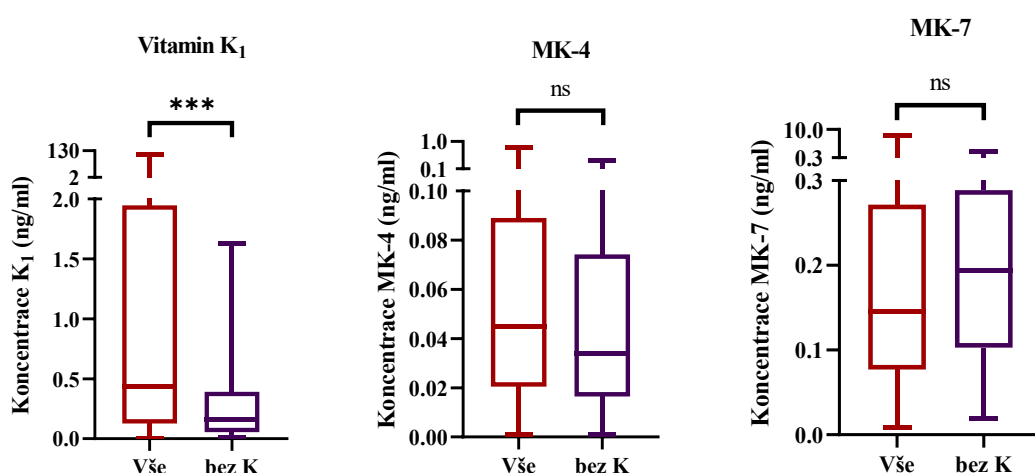
Tab. 34 Referenční rozmezí vitaminů A, D, E a INR

Věk	Vitamin E ($\mu\text{mol/l}$)	Vitamin A ($\mu\text{mol/l}$)	25-OH vit.D (nmol/l)	INR
0 - 42 dní	1,0 - 6,0	1,2 - 2,6	50 - 250	0,8 - 1,2
42 - 365 dní	2,0 - 8,0	1,6 - 3,9		
1 - 15 let	10,0 - 24,0	1,0 - 2,8		
15 - 150 let	11,6 - 46,4	1,9 - 3,1		

Výsledky vitaminu K u dětských pacientů s CF byly porovnány s námi stanoveným referenčním rozmezím dospělé zdravé populace (viz *tabulka 31*). U 83 pacientů nebylo možné detekovat hladiny MK-4, u 72 pacientů nebylo možné detekovat hladiny vitaminu K₁. Koncentrace vitaminu MK-7 bylo možné kvantifikovat u všech pacientů. Mediány vitaminu K₁ a MK-7 poukazují na to, že tyto pacienti se pohybují v referenčním rozmezí zdravé dospělé populace. Medián vitaminu MK-4 je nižší než spodní hranice referenčního rozmezí zdravé dospělé populace. U dětí s cystickou fibrózou je vzhledem k možným krvácivým stavům sledována hladina INR, která by měla korelovat s hladinou vitaminu K₁.

Skupinu dětských pacientů s CF jsme dále rozdělili na pacienty užívající preparáty s vitaminem K a na pacienty neužívající preparáty s přídatkem vitaminu K. Nejčastěji je dětem podáván přípravek Kanavit v tekuté formě. Kanavit obsahuje léčivou látku fytomenadion (vitamin K₁) v koncentraci 20 mg/ml, to odpovídá koncentraci 1 mg v 1 kapce přípravku (Zentiva, 2014). V menší míře je u pacientů předepisována tabletová forma podání přípravku ParaVit-CF, kde je obsažen fytomenadion (vitamin K₁) v koncentraci 5000 μg (= 5mg) na 1 tobolek nebo na 0,25 ml roztoku (NORDIC Pharma, 2018a, 2018b). Podané množství vitaminu K₁ je u pacientů s CF značně rozdílné, od 1 kapky Kanavitu týdně až po 15 kapek Kanavitu denně. Případně byl podán ParaVit-CF v dávce 1 tobolek denně. I přes vysokou dávku Kanavitu (15 mg vitaminu K₁ denně) byla u jednoho dětského pacienta hodnota vitaminu K₁ pod mezí detekce, a přesto nedošlo ke zvýšení hodnoty INR. Na druhou stranu u některých dětí už jen 1 kapka týdně dokázala zvýšit hladinu vitaminu K₁ na 29,623 ng/ml. Nejen z tohoto důvodu je nutné stanovovat hladiny vitaminu K přímo. Nepřímé testy nemusí kvalitně odrážet skutečnou hladinu vitaminu K v organismu. Vyhodnocení výsledků je obtížné také z důvodu, že nevíme, kdy pacient užil doplněk stravy s obsahem vitaminu K.

Pomocí nepárového neparametrického testu (Mann-Whitney test) byla testována statisticky významná rozdílnost dat. U vitamínu K_1 (p-hodnota $<0,0001$) se data statisticky významně liší. Formy MK-4 (p-hodnota 0,2774) a MK-7 (p-hodnota 0,0778) nevykazovaly statisticky významnou rozdílnost dat. Na **obrázku 34** jsou zobrazeny krabicové grafy s vyznačenou minimální a maximální hodnotu, mediánem a IQR. Červený sloupec dat označuje všechny naměřené pacienty s CF a fialový sloupec označuje pacienty s CF neužívající žádný přípravek s vitamínem K. Velké rozpětí dat vitamínu K_1 a formy MK-7 je nejspíše způsobeno odběrem vzorků pro analýzu po požití přípravků s vitamínem K (Kanavit, Paravit CF).

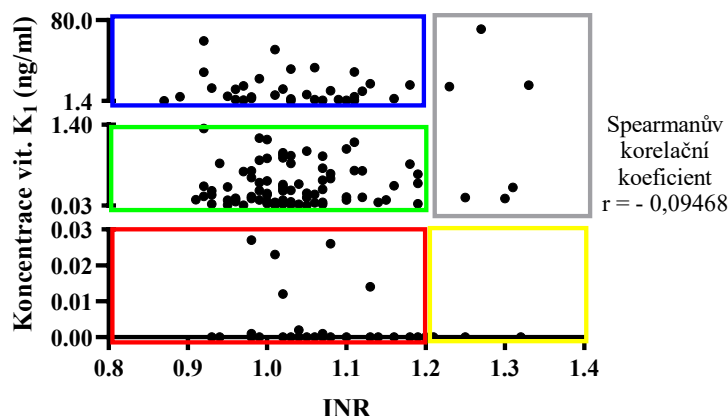


Obr. 34 Vitamin K u všech pacientů s CF a u pacientů s CF neužívajících vitamin K_1

(ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, *** – statisticky významný rozdíl dat)

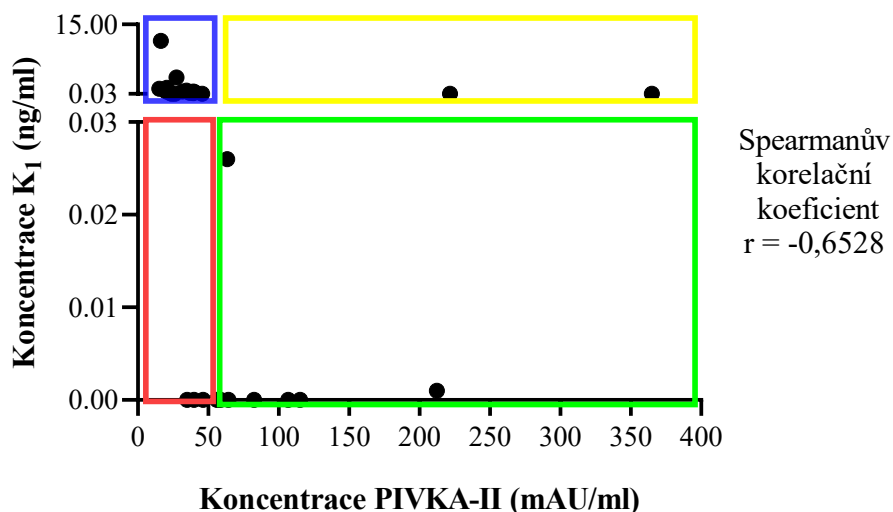
Byla provedena korelace hladin vitamínu K_1 a INR. Hodnota INR nijak nekoreluje s vitamínem K_1 . **Obrázek 35** ukazuje míru korelace vitamínu K_1 a INR. Červeně označené body představují fyziologické hodnoty INR s koncentrací vitamínu K_1 pod referenčním rozmezím. Zeleně označené body označují pacienty s fyziologickým rozmezím INR a fyziologickým rozmezím vitamínu K_1 . U pacientů s CF, u nichž byla naměřena koncentrace vitamínu K_1 vyšší než námi stanovené referenční rozmezí, a kteří měli hodnotu INR v referenčním rozmezí jsou znázorněni v grafu v modrém obdélníku. Vyšší hodnoty INR znázorňuje žlutý obdélník. Fyziologické hladiny vitamínu K_1 nebo hladiny vitamínu K_1 vyšší než námi stanovené referenční rozmezí a zároveň vyšší hodnoty INR jsou znázorněny v šedém obdélníku. Z **obrázku 35** je na první pohled patrné, že i při nedetekovatelných koncentracích vitamínu K_1 se hodnota INR ve valné

většině případů pohybuje v referenčním rozmezí, a proto by hodnota INR neměla patřit mezi nepřímé ukazatele hladiny vitamínu K₁ v organismu.



Obr. 35 Závislost koncentrace vitamínu K₁ na hodnotě INR

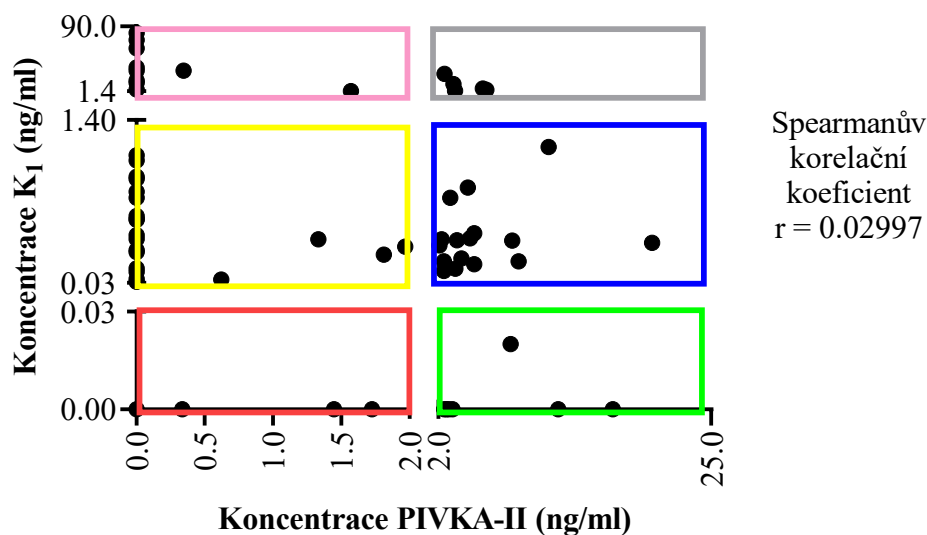
U vybraných pacientů ($n = 33$) byla stanovena hladina PIVKA-II na automatickém imunochemickém analyzátoru Architect. Pomocí Shapiro-Wilkova testu byla prokázána nerovnoměrnost rozložení dat tohoto analytu. Referenční hodnoty pro PIVKA-II uvádí výrobce imunochemické soupravy 17,36 – 50,90 mAU/ml (Abbott Laboratories, 2020). Naměřené hodnoty se u dětí s CF pohybovaly v rozmezí 15,25 – 365,03 mAU/ml s hodnotou mediánu 39,53 mAU/ml. Hodnoty PIVKA-II by měly být zvýšené při nedostatku vitamínu K₁. Korelaci hladin PIVKA-II a vitamínu K₁ ukazuje **obrázek 36**. Z toho lze usoudit, že hladiny fyziologické hladiny PIVKA-II se vyskytují i u pacientů s deficitem vitamínu K₁ (červené ohraničení). Zelené ohraničení znázorňuje pacienty s CF s vyšší hladinou PIVKA-II, kteří měli koncentrace vitamínu K₁ pod námi stanoveným referenčním rozmezím. Pacienti s CF, u kterých byly stanoveny hladiny vitamínu K₁ v referenčním rozmezí nebo nad referenčním rozmezím a současně stanovení PIVKA-II bylo v referenčním rozmezí znázorňuje modrý obdélník. Žlutý obdélník znázorňuje pacienty se zvýšenou koncentrací PIVKA-II, i když u nich byly naměřeny fyziologické hladiny vitamínu K₁. Bohužel stanovení PIVKA-II na automatickém imunochemickém analyzátoru u podobné skupiny pacientů nebylo v odborné literatuře publikováno.



Obr. 36 Závislost koncentrace vitamínu K_1 na koncentraci PIVKA-II (CMIA)

U další vybrané skupiny pacientů ($n = 80$) jsme stanovili koncentraci PIVKA-II pomocí ruční ELISA. Výrobce ELISA soupravy neuvádí žádné doporučené rozmezí PIVKA-II u zdravé populace (MyBioSource, 2020c). U 32,5 % pacientů byla koncentrace vitamínu K_1 pod referenčním rozmezím, u 47,5 % pacientů byla koncentrace vitamínu K_1 v referenčním rozmezí a u 20,0 % pacientů byla koncentrace vitamínu K_1 nad horní hranicí referenčního rozmezí. V publikaci autorů Krzyżanowska et al. (Krzyżanowska et al., 2018) považují za abnormální hodnotu PIVKA-II koncentraci ≥ 2 ng/ml. V našem souboru mělo 65,0 % pacientů hladiny PIVKA-II $< 2,0$ ng/ml. U 35,0 % pacientů byla abnormální koncentrace PIVKA-II ($\geq 2,0$ ng/ml), z toho mělo 25% těchto pacientů nízkou koncentrací vitamínu K_1 . Korelace koncentrací vitamínu K_1 a PIVKA-II je zobrazena na **obrázku 37**. Fyziologické hladiny PIVKA-II ($< 2,0$ ng/ml) jsou zobrazené v červeném, žlutém a růžovém ohraničení, kde červeně orámované body ukazují data pacientů (23,75 %) s koncentrací vitamínu K_1 pod referenčním rozmezím a dle charakteristiky PIVKA-II by měli mít hodnoty tohoto analytu ≥ 2 ng/ml. Žlutě orámované body ukazují pacienty (27,5 %) s fyziologickou hladinou vitamínu K_1 a zde se dalo očekávat, že koncentrace PIVKA-II bude také ve fyziologickém rozmezí ($< 2,0$ ng/ml). Růžově orámované body ukazují pacienty (13,75 %) s koncentrací vitamínu K_1 nad referenčním rozmezím a stejně jako v přechodím případě jsme očekávali hladiny PIVKA ve fyziologickém rozmezí ($< 2,0$ ng/ml). Abnormální koncentrace PIVKA-II ($\geq 2,0$ ng/ml) jsou zobrazeny v zeleném, modrém a šedém orámování, kde zeleně ohraničené body ukazují pacienty (8,75 %) s koncentrací vitamínu K_1

pod referenčním rozmezím. Tito pacienti mají dle očekávání abnormální hladiny PIVKA-II ($\geq 2,0$ ng/ml). Modře ohraničené body ukazují pacienty (20,00 %) s fyziologickou hladinou vitamínu K_1 , a přesto byla u této skupiny pacientů naměřena abnormální hladina PIVKA-II ($\geq 2,0$ ng/ml). Šedě ohraničené body ukazují pacienty (6,25 %) s koncentrací vitamínu K_1 nad referenčním rozmezím, kde jsme jako v přechozím případě očekávali fyziologické hladiny PIVKA-II, a přesto tito pacienti i přes vysoké hladiny vitamínu K_1 mají abnormální hladiny PIVKA-II ($\geq 2,0$ ng/ml). Z tohoto experimentu je patrné, že nepřímé testy nedostatečně reagují na hladiny vitamínu K_1 , a proto by neměly být používány k hodnocení stavu zásob vitamínu K_1 v organismu.



Obr. 37 Závislost koncentrace vitamínu K_1 na koncentraci PIVKA-II (ELISA)

V odborné literatuře je popsáno pouze několik studií, kde stanovují přímo vitamin K u pacientů s CF, a proto jsou diskutována i nepřímá stanovení hladin vitamínu K. V publikaci autorů Krzyżanowska et al. (Krzyżanowska et al., 2018) se nacházejí data od 79 pacientů s CF ve věku 0,4 – 25,3 let. Tato publikace ukazuje, že u 71 % pacientů s CF je abnormální hladina PIVKA-II (≥ 2 ng/ml). Zároveň bylo u této skupiny pacientů stanoveno procentuální zastoupení ucOC, kdy 57 % pacientů s CF mělo patologické hodnoty. V této publikaci vyhodnotili, že pokud má daný pacient dvě vážné mutace v obou alelách genu pro CF, jsou u něho prokázány patologické hodnoty PIVKA-II a patologické procentuální zastoupení ucOC/OC. Zvýšené hladiny PIVKA-II u pacientů s CF a pankreatickou insuficiencí jsou také popsány v publikaci autorů Rashid et al.

(Rashid et al., 1999). Pankreatická insuficience, závažná mutace obou alel genu pro CF a žádná suplementace vitamínem K u pacientů s CF má zřejmě také vliv na patologické procentuální zastoupení ucOC u dospělých, jelikož se vyskytuje častěji než u pacientů s CF a fyziologickou pankreatickou funkcí (Krzyżanowska et al., 2015). Autoři Tokgöz et al. (Tokgöz et al., 2018) ve své publikaci stanovovali vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E a K₁) u dětí s celiakií. Vitamin D byl stanován pomocí chemiluminiscenční imunoanalýzy a ostatní vitaminy pomocí kompetitivní enzymové imunoanalýzy. V této publikaci je kromě dětské populace s celiakií (n = 52) uvedena také kontrolní dětská zdravá populace (n = 50). U zdravé populace byl naměřen vitamin K₁ v koncentraci $0,828 \pm 0,220$ ng/ml, což odpovídá zhruba dvojnásobku hodnot u naší dětské populace s CF. Dokonce hladiny vitamínu K₁ u dětí s celiakií se příliš nelišily od jejich kontrolní skupiny a dosahovaly koncentrací $0,713 \pm 0,286$ ng/ml.

Vitamin K je poslední z lipofilních vitamínů, který se rutinně u pacientů s CF nestanovuje, i přestože jsou pacientům podávány přípravky obsahující tento vitamin. Pro sledování zásob vitamínu K v organismu se využívá nejčastěji INR, které na změnu hladin vitamínu K reaguje pomalu. Při porovnání dat všech pacientů s CF a pacientů s CF neužívající vitamin K je patrný rozdíl dat u vitamínu K₁. Mediány formy MK-4 jsou pod dolní hranicí námi stanoveného referenčního rozmezí u zdravé populace. Mediány formy MK-7 se pohybují na dolní hranici námi stanoveného referenčního rozmezí u zdravé populace. Nízké hladiny vitamínu K₂ mohou vypovídat i o zhoršené absorpci či střevní produkci těchto forem vitamínů.

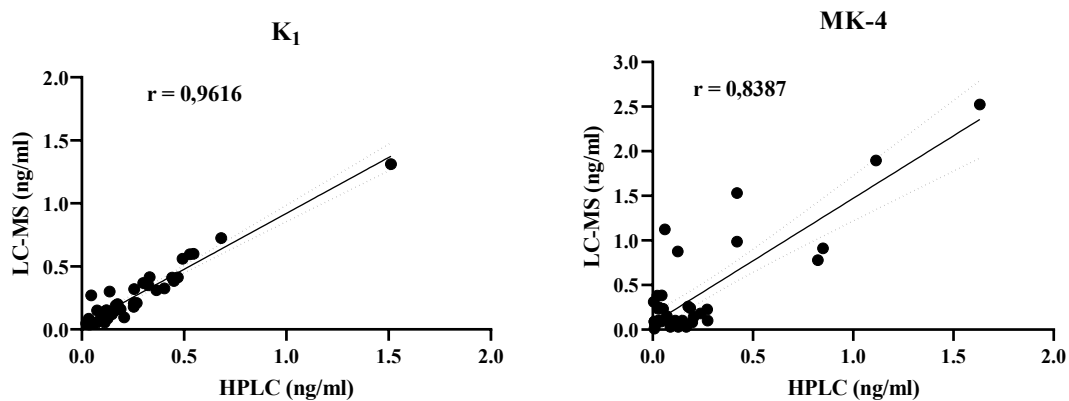
11. Porovnání stanovení vitamínu K pomocí metod HPLC a LC-MS/MS

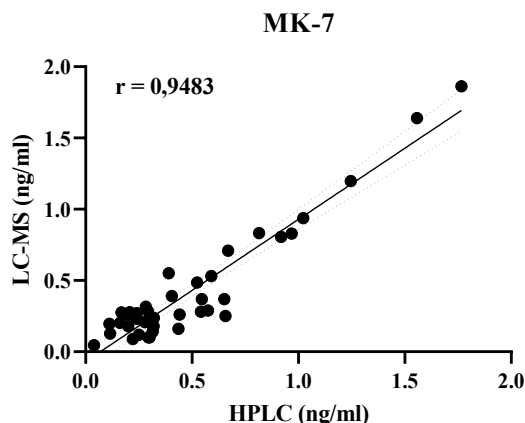
Vitamin K se postupně dostává do podvědomí nejen odborné společnosti ale i laické veřejnosti, a to díky jeho účinkům. Některé volně dostupné preparáty jsou již obohaceny vitamínem K zejména vitamínem K₂ formou MK-7. Odborná literatura poskytuje pouze několik publikovaných metod na stanovení vitamínu K. Komerčně dostupné soupravy slouží zejména pro stanovení vitamínu K₁. Avšak široká škála funkcí vitamínu K₂ nutí výzkumné pracovníky vyvíjet metodiky na stanovení nejen vitamínu K₁, ale i různých forem vitamínu K₂ zejména výše uváděné formy MK-7. Publikace, které se zaměřují na stanovení tohoto vitamínu, většinou vyžadují chromatografické sestavy a poměrně náročné předúpravy vzorku. Proto se stanovení vitamínu K v laboratořích provádí minimálně a pouze pro výzkumné účely.

Naším dalším cílem bylo porovnat metody HPLC a LC-MS/MS vyvinuté na ÚLCHKB. Porovnání bylo provedeno na celkem 40 patientských vzorcích. Vzhledem k náročnosti přípravy vzorku a poměrně vysoké spotřebě biologického materiálu nebyla volena větší skupina pro toto porovnání. Pomocí Shapiro-Wilkova testu byla testována normalita rozložení dat. Data ve všech případech (obě metody a všechny formy vitamínu K) vykazovala nerovnoměrné rozložení (p -hodnota $<0,0001$), a proto byla dále zpracována pomocí neparametrických testů. **Tabulka 35** ukazuje vypočtené mediány s kvartily. **Obrázek 38** znázorňuje korelační analýzu obou metod u všech forem vitamínu K.

Tab. 35 Mediány a kvartily vitamínu K při porovnání HPLC metody s LC-MS metodou

Vitamin K (ng/ml)						
Metoda	K ₁		MK-4		MK-7	
	HPLC s FLD	LC-MS/MS	HPLC s FLD	LC-MS/MS	HPLC s FLD	LC-MS/MS
Medián	0,171	0,185	0,107	0,122	0,320	0,273
Q1	0,108	0,095	0,035	0,068	0,241	0,184
Q3	0,357	0,364	0,202	0,363	0,637	0,519

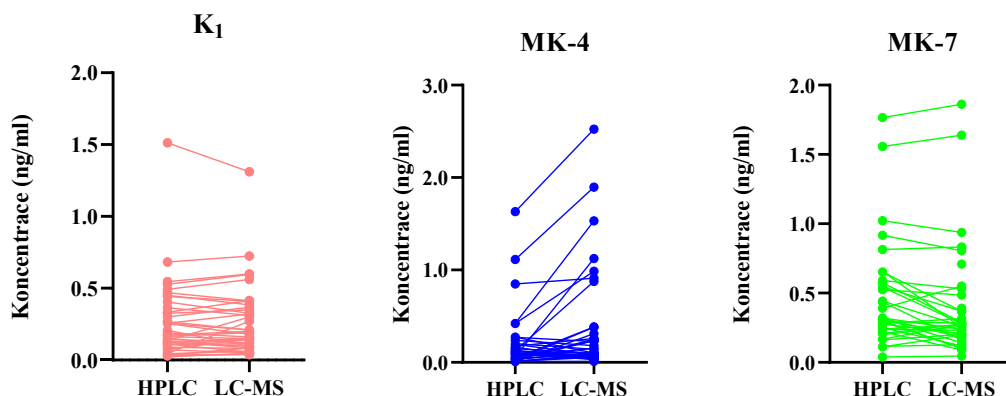




Obr. 38 Korelační analýzy vitamínu K_1 , MK-4 a MK-7

I když příprava vzorků je pro obě metody stejná, hodnoty obou metod se v některých případech liší. Porovnání metod je vyznačeno korelační křivkou včetně vyznačeného intervalu spolehlivosti. U každé z korelačních křivek je uveden Spearmanův korelační koeficient. U vitamínu K_1 dosahuje Spearmanův korelační koeficient hodnoty 0,9616. Data vitamínu K_1 získaná měřením pomocí metody HPLC s FLD mohou být ovlivněna použitím vnitřního standardu, který je analogem vitamínu K_1 a mohl by v některých případech interferovat do píku vitamínu K_1 . Nejvhůře porovnatelnou formou vitamínu K je forma MK-4, kde Spearmanův korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,8387. Tuto skutečnost si lze vysvětlit pouze tím, že při použití metody HPLC s FLD nelze minimalizovat některé interference, které se s použitím této metody pojí, např. lipidové interference lipidů. Navíc metoda HPLC s FLD používá ke kvantitativnímu hodnocení formy MK-4 analog vitamínu K_1 jako vnitřní standard, který ovšem není schopen zachytit či minimalizovat případné odchylky v náročné přípravě vzorku. Zatímco metoda LC-MS/MS využívá pro každou formu vitamínu K izotopově značený standard dané formy vitamínu, který lépe pokryje případné nedostatky v přípravě vzorků, jelikož eluce jednotlivých forem vitamínu K za použití SPE probíhá v různých objemech elučního roztoku. U formy MK-7 dosahoval Spearmanův korelační koeficient hodnoty 0,9483.

Obrázek 39 ukazuje jednotlivá data získaná pomocí obou metod a porovnaná párovým neparametrickým t-testem. Na první pohled je patrné, že největší rozdíly jsou u stanovení formy MK-4. V odborné literatuře neexistují data, která by porovnávala různé metody stanovení vitamínu K. U obou metod nebyl zaznamenán žádný problém při vyhodnocování interních kontrol kvality, přesto se hodnoty formy MK-4 měřené různými metodami v některých hladinách mezi sebou významně odlišují. Z tohoto důvodu je velmi důležité používat externí kontroly kvality.



Obr. 39 Párový neparametrický t-test vitaminu K₁, MK-4 a MK-7

V důsledku odlišnosti stanovení formy MK-4 je nutné uvádět, kterou metodou bylo stanovení prováděno, a je zřejmé, že tyto obě metody se nedají zaměnit. Zbylé dvě formy vitaminu K (vitamin K₁ a MK-7) nevykazují statisticky významnou odlišnost mezi použitými metodami.

V literatuře jsme našli pouze jedno porovnání HPLC metody s FLD s LC-APCI/MS metodou (Kamao et al., 2005). Tito autoři publikovali porovnání na 10 pacientek s osteoporózou léčených vitaminem K formou MK-4. **Tabulka 36** ukazuje publikovaná data z obou metod.

Tab. 36 Porovnání HPLC s FLC a LC-APCI/MS

Přeloženo z původního zdroj: (Kamao et al., 2005)

Soubor	Metoda	Vitamin K (ng/ml, průměr ± SD)		
		K ₁	MK-4	MK-7
Pacienti s OP (n = 10)	HPLC s FLD	0,621 ± 0,245	46,83 ± 46,41	4,179 ± 6,281
	LC-APCI/MS	0,850 ± 0,272	51,89 ± 44,88	4,128 ± 6,373

Na první pohled je patrné, že se tyto data mezi sebou příliš neliší. Korelační koeficienty byly uváděny 0,979 pro vitamin K₁, 0,988 pro MK-4 a 0,986 pro MK-7. Nevýhodou této korelace je porovnání vysokých hodnot MK-4. Naše porovnání ukazuje, že právě v nízkých hladinách MK-4 se tyto metody nejvíce liší.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu a LC-MS/MS metodu pro přímé stanovení vitamínu K. Dalším cílem bylo stanovit referenční meze jednotlivých forem vitamínu K u zdravé populace. Dále bylo provedeno stanovení vitamínu K u několika různých skupin pacientů např. pacienti s osteoporózou, s osteopénií nebo pacienti s CF. Posledním cílem bylo porovnání obou chromatografických metod. Vitamin K by se měl stát součástí rutinního vyšetření v klinických laboratořích, i přes zdlouhavou přípravu vzorku. Nepřímé stanovení vitamínu K nedostatečně odráží změny hladin vitamínu K v organismu, a proto tyto testy nejsou vhodné ke sledování hladin vitamínu K. Vliv vitamínu K₂ lze prokázat pomocí denzitometrického vyšetření, pokud je vitamin K₂ užíván alespoň půl roku.

Tato disertační práce splnila všechny uvedené cíle práce.

Stanovení vitamínu K u postmenopauzálních žen pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení tří forem vitamínu K, která byla úspěšně validována. Variační koeficienty a hodnoty bias u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti nepřesáhly 15 %. Robustnost metody byla testována při různé teplotě skladování vzorků (4 °C; -20 °C; -70 °C). Při uskladnění vzorků séra při -70 °C byla zjištěna nejmenší změna oproti původní hodnotě vitamínů K.

Stanovení hladin vitamínů K pomocí metody HPLC bylo provedeno u 192 postmenopauzálních žen s prokázanou osteoporózou a u 158 postmenopauzálních žen bez diagnostikované osteoporózy. U těchto skupin pacientek byla prokázána statisticky významná rozdílnost u formy MK-7.

Vývoj a validace metody pro stanovení tří forem vitamínu K pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

V této disertační práci byla vyvinuta LC-MS/MS metoda za použití ionizace elektrosprejem pro stanovení vitamínu K₁ a dvou forem vitamínu K₂ – MK-4 a MK-7 v séru. Metoda byla úspěšně kalibrována a poté byla stanovena přesnost a pravdivost za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Variační koeficienty a hodnoty bias u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti nepřesáhly hladinu 15 %. V rámci stanovení robustnosti metody byla testována stabilita vyextrahovaného vzorku v chlazeném

autosampleru po dobu jednoho týdne. Hladiny vitaminů K neklesly o více jak 11 %. Metoda dosahuje nízkých limitů kvantifikace u všech forem vitaminu K.

Stanovení vitaminu K u zdravé populace a vytvoření referenčního rozmezí pro jednotlivé formy vitaminu K.

Ze souboru 191 zdravých dospělých dobrovolníků byly vypočítány referenční meze pro jednotlivé formy vitaminu K. Pro vitamin K₂ nebyly dosud publikovány žádné referenční meze. Pro vitamin K₁ lze v odborné literatuře referenční meze nalézt, avšak jednotlivé publikace se mezi sebou odlišují.

Vliv užívání vitaminu K₂ na kostní hmotu u pacientů s osteopénií.

U pacientů s osteopénií, kteří kromě vitaminu D₃ a stravy bohaté na vápník užívali ještě vitamin K₂, byl prokázán pozitivní vliv na kostní hmotu. Bylo provedeno denzitometrické vyšetření, které prokázalo mírné zlepšení T-skóre v oblasti páteře a kyčle.

Zatímco u léčby „pouze“ vitaminem D₃ a stravou bohatou na vápník bylo prokázáno mírné zhoršení hodnot T-skóre v oblasti kyčle a krčku femuru.

Stanovení vitaminu K a proteinu indukovaného nedostatkem vitaminu K (PIVKA-II) u dětských pacientů s cystickou fibrózou a porovnání těchto výsledků se zdravou populací.

Z důvodu obtížného stanovení vitaminu K jsou k posouzení stavu hladin tohoto vitaminu v organismu využívány tzv. nepřímá stanovení. Nepřímá stanovení nedokážou rychle reagovat na případné změny hladin. U pacientů s CF je podáván vitamin K a u těchto pacientů je sledována hodnota INR. V této práci jsou uvedeny případy pacientů s CF, u kterých byla hladina vitaminu K₁ nedetekovatelná, a přesto měli tyto pacienti fyziologické hodnoty INR a PIVKA-II.

Porovnání stanovení vitaminu K pomocí metod HPLC a LC-MS/MS.

Bylo provedeno porovnání HPLC metody a LC-MS/MS metody pro stanovení vitaminu K. U vitaminu K₁ a vitaminu K₂ formy MK-7 lze považovat obě metody za shodné. Byla zjištěna rozdílnost dat u vitaminu K₂ formy MK-4, kde zejména v nízkých koncentracích dochází k významným rozdílům mezi naměřenými daty. Z tohoto důvodu je nutné u prezentovaných výsledků popsat, jakou metodou byla naměřená data získána. Právě u metody HPLC s FLD nelze minimalizovat některé

interference, které se s použitím této metody pojí např. interference lipidů. Navíc metoda HPLC s FLD používá ke kvantitativnímu hodnocení formy MK-4 analog vitamínu K₁ jako vnitřní standard, který ovšem není schopen zachytit či minimalizovat případné odchylky v náročné přípravě vzorku. U LC-MS/MS metody byly využívány pro každou formu vitamínu K izotopově značené standardy, které lépe pokryjí případné nedostatky v přípravě vzorků.

Stanovení vitamínu K u postmenopauzálních žen pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Byla vyvinuta HPLC metoda pro stanovení tří forem vitamínu K, která byla úspěšně validována. Variační koeficienty a hodnoty bias u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti nepřesáhly 15 %. Robustnost metody byla testována při různé teplotě skladování vzorků (4 °C; -20 °C; -70 °C). Při uskladnění vzorků séra při -70 °C byla zjištěna nejmenší změna oproti původní hodnotě vitamínů K.

Stanovení hladin vitamínů K pomocí metody HPLC bylo provedeno u 192 postmenopauzálních žen s prokázanou osteoporózou a u 158 postmenopauzálních žen bez diagnostikované osteoporózy. U těchto skupin pacientek byla prokázána statisticky významná rozdílnost u formy MK-7.

Vývoj a validace metody pro stanovení tří forem vitamínu K pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS).

V této disertační práci byla vyvinuta LC-MS/MS metoda za použití ionizace elektrosprejem pro stanovení vitamínu K₁ a dvou forem vitamínu K₂ – MK-4 a MK-7 v séru. Metoda byla úspěšně kalibrována a poté byla stanovena přesnost a pravdivost za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Variační koeficienty a hodnoty bias u opakovatelnosti a reprodukovatelnosti nepřesáhly hladinu 15 %. V rámci stanovení robustnosti metody byla testována stabilita vyextrahovaného vzorku v chlazeném autosampleru po dobu jednoho týdne. Hladiny vitamínů K neklesly o více jak 11 %. Metoda dosahuje nízkých limitů kvantifikace u všech forem vitamínu K.

Stanovení vitamínu K u zdravé populace a vytvoření referenčního rozmezí pro jednotlivé formy vitamínu K.

Ze souboru 191 zdravých dospělých dobrovolníků byly vypočítány referenční meze pro jednotlivé formy vitamínu K. Pro vitamín K₂ nebyly dosud publikovány žádné

referenční meze. Pro vitamin K₁ lze v odborné literatuře referenční meze nalézt, avšak jednotlivé publikace se mezi sebou odlišují.

Vliv užívání vitaminu K₂ na kostní hmotu u pacientů s osteopénií.

U pacientů s osteopénií, kteří kromě Vigantolu (vitamin D) a Ca užívali ještě vitamin K₂ byl prokázán pozitivní vliv na kostní hmotu. Bylo provedeno denzitometrické vyšetření, které prokázalo mírné zlepšení T-skóre v oblasti páteře a kyčle.

Zatímco u léčby „pouze“ vitaminem D a vápníkem bylo prokázáno mírné zhoršení hodnot T-skóre v oblasti kyčle a krčku femuru.

Stanovení vitaminu K a proteinu indukovaného nedostatkem vitaminu K (PIVKA-II) u dětských pacientů s cystickou fibrózou a porovnání těchto výsledků se zdravou populací.

Z důvodu obtížného stanovení vitaminu K jsou k posouzení stavu hladin tohoto vitaminu v organismu využívány tzv. nepřímá stanovení. Nepřímá stanovení nedokážou rychle reagovat na případné změny hladin. U pacientů s CF je podáván vitamin K a u těchto pacientů je sledována hladina INR. V této práci jsou uvedeny případy pacientů s CF, u kterých byla hladina vitaminu K₁ nedetekovatelná, a přesto měli tito pacienti fyziologické hodnoty INR a PIVKA-II.

Porovnání stanovení vitaminu K pomocí metod HPLC a LC-MS/MS.

Bylo provedeno porovnání HPLC metody a LC-MS/MS metody pro stanovení vitaminů K. U vitaminu K₁ a vitaminu K₂ formy MK-7 lze považovat obě metody za shodné. Byla zjištěna statisticky významná rozdílnost dat u vitaminu K₂ formy MK-4, kde zejména v nízkých koncentracích dochází k významným rozdílům mezi naměřenými daty. Z tohoto důvodu je nutné u prezentovaných výsledků popsat, jakou metodou byla naměřená data získána. Právě u metody HPLC s FLD nelze minimalizovat některé interference, které se s použitím této metody pojí např. lipidové interference. Navíc metoda HPLC s FLD používá ke kvantitativnímu hodnocení formy MK-4 analog vitaminu K₁ jako vnitřní standard, který ovšem není schopen zachytit či minimalizovat případné odchylky v náročné přípravě vzorku. U LC-MS/MS metody byly využívány pro každou formu vitaminu K izotopově značené standardy, které lépe pokryjí případné nedostatky v přípravě vzorků.

SOUHRN

Vitamin K patří mezi poslední z lipofilních vitaminů, který není v klinických laboratořích rutinně stanovován. Vitamin K působí jako důležitý kofaktor posttranslační γ -karboxylace glutamové kyseliny u vitamin K dependentních proteinů (např. osteokalcin, koagulační faktory II, VII, IX, X). Při nedostatku vitaminu K nejsou tyto proteiny dostatečně karboxylovány a nejsou plně funkční. Deficit vitaminu K bývá spojován s rizikem rozvoje osteoporózy a vyskytuje se např. u malabsorpčních syndromů (pacienti s CF, pacienti s celiakií). Cílem práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu a LC-MS/MS metodu pro stanovení tří forem vitaminu K – vitaminu K₁, MK-4 a MK-7 v séru. Po úspěšné validaci obou metod bylo provedeno stanovení těchto vitaminů u různých skupin pacientů a u zdravé populace. Metodou HPLC bylo stanoveno 350 patientských vzorků, které byly rozděleny do dvou skupin. První skupinu tvořily postmenopauzální ženy s diagnostikovanou osteoporózou a druhou skupinu tvořily postmenopauzální ženy bez diagnostikované osteoporózy.

Metodou LC-MS/MS bylo celkem stanoveno 946 vzorků, a to u pacientů s osteoporózou, u pacientů bez prokázané osteoporózy, u zdravých dobrovolníků, u pacientů s osteopénií a u pacientů s CF. Bylo stanoveno referenční rozmezí jednotlivých forem vitaminu K u zdravé populace pomocí LC-MS/MS.

Dalším cílem bylo porovnat účinnost léčby pacientů s osteopénií užívajících kromě vitaminu D a vápníku navíc vitamin K₂ - formu MK-7. Jedné skupině pacientů s osteopénií byl podáván přípravek Femoralex forte (PharmaSuisse Laboratories) obsahující vitamin K₂, vitamin D₃ a laktoferin, zatímco druhé (kontrolní) skupině byl podáván vitamin D₃. U skupiny pacientů užívajících vitamin K₂ bylo po šesti měsících prokázáno mírné zlepšení BMD.

Posledním cílem bylo porovnání koncentrací vitaminu K stanovených pomocí metody HPLC s fluorescenční detekcí a LC-MS/MS metody. Statisticky rozdílná data byla prokázána u formy MK-4 zejména v nízkých koncentracích.

SUMMARY

Vitamin K belongs to the family of fat-soluble vitamins, which is not determined in clinical laboratories. It is a cofactor necessary for posttranslational γ -carboxylation of glutamyl residues in selected proteins such as the osteocalcin, and procoagulation factors II, VII, IX, X. Vitamin K deficient individuals appear to have more undercarboxylated proteins, which are functionally defective. Lack of this vitamin has been associated with risk of developing osteoporosis and cardiovascular diseases. The aim of this work was to develop and validate the HPLC method and the LC-MS/MS method for determination of three vitamin K's forms – vitamin K₁, MK-4 and MK-7 in serum. After successful validation of both methods, patient samples and healthy population samples were measured. There were measured 350 patient samples by HPLC method. These samples were divided into two groups – patients with diagnostic of osteoporosis and patients without osteoporosis.

We measured 946 samples by LC-MS/MS method. Samples were divided into groups: patients with osteoporosis, patients without osteoporosis, healthy population, patients with osteopenia and patients with cystic fibrosis. The reference range of vitamin K in healthy population was obtained by LC-MS/MS method.

The next aim was to compare the effectiveness of treatment of patients with osteopenia who were taking extra vitamin K₂ (MK-7) in addition to vitamin D and calcium. The first group of patients was treated with Femoralex forte (PharmaSuisse Laboratories) containing vitamin K₂, vitamin D₃ and lactoferrin. The second (control) group was treated with vitamin D₃. There was a slight improvement in BMD in patients taking vitamin K₂ after six months of the treatment.

The last aim was to compare vitamin K concentrations measured by HPLC method and LC-MS/MS method. The result showed a significant difference in concentrations of MK-4, especially in low concentrations.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Abbott Laboratories, 2020. ARCHITECT PIVKA-II REAGENT KIT (2P4825).
2. Ahmed, S., Kishikawa, N., Nakashima, K., Kuroda, N., 2007. Determination of vitamin K homologues by high-performance liquid chromatography with on-line photoreactor and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* 591, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.061>
3. Akbari, S., Rasouli-Ghahroudi, A.A., 2018. Vitamin K and Bone Metabolism: A Review of the Latest Evidence in Preclinical Studies. *BioMed Research International* 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/4629383>
4. Altiok, E., Marx, N., 2018. Oral anticoagulation. *Deutsches Aerzteblatt Online*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0776>
5. Bayer, Mud.M., 2008. Vitaminy rozpustné v tucích. *Vnitřní Lékařství* 4, 235–237.
6. Beavan, S.R., Prentice, A., Stirling, D.M., Dibba, B., Yan, L., Harrington, D.J., Shearer, M.J., 2005. Ethnic differences in osteocalcin γ -carboxylation, plasma phylloquinone (vitamin K1) and apolipoprotein E genotype. *Eur J Clin Nutr* 59, 72–81. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602037>
7. Better Health Channel, 2019. Osteoporosis [WWW Document]. URL <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/ConditionsAndTreatments/osteoporosis>
8. Beulens, J.W.J., van der A, D.L., Grobbee, D.E., Sluijs, I., Spijkerman, A.M.W., van der Schouw, Y.T., 2010. Dietary Phylloquinone and Menaquinones Intakes and Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 33, 1699–1705. <https://doi.org/10.2337/dc09-2302>
9. Boisen, I.M., Bøllehuus Hansen, L., Mortensen, L.J., Lanske, B., Juul, A., Blomberg Jensen, M., 2017. Possible influence of vitamin D on male reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 173, 215–222.
10. Booth, S.L., Broe, K.E., Peterson, J.W., Cheng, D.M., Dawson-Hughes, B., Gundberg, C.M., Cupples, L.A., Wilson, P.W.F., Kiel, D.P., 2004. Associations between Vitamin K Biochemical Measures and Bone Mineral Density in Men and Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 4904–4909. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031673>
11. Broulík, P., 2009. Osteoporóza a její léčba : průvodce ošetřujícího lékaře, 2. rozšířené. ed. Maxdorf, Praha.
12. Bye, A.M., Muller, D.P., Wilson, J., Wright, V.M., Mearns, M.B., 1985. Symptomatic vitamin E deficiency in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 60, 162–164. <https://doi.org/10.1136/adc.60.2.162-a>

13. Cancela, M.L., Conceição, N., Laizé, V., 2012. Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification? *Advances in Nutrition* 3, 174–181.
<https://doi.org/10.3945/an.111.001685>
14. Carr, S.B., Dinwiddie, R., 1996. Annual review or continuous assessment? 89, 5.
15. Čepová, Mud.J., Kolářová, J., Pechová, M., Kotaška, R., Kotaška, K., 2012. Kazuistiky z osteologické ambulance. *Interní medicína* 14, 78–80.
16. CF registr, 2020. Český registr cystické fibrózy [WWW Document]. URL <https://cfregistr.cz/>
17. Craft, N.E., Park, H., 2011. Factors Affecting Vitamin K Analysis in Serum, Food and Dietary Supplements [WWW Document]. URL https://cdnmedia.eurofins.com/eurofins-us/media/1710478/craft-vit-k-poster_2.pdf
18. Cui, R., He, J., Zhang, F., Wang, B., Ding, H., Shen, H., Li, Y., Chen, X., 2003. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAI) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to α -fetoprotein. *Br J Cancer* 88, 1878–1882. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601018>
19. Dahlberg, S., Ede, J., Schurgers, L., Vermeer, C., Kander, T., Klarin, B., Schött, U., 2018. Desphospho-Uncarboxylated Matrix-Gla Protein Is Increased Postoperatively in Cardiovascular Risk Patients. *Nutrients* 10, 46.
<https://doi.org/10.3390/nu10010046>
20. Dalmeijer, G.W., van der Schouw, Y.T., Booth, S.L., de Jong, P.A., Beulens, J.W.J., 2014. Phylloquinone Concentrations and the Risk of Vascular Calcification in Healthy Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34, 1587–1590. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303853>
21. Dismore, M.L., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Peterson, J.W., Booth, S.L., 2003. Vitamin K content of nuts and fruits in the US diet. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 103, 1650–1652.
<https://doi.org/10.1016/j.jada.2003.09.028>
22. Ebrahimzadeh Attari, V., Shahvegharasl, Z., Fathalizadeh, P., Pourasghary, S., Mohajel Shoja, M., Niknafs, B., Ardalan, M.R., 2019. The association of serum dephosphorylated-uncarboxylated matrix gamma carboxyglutamate protein (dp-ucMGP) as a marker of vascular vitamin K status with allograft function in kidney transplant recipients. *J Nephrothol* 9, e24–e24.
<https://doi.org/10.34172/jnp.2020.24>
23. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2017. Dietary reference values for vitamin K. *EFSA Journal* 15, 78.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4780>

24. El-Kamshoushi, A.A.M., Hassan, E.M., Hassaan, P.S., 2017. Evaluation of serum level of Osteocalcin hormone in male infertility. *Andrologia* 49, e12755. <https://doi.org/10.1111/and.12755>
25. Erdman, J.W., Macdonald, I.A., Zeisel, S.H., 2012. Present Knowledge in Nutrition, Tenth Edition. International Life Sciences Institute.
26. European Medicines Agency, 2011. Guideline on bioanalytical method validation (No. Rev.1 Adopted). European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, London, United Kingdom.
27. Fajfrová, Mud.J., 2011. Vitaminy a jejich funkce v organismu. *Interní medicína* 13, 466–468.
28. Ferland, G., 2012. The Discovery of Vitamin K and Its Clinical Applications. *Annals of Nutrition and Metabolism* 61, 213–218. <https://doi.org/10.1159/000343108>
29. Fila, L., 2017. Cystická fibróza dospělých. *Vnitřní Lékařství* 63, 9.
30. Fusaro, M., Gallieni, M., Rizzo, M.A., Stucchi, A., Delanaye, P., Cavalier, E., Moysés, R.M.A., Jorgetti, V., Iervasi, G., Giannini, S., Fabris, F., Aghi, A., Sella, S., Galli, F., Viola, V., Plebani, M., 2017. Vitamin K plasma levels determination in human health. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 55, 789–799. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0783>
31. Fusaro, M., Noale, M., Viola, V., Galli, F., Tripepi, G., Vajente, N., Plebani, M., Zaninotto, M., Guglielmi, G., Miotto, D., Dalle Carbonare, L., D'Angelo, A., Naso, A., Grimaldi, C., Miozzo, D., Giannini, S., Gallieni, M., for the VItamin K Italian (VIKI) Dialysis Study Investigators, 2012. Vitamin K, vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality: VItamin K Italian (VIKI) dialysis study. *J Bone Miner Res* 27, 2271–2278. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1677>
32. Fuschová, M., Topolčan, O., Vrzalová, J., Novák, J., Šmejkal, J., 2013. Deficit vitamínu D. *Medicína po promoci* 1, 51–56.
33. Geleijnse, J.M., Vermeer, C., Grobbee, D.E., Schurgers, L.J., Knapen, M.H.J., van der Meer, I.M., Hofman, A., Witteman, J.C.M., 2004. Dietary Intake of Menaquinone Is Associated with a Reduced Risk of Coronary Heart Disease: The Rotterdam Study. *The Journal of Nutrition* 134, 3100–3105. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.3100>
34. Gheorghe, S.R., Crăciun, A.M., 2016. Matrix Gla protein in tumoral pathology. *Medicine and Pharmacy Reports* 89, 319–321. <https://doi.org/10.15386/cjmed-579>
35. Girolami, A., Ferrari, S., Cosi, E., Santarossa, C., Randi, M.L., 2018. Vitamin K-Dependent Coagulation Factors That May be Responsible for Both Bleeding and Thrombosis (FII, FVII, and FIX). *Clinical and Applied*

- Thrombosis/Hemostasis 24, 42S-47S.
<https://doi.org/10.1177/1076029618811109>
36. Gröber, U., Reichrath, J., Holick, M., Kisters, K., 2014. Vitamin K: an old vitamin in a new perspective. *Dermato-Endocrinology* 6, e968490.
<https://doi.org/10.4161/19381972.2014.968490>
 37. Halder, M., Petsophonsakul, P., Akbulut, A., Pavlic, A., Bohan, F., Anderson, E., Maresz, K., Kramann, R., Schurgers, L., 2019. Vitamin K: Double Bonds beyond Coagulation Insights into Differences between Vitamin K1 and K2 in Health and Disease. *IJMS* 20, 896. <https://doi.org/10.3390/ijms20040896>
 38. Hall, B.K., 1991. *Bone, Volume IV: A Treatise: Bone Metabolism and Mineralization v. 4.* Telford Press.
 39. Hallajzadeh, J., Ghorbanihaghjo, A., Argani, H., Dastmalchi, S., Rashtchizadeh, N., 2015. Growth Arrest-specific 6 Protein and Matrix Gla Protein in Hemodialysis Patients 9, 7.
 40. Hanzl, Mud.M., 2011. Prevence krvácení novorozenců a malých kojenců způsobené nedostatkem vitamínu K. *Pediatric pro praxi* 12, 2.
 41. Haroon, Y., Bacon, D.S., Sadowski, J.A., 1986. Liquid-chromatographic determination of vitamin K1 in plasma, with fluorometric detection. *Clinical Chemistry* 32, 1925–1929. <https://doi.org/10.1093/clinchem/32.10.1925>
 42. Hart, J.P., Shearer, M.J., Klenerman, L., Catterall, A., REEVE, J., Sambrook, P.N., Dodos, R.A., Bitensky, L., Chayen, J., 1985. ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DEPRESSED CIRCULATING LEVELS OF VITAMIN K1 IN OSTEOPOROSIS. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 60, 1268–1269. <https://doi.org/10.1210/jcem-60-6-1268>
 43. Hluší, Mud.A., Slavík, L., Palová, M., Krčová, V., 2015. Nová orální antikoagulancia – pohled hematologa. *Interní medicína* 17, 4.
 44. Huet, F., Semama, D., Maingueneau, C., Charavel, A., Nivelon, J.-L., 1997. Vitamin A deficiency and nocturnal vision in teenagers with cystic fibrosis. *European Journal of Pediatrics* 156, 949–951.
<https://doi.org/10.1007/s004310050749>
 45. Immundiagnostik, A.G., 2008. Vitamin K1 HPLC Kit: For the determination of vitamin K1 in plasma and serum.
 46. Jakubec, Mud.P., 2006. Cystická fibróza. *Interní medicína* 5.
 47. Kamao, M., Suhara, Y., Tsugawa, N., Okano, T., 2005. Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 816, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.11.003>

48. Kanai, T., Takagi, T., Masuhiro, K., Nakamura, M., Iwata, M., Saji, F., 1997. Serum vitamin K level and bone mineral density in post-menopausal women. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 56, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(96\)02790-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(96)02790-7)
49. Kanazawa, I., 2015. Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism. *World Journal of Diabetes* 6, 1345. <https://doi.org/10.4239/wjcd.v6.i18.1345>
50. Kaneki, M., Hedges, S.J., Hosoi, T., Fujiwara, S., Lyons, A., Crean, St.J., Ishida, N., Nakagawa, M., Takechi, M., Sano, Y., Mizuno, Y., Hoshino, S., Miyao, M., Inoue, S., Horiki, K., Shiraki, M., Ouchi, Y., Orimo, H., 2001. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition* 17, 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00554-2](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00554-2)
51. Kang, K., Kim, J.H., Kang, S.H., Lee, B.J., Seo, Y.S., Yim, H.J., Yeon, J.E., Park, J.-J., Kim, J.S., Bak, Y.-T., Byun, K.S., 2015. The Influence of Alcoholic Liver Disease on Serum PIVKA-II Levels in Patients without Hepatocellular Carcinoma. *Gut Liver* 9, 224–230. <https://doi.org/10.5009/gnl14047>
52. Karl, J.P., Fu, X., Dolnikowski, G.G., Saltzman, E., Booth, S.L., 2014. Quantification of phyloquinone and menaquinones in feces, serum, and food by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 963, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.056>
53. Kawana, K., Takahashi, M., Hoshino, H., Kushida, K., 2001. CIRCULATING LEVELS OF VITAMIN K1, MENAQUINONE-4, AND MENAQUINONE-7 IN HEALTHY ELDERLY JAPANESE WOMEN AND PATIENTS WITH VERTEBRAL FRACTURES AND PATIENTS WITH HIP FRACTURES. *Endocrine Research* 27, 337–343. <https://doi.org/10.1081/ERC-100106011>
54. Kessler, P., 2014. Krvácení v souvislosti s antikoagulační léčbou warfarinem, in: *Krvácení*. Grada, Praha, pp. 299–305.
55. Kessler, P., 2012. Porovnání warfarinu a nových antitrombotik z hlediska lékových interakcí. *Klinická farmakologie a farmacie* 26, 5.
56. Keutel, J., Jorgensen, G., Gabriel, P., 1972. A new autosomal recessive syndrome: peripheral pulmonary stenosis, brachytelephalangism, neural hearing loss and abnormal cartilage calcification/ossification. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* VIII, 60–68.
57. Khosroshahi, H.E., Sahin, S.C., Akyuz, Y., Ede, H., 2014. Long term follow-up of four patients with Keutel syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 164, 2849–2856. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36699>
58. Klapkova, E., Cepova, J., Dunovska, K., Prusa, R., 2018. Determination of vitamins K₁, MK-4, and MK-7 in human serum of postmenopausal women by

- HPLC with fluorescence detection. *J Clin Lab Anal* 32, e22381. <https://doi.org/10.1002/jcla.22381>
59. Knapen, M.H.J., Drummen, N.E., Smit, E., Vermeer, C., Theuwissen, E., 2013. Three-year low-dose menaquinone-7 supplementation helps decrease bone loss in healthy postmenopausal women. *Osteoporosis International* 24, 2499–2507. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2325-6>
 60. Kohlmeier, M., Salomon, A., Saupe, J., Shearer, M.J., 1996. Transport of Vitamin K to Bone in Humans. *The Journal of Nutrition* 126, 1192S–1196S. https://doi.org/10.1093/jn/126.suppl_4.1192S
 61. Kong, L., Wu, Z., Zhao, Y., Lu, X., Shi, H., Liu, S., Li, J., 2019. Qigesan reduces the motility of esophageal cancer cells via inhibiting Gas6/Axl and NF- κ B expression. *Bioscience Reports* 39, BSR20190850. <https://doi.org/10.1042/BSR20190850>
 62. Kowdley, K.V., Mason, J.B., Meydani, S.N., Cornwall, S., Grand, R.J., 1992. Vitamin E deficiency and impaired cellular immunity related to intestinal fat malabsorption. *Gastroenterology* 102, 2139–2142. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)90344-X](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)90344-X)
 63. Kraemer, C.M., 2015. Vitamin K [WWW Document]. Vitamin K, Medscape Reference. URL <https://emedicine.medscape.com/article/2088738-overview>
 64. Krzyżanowska, P., Drzymała-Czyż, S., Rohovyk, N., Bober, L., Moczko, J., Rachel, M., Walkowiak, J., 2018. Prevalence of vitamin K deficiency and associated factors in non-supplemented cystic fibrosis patients. *Arch Argent Pediatr* 116. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.eng.e19>
 65. Krzyżanowska, P., Pogorzelski, A., Skorupa, W., Moczko, J., Grebowiec, P., Walkowiak, J., 2015. Exogenous and endogenous determinants of vitamin K status in cystic fibrosis. *Sci Rep* 5, 12000. <https://doi.org/10.1038/srep12000>
 66. Kulman, J.D., Harris, J.E., Haldeman, B.A., Davie, E.W., 1997. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich -carboxyglutamic acid proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 9058–9062. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9058>
 67. Kulman, J.D., Harris, J.E., Xie, L., Davie, E.W., 2001. Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *PNAS* 98, 6.
 68. Kurosu, M., Begari, E., 2010. Vitamin K2 in Electron Transport System: Are Enzymes Involved in Vitamin K2 Biosynthesis Promising Drug Targets? *Molecules* 15, 1531–1553. <https://doi.org/10.3390/molecules15031531>
 69. Lamson, D.W., 2003. The Anticancer Effects of Vitamin K. *Vitamin K* 8, 16.

70. Lamson, D.W., Gu, Y.-H., Plaza, S.M., Brignall, M.S., Brinton, C.A., Sadlon, A.E., 2010. The Vitamin C:Vitamin K3 System – Enhancers and Inhibitors of the Anticancer Effect. *Alternative Medicine Review* 15, 345–351.
71. Liu, S., Cheng, W., Fowle Grider, R., Shen, G., Li, W., 2014. Structures of an intramembrane vitamin K epoxide reductase homolog reveal control mechanisms for electron transfer. *Nat Commun* 5, 3110. <https://doi.org/10.1038/ncomms4110>
72. Lui, L., 2019. Protein C/S Deficiency [WWW Document]. URL <https://step1.medbullets.com/hematology/114066/protein-c-s-deficiency>
73. Marinova, M., Lütjohann, D., Westhofen, P., Watzka, M., Breuer, O., Oldenburg, J., 2011. A Validated HPLC Method for the Determination of Vitamin K in Human Serum – First Application in a Pharmacological Study. *TOCCHEMJ* 4, 17–27. <https://doi.org/10.2174/1874241601104010017>
74. Mason, J.B., 2007. Vitamins, Trace Minerals, And Other Micronutrients, in: *Cecil Textbook of Medicine*, 23rd Ed. Elsevier Health Sciences, pp. 1626–1639.
75. Masterjohn, C., 2008. On the Trail of the Elusive X-Factor: A Sixty-Two-Year-Old Mystery Finally Solved [WWW Document]. URL <https://www.westonaprice.org/health-topics/abcs-of-nutrition/on-the-trail-of-the-elusive-x-factor-a-sixty-two-year-old-mystery-finally-solved/>
76. Mayer, O., 2016. Matrix Gla protein jako přirozený inhibitor vaskulárních kalcifikací a potenciální léčebný cíl. *Časopis lékařů českých* 155, 13–16.
77. Mills, K.L., Gomes, A.M., Standlee, C.R., Rojo, M.D., Carmeliet, P., Lin, Z., Machado, H.L., 2018. Gas6 is dispensable for pubertal mammary gland development. *PLOS ONE* 13, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208550>
78. Misra, D., Booth, S.L., Tolstykh, I., Felson, D.T., Nevitt, M.C., Lewis, C.E., Torner, J., Neogi, T., 2013. Vitamin K Deficiency Is Associated with Incident Knee Osteoarthritis. *The American Journal of Medicine* 126, 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.10.011>
79. Mosler, K., von Kries, R., Vermeer, C., Saupe, J., Schmitz, T., Schuster, A., 2003. Assessment of vitamin K deficiency in CF—how much sophistication is useful? *Journal of Cystic Fibrosis* 2, 91–96. [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(03)00025-0)
80. MyBioSource, 2020a. MGP elisa kit.
81. MyBioSource, 2020b. Human Vitamin K ELISA Kit [WWW Document]. URL <https://www.mybiosource.com/human-elisa-kits/vitamin-k/3803335>
82. MyBioSource, 2020c. Human protein induced vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) ELISA Kit.

83. Naito, K., 2012. Relationship between serum undercarboxylated osteocalcin and hyaluronan levels in patients with bilateral knee osteoarthritis. *Int J Mol Med*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.897>
84. Nakaya, K., Masuda, Y., Aiuchi, T., Itabe, H., 2012. Vitamin K₂ as a Chemotherapeutic Agent for Treating Ovarian Cancer, in: Farghaly, S.A. (Ed.), *Ovarian Cancer - Clinical and Therapeutic Perspectives*. InTech. <https://doi.org/10.5772/27759>
85. National Institute of Health, 2020. National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center: Osteoporosis in Men [WWW Document].
86. National Library of Medicine, 2020. PubChem - Explore Chemistry [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
87. Ng, E., Loewy, A.D., 2018. Position Statement: Guidelines for vitamin K prophylaxis in newborns. *Canadian Family Physician* 64, 4.
88. Nigwekar, S.U., Bloch, D.B., Nazarian, R.M., Vermeer, C., Booth, S.L., Xu, D., Thadhani, R.I., Malhotra, R., 2017. Vitamin K–Dependent Carboxylation of Matrix Gla Protein Influences the Risk of Calciphylaxis. *Journal of the American Society of Nephrology* 28, 1717–1722. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016060651>
89. Nimptsch, K., Rohrmann, S., Kaaks, R., Linseisen, J., 2010. Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, 1348–1358. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28691>
90. NORDIC Pharma, 2018a. Paravit™-CF roztok [WWW Document]. URL <https://www.nordicpharma.cz/wp-content/uploads/sites/10/2018/10/Paravit-CF-Roztok-PIL-88x156-mm-07-09-2018.pdf>
91. NORDIC Pharma, 2018b. Paravit™-CF tobolky [WWW Document]. URL <https://www.nordicpharma.cz/wp-content/uploads/sites/10/2018/10/Paravit-CF-Tobolky-PIL-111x132-mm-07-09-2018.pdf>
92. Novosad, J., Bartoš, V., Drahošová, M., Sedlák, V., Krejsek, J., Krčmová, I., 2013. Periostin – nový slibný biologický znak bronchiálního astmatu a idiopatické plicní fibrózy. *Alergie : časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii* 15, 185–194.
93. Okano, T., Shimomura, Y., Yamane, M., Suhara, Y., Kamao, M., Sugiura, M., Nakagawa, K., 2008. Conversion of Phylloquinone (Vitamin K₁) into Menaquinone-4 (Vitamin K₂) in Mice: TWO POSSIBLE ROUTES FOR MENAQUINONE-4 ACCUMULATION IN CEREBRA OF MICE. *J. Biol. Chem.* 283, 11270–11279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702971200>

94. Palermo, A., Tuccinardi, D., D'Onofrio, L., Watanabe, M., Maggi, D., Maurizi, A.R., Greto, V., Buzzetti, R., Napoli, N., Pozzilli, P., Manfrini, S., 2017. Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality? *Metabolism* 70, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.032>
95. Paroni, R., Faioni, E.M., Razzari, C., Fontana, G., Cattaneo, M., 2009. Determination of vitamin K1 in plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 877, 351–354. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.044>
96. Patti, A., Gennari, L., Merlotti, D., Dotta, F., Nuti, R., 2013. Endocrine Actions of Osteocalcin. *International Journal of Endocrinology* 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/846480>
97. Pecka, M., 2004. Fyziologie a patologie hemostázy, in: *Laboratorní hematologie v přehledu*. [3. díl]. FINIDR, Český Těšín.
98. Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., García, M.D., Martín, J., 2007. High-performance liquid chromatography–photochemical reduction in aerobic conditions for determination of K vitamins using fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1141, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.004>
99. Perrone, E., Chen, K., Ramos, M., Milanezi, M.F., Nakano, V., Falconi, A., Silva, J., Campos, J., Silva, C.M.C., Filho, J.B.O., Perez, A.B.A., 2018. A Novel MGP Gene Mutation Causing Keutel Syndrome in a Brazilian Patient. *Mol Syndromol* 9, 159–163. <https://doi.org/10.1159/000488573>
100. PharmaSuisse Laboratories, 2020. FEMORALEX® forte [WWW Document]. URL <https://www.pharmasuisse.cz/produkt/femoralex>
101. Pivin, E., Ponte, B., Pruijm, M., Ackermann, D., Guessous, I., Ehret, G., Liu, Y.-P., Drummen, N.E.A., Knapen, M.H.J., Pechere-Bertschi, A., Paccaud, F., Mohaupt, M., Vermeer, C., Staessen, J.A., Vogt, B., Martin, P.-Y., Burnier, M., Bochud, M., 2015. Inactive Matrix Gla-Protein Is Associated With Arterial Stiffness in an Adult Population–Based Study. *Hypertension* 66, 85–92. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05177>
102. R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
103. Rashid, M., Durie, P., Andrew, M., Kalnins, D., Shin, J., Corey, M., Tullis, E., Pencharz, P.B., 1999. Prevalence of vitamin K deficiency in cystic fibrosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 378–82.
104. Rasmussen, S.E., Andersen, N.L., Dragsted, L.O., Larsen, J.C., 2006. A safe strategy for addition of vitamins and minerals to foods. *European Journal of Nutrition* 45, 123–135. <https://doi.org/10.1007/s00394-005-0580-9>

105. Reutova, H., 2019. Periostin/POSTN – protein important for cancer? [WWW Document]. URL https://www.biovendor.com/periostinpostn--protein-important-for-cancer?utm_source=google&utm_medium=organic
106. Riphagen, I.J., van der Molen Jan C., van Faassen Martijn, Navis Gerjan, de Borst Martin H., Muskiet Frits A.J., de Jong Wilhelmina H.A., Bakker Stephan J.L., Kema Ido P., 2015. Measurement of plasma vitamin K1 (phylloquinone) and K2 (menaquinones-4 and -7) using HPLC-tandem mass spectrometry. *cclm* 54, 1201. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0864>
107. Roche Diagnostics GmbH, 2017. Elecsys N-MID Osteocalcin.
108. Rosen, C., 2020. The Epidemiology and Pathogenesis of Osteoporosis [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279134/>
109. Rosen, H.N., Maitland, L.A., Suttie, J.W., Manning, W.J., Glynn, R.J., Greenspan, S.L., 1993. Vitamin k and maintenance of skeletal integrity in adults. *The American Journal of Medicine* 94, 62–68. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90121-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(93)90121-5)
110. Rüggeberg, S., Horn, P., Li, X., Vajkoczy, P., Franz, T., 2008. Detection of a - Carboxy-Glutamate as Novel Post-Translational Modification of Human Transthyretin 15, 43–46.
111. Sadowski, J.A., Hood, S.J., Dallal, G.E., Garry, P.J., 1989. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *The American Journal of Clinical Nutrition* 50, 100–108. <https://doi.org/10.1093/ajcn/50.1.100>
112. Saitta, C., Raffa, G., Alibrandi, A., Brancatelli, S., Lombardo, D., Tripodi, G., Raimondo, G., Pollicino, T., 2017. PIVKA-II is a useful tool for diagnostic characterization of ultrasound-detected liver nodules in cirrhotic patients: *Medicine* 96, e7266. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007266>
113. Salmi, L., Gavelli, F., Patrucco, F., Caputo, M., Avanzi, G.C., Castello, L.M., 2019. Gas6/TAM Axis in Sepsis: Time to Consider Its Potential Role as a Therapeutic Target. *Disease Markers* 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/6156493>
114. Sato, T., Inaba, N., Yamashita, T., 2020. MK-7 and Its Effects on Bone Quality and Strength. *Nutrients* 12, 965. <https://doi.org/10.3390/nu12040965>
115. Sato, T., Schurgers, L.J., Uenishi, K., 2012. Comparison of menaquinone-4 and menaquinone-7 bioavailability in healthy women. *Nutr J* 11, 93. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-93>
116. Sato, Y., Honda, Y., Kuno, H., Oizumi, K., 1998. Menatetrenone ameliorates osteopenia in disuse-affected limbs of vitamin D- and K-deficient stroke patients. *Bone* 23, 291–296. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(98\)00108-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(98)00108-2)

117. Schlievert, P.M., Merriman, J.A., Salgado-Pabón, W., Mueller, E.A., Spaulding, A.R., Vu, B.G., Chuang-Smith, O.N., Kohler, P.L., Kirby, J.R., 2013. Menaquinone Analogs Inhibit Growth of Bacterial Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5432–5437. <https://doi.org/10.1128/AAC.01279-13>
118. Schurgers, L., Cranenburg, E., Vermeer, C., 2008. Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. <https://doi.org/10.1160/TH08-02-0087>
119. Schurgers, L.J., Teunissen, K.J.F., Hamulyák, K., Knapen, M.H.J., Vik, H., Vermeer, C., 2007. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood* 109, 3279–3283. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040709>
120. Shao, J., Wang, Z., Yang, T., Ying, H., Zhang, Y., Liu, S., 2015. Bone Regulates Glucose Metabolism as an Endocrine Organ through Osteocalcin. *International Journal of Endocrinology* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/967673>
121. Sharma, B., Srinivasan, R., Chawla, Y.K., Kapil, S., Saini, N., Singla, B., Chakraborty, A., Kalra, N., Duseja, A., Dhiman, R.K., 2010. Clinical utility of prothrombin induced by vitamin K absence in the detection of hepatocellular carcinoma in Indian population. *Hepatol Int* 4, 569–576. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9186-2>
122. Shea, M.K., Kritchevsky, S.B., Hsu, F.-C., Nevitt, M., Booth, S.L., Kwok, C.K., McAlindon, T.E., Vermeer, C., Drummen, N., Harris, T.B., Womack, C., Loeser, R.F., 2015. The association between vitamin K status and knee osteoarthritis features in older adults: The Health, Aging and Body Composition Study. *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.12.008>
123. Shearer, M.J., Newman, P., 2014. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *J. Lipid Res.* 55, 345–362. <https://doi.org/10.1194/jlr.R045559>
124. Shearer, M.J., Newman, P., 2008. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost* 100, 530–547. <https://doi.org/10.1160/TH08-03-0147>
125. Shiraki, M., Aoki, C., Yamazaki, N., Ito, Y., Tsugawa, N., Suhara, Y., Okano, T., 2007. Clinical assessment of undercarboxylated osteocalcin measurement in serum using an electrochemiluminescence immunoassay: Establishments of cut-off value to determine vitamin K insufficiency in bone and to predict fracture leading to clinical use of vitamin K2. *Jpn J Med Pharm Sci* 57, 537–546.
126. Silaghi, C., Ilyés, T., Filip, V., Farcaș, M., van Ballegooijen, A., Crăciun, A., 2019. Vitamin K Dependent Proteins in Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1571. <https://doi.org/10.3390/ijms20071571>
127. Skalická, M., 2014. Terapeutické trendy cystické fibrózy. *Pediatric pro praxi* 15, 4.

128. Song, Q., Wen, A., Ding, L., Dai, L., Yang, L., Qi, X., 2008. HPLC-APCI-MS for the determination of vitamin K(1) in human plasma: Method and clinical application. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 875, 541–5. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.009>
129. Stafford, D.W., 2005. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 3, 1873–1878. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01419.x>
130. Stalder, G., Que, Y.A., Calzavarini, S., Burnier, L., Kosinski, C., Ballabeni, P., Roger, T., Calandra, T., Duchosal, M.A., Liaudet, L., Eggimann, P., Angelillo-Scherrer, A., 2016. Study of Early Elevated Gas6 Plasma Level as a Predictor of Mortality in a Prospective Cohort of Patients with Sepsis. *PLoS ONE* 11, e0163542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163542>
131. Suhara, Y., Kamao, M., Tsugawa, N., Okano, T., 2005. Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 757–763. <https://doi.org/10.1021/ac0489667>
132. Suttie, J., 1992. Vitamin K and human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association* 92, 585–590.
133. Suttie, J.W., 2009. *Vitamin K in Health and Disease*. CRC Press.
134. Svobodova, S., Karlikova, M., Topolcan, O., Pecen, L., Pestova, M., Kott, O., Treska, V., Slouka, D., Kucera, R., 2018. PIVKA-II as a Potential New Biomarker for Hepatocellular Carcinoma – A Pilot Study. *In Vivo* 32, 1551–1554. <https://doi.org/10.21873/invivo.11413>
135. Swann, I., Kendra, J., 1998. Anaemia, vitamin E deficiency and failure to thrive in an infant. *Clinical & Laboratory Haematology* 20, 61–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.1998.00099.x>
136. Takara Bio USA, Inc., 2020. Osteocalcin EIA kits for bone and endocrine research TaKaRa Bio [WWW Document]. TaKaRa Bio. URL https://www.takarabio.com/products/cell_biology_and_epigenetics/bone_research/osteocalcin_focus
137. Thane, C.W., Bates, C.J., Shearer, M.J., Unadkat, N., Harrington, D.J., Paul, A.A., Prentice, A., Bolton-Smith, C., 2002. Plasma phylloquinone (vitamin K₁) concentration and its relationship to intake in a national sample of British elderly people. *Br J Nutr* 87, 615–622. <https://doi.org/10.1079/BJN2002582>
138. Tokgöz, Y., Terlemez, S., Karul, A., 2018. Fat soluble vitamin levels in children with newly diagnosed celiac disease, a case control study. *BMC Pediatr* 18, 130. <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1107-x>
139. Tsugawa, N., Shiraki, M., Suhara, Y., Kamao, M., Tanaka, K., Okano, T., 2006. Vitamin K status of healthy Japanese women: Age-related vitamin K

- requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *Am J Clin Nutr* 83, 380–386.
140. Ushiroyama, T., Ikeda, A., Ueki, M., 2002. Effect of continuous therapy with vitamin K2 and vitamin D3 on bone mineral density and coagulofibrinolysis function in postmenopausal women. *Maturitas* 41, 211–21. [https://doi.org/10.1016/S0378-5122\(01\)00275-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5122(01)00275-4)
141. van Summeren, M., Braam, L., Noirt, F., Kuis, W., Vermeer, C., 2007. Pronounced Elevation of Undercarboxylated Osteocalcin in Healthy Children. *Pediatr Res* 61, 366–370. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e318030d0b1>
142. Vávrová, J., a spolupracovníci, 2007. Vitaminy a stopové prvky 2007, 1.vyd. ed. Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP, Praha.
143. Vavrova, J., Pechova, A., Wilhelm, Z., Kazda, A., Friedecký, B., Jambor, A., 2007. Vitaminy a stopové prvky 2007. Česká Společnost klinické Biochemie ČLS JEP 46–48.
144. Vermeer, C., Raes, J., van 't Hoofd, C., Knapen, M., Xanthoulea, S., 2018. Menaquinone Content of Cheese. *Nutrients* 10, 446. <https://doi.org/10.3390/nu10040446>
145. Viegas, C., Simes, D.C., 2016. Gla-rich Protein (GRP): A New Player In The Burden Of Vascular Calcification. <https://doi.org/10.4172/2329-9517.1000245>
146. Viegas, C.S.B., Costa, R.M., Santos, L., Videira, P.A., Silva, Z., Araújo, N., Macedo, A.L., Matos, A.P., Vermeer, C., Simes, D.C., 2017. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLOS ONE* 12, e0177829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177829>
147. Viegas, C.S.B., Herfs, M., Rafael, M.S., Enriquez, J.L., Teixeira, A., Luís, I.M., van 't Hoofd, C.M.R., João, A., Maria, V.L., Cavaco, S., Ferreira, A., Serra, M., Theuwissen, E., Vermeer, C., Simes, D.C., 2014. Gla-Rich Protein Is a Potential New Vitamin K Target in Cancer: Evidences for a Direct GRP-Mineral Interaction. *BioMed Research International* 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/340216>
148. ViennaLab, 2020. PGX-Thrombo [WWW Document]. URL <https://www.viennalab.com/products/pharmacogenetics/pgx-thrombo>
149. Wallin, R., 2013. Vitamin K, in: *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*. Saunders, pp. 655–668.
150. Walther, B., Karl, J.P., Booth, S.L., Boyaval, P., 2013. Menaquinones, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements. *Advances in Nutrition* 4, 463–473. <https://doi.org/10.3945/an.113.003855>

151. Wang, L.Y., Bates, C.J., Yan, L., Harrington, D.J., Shearer, M.J., Prentice, A., 2004. Determination of phylloquinone (vitamin K1) in plasma and serum by HPLC with fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta* 347, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.030>
152. Wei, F.-F., Trenson, S., Monney, P., Yang, W.-Y., Pruijm, M., Zhang, Z.-Y., Bouatou, Y., Huang, Q.-F., Ponte, B., Martin, P.-Y., Thijs, L., Kuznetsova, T., Allegaert, K., Janssens, S., Vermeer, C., Verhamme, P., Burnier, M., Bochud, M., Ehret, G., Staessen, J.A., 2018. Epidemiological and histological findings implicate matrix Gla protein in diastolic left ventricular dysfunction. *PLOS ONE* 13, e0193967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193967>
153. Wei, F.-F., Trenson, S., Verhamme, P., Vermeer, C., Staessen, J.A., 2019. Vitamin K–Dependent Matrix Gla Protein as Multifaceted Protector of Vascular and Tissue Integrity. *Hypertension* 73, 1160–1169. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12412>
154. Wen, L., Chen, J., Duan, L., Li, S., 2018. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review). *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8940>
155. World Health Organization, 2005. Vitamin K, in: *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. World Health Organization, pp. 108–129.
156. World Health Organization, 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis : report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]. WHO technical report series ; 843.
157. Wu, S., Chen, X., Jin, D.-Y., Stafford, D.W., Pedersen, L.G., Tie, J.-K., 2018. Warfarin and vitamin K epoxide reductase: a molecular accounting for observed inhibition. *Blood* 132, 647–657. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-830901>
158. Yan, L., Zhou, B., Greenberg, D., Wang, L., Nigdikar, S., Prynne, C., Prentice, A., 2004. Vitamin K status of older individuals in northern China is superior to that of older individuals in the UK. *Br J Nutr* 92, 939–945. <https://doi.org/10.1079/BJN20041261>
159. Zákon č. 450/2004 Sb., 2009. Zákon č. 450/2004 Sb. a novely 330/2009 Sb., o označování výživové hodnoty potravin ze dne 21. července 2004.
160. Zempleni, J., Suttie, J.W., Gregory III, J.F., Stover, P.J., 2013. *Handbook of Vitamins*, 5th. CRC Press.
161. Zentiva, 2014. Kanavit -Příbalová informace - RP.
162. Zhang, Yingfeng, Liu, Z., Duan, L., Ji, Y., Yang, S., Zhang, Yuan, Li, H., Wang, Y., Wang, P., Chen, J., Li, Y., 2020. Effect of Low-Dose Vitamin K2 Supplementation on Bone Mineral Density in Middle-Aged and Elderly Chinese: A Randomized Controlled Study. *Calcified Tissue International* 106, 476–485. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00669-4>

163. Zhu, S., Barbe, M.F., Amin, N., Rani, S., Popoff, S.N., Safadi, F.F., Litvin, J., 2008. Immunolocalization of Periostin-like Factor and Periostin During Embryogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 56, 329–345. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7321.2007>
164. Zoch, M.L., Clemens, T.L., Riddle, R.C., 2016. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.046>
165. Zofkova, I., 2018. Involvement of Bone in Systemic Endocrine Regulation 67, 9.

SEZNAM ZKRATEK

AFP	alfa-fetoprotein
AJS ESI+	ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (z angl. <i>Agilent Jet Stream with electrospray ionization in positive mode</i>)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
BGLAP	kostní Gla protein (z angl. <i>bone gamma-carboxyglutamate protein</i>)
BMD	kostní denzita (z angl. <i>bone mass density</i>)
BMP-2	kostní morfogenetický protein 2
c-dpMGP	karboxylovaný nedostatečně fosforylovaný matrix Gla protein
CF	cystická fibróza
CID	disociace indukovaná kolizí (z angl. <i>Collision induced disociation</i>)
CKD	chronické onemocnění ledvin (z angl. <i>chronic kidney disease</i>)
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích
cOC	karboxylovaný osteokalcin
c-pMGP	karboxylovaný fosforylovaný matrix Gla protein
CV	variační koeficient
dMRM	dynamická multiplexní analýza (z angl. <i>Dynamic Multiple Reaction Monitoring</i>)
ELISA	enzymová imunanalýza
FII	koagulační faktor II
FIX	koagulační faktor IX
FLD	fluorescenční detektor
FVII	koagulační faktor VII
FX	koagulační faktor X
Gas6	specifický protein 6 zastavující růst
Gla	γ -karboxyglutamová kyselina
Glu	glutamová kyselina
GPCR6A	receptor spřažený s proteinem G
GRP	Gla rich protein
HCC	hepatocelulární karcinom (z angl. <i>hepatocellular carcinoma</i>)
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDL	lipoprotein o střední denzitě
INR	mezinárodní normalizovaný poměr (z angl. <i>international normalized ratio</i>)
IQR	mezikvartilové rozpětí
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LOD	mez detekce (z angl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	mez kvatifikace (z angl. <i>limit of quantification</i>)
MF	mobilní fáze
MGP	matrix Gla protein
MK	menachinon
MRM	multiplexní analýza (z angl. <i>Multiple reaction monitoring</i>)
ns	nesignifikantní
OA	osteoartritida
OC	osteokalcin
OP	pacienti s osteoporózou

PC	protein C
PI3K/Akt	fosfoinositidová kináza3/protein kináza B
PIVKA-II	protein indukovaný nedostatkem vitamínu K (z angl. <i>protein induced by vitamin K absence/antagonist-II</i>)
PK	fylochinon
PLF	periostin like faktor
PRGP	prolin rich Gla protein
PS	protein S
PZ	protein Z
PŽ	postmenopauzální ženy
Q1	první kvartil (25.percentil)
Q1	první kvartil (25. percentil)
Q3	třetí kvartil (75.percentil)
Q3	třetí kvartil (75. percentil)
RT	retenční čas
Runx2	transkripční faktor 2 příbuzný runt (z angl. <i>runt-related transcription factor 2</i>)
SD	směrodatná odchylka výběrová
t-cMGP	celkový karboxylovaný matrix Gla protein
t-dpMGP	celkový nedostatečně fosforylovaný matrix Gla protein
TMGP	transmembránový Gla protein
tOC	celkový osteokalcin
t-PA	tkáňového aktivátoru plazminogenu
t-pMGP	celkový fosforylovaný matrix Gla protein
t-ucMGP	celkový nedostatečně karboxylovaný matrix Gla protein
uc-dpMGP	nedostatečně karboxylovaný nedostatečně fosforylovaný matrix Gla protein
ucOC	nedostatečně karboxylovaný osteokalcin
uc-pMGP	nedostatečně karboxylovaný fosforylovaný matrix Gla protein
VDR	receptor pro vitamin D
VDRE	částice rozpoznávající receptor pro vitamin D
VKDB	krváčení z nedostatku vitamínu K (z angl. <i>vitamin K deficiency bleeding</i>)
VKDP	vitamin K dependentní proteiny
VKOR	vitamin K epoxidreduktáza
VLDL	velmi nízkodenzitní lipoprotein
VSMC	cévní buňky hladkého svalstva

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Vitamin K ₁	10
Obr. 2 Vitamin K ₂	11
Obr. 3 Vitamin K ₃	13
Obr. 4 Vitamin K ₄	13
Obr. 5 Vitamin K ₅	13
Obr. 6 Cyklus vitamínu K	16
Obr. 7 Metabolismu vitamínu K	18
Obr. 8 Konverze vitamínu K ₁ na vitamin K ₂	20
Obr. 9 Vznik osteokalcinu	29
Obr. 10 Princip reakce stanovení ucOC nebo OC (sendvičová imunoanalýza)	32
Obr. 11 Hypotetický vznik maturovaného MGP	34
Obr. 12 Schéma funkcí Gla rich proteinu	38
Obr. 13 Funkce Gas6 v sepsi	40
Obr. 14 Funkce periostinu v organismu	42
Obr. 15 Schéma koagulační kaskády	44
Obr. 16 Klasifikace osteoporózy	55
Obr. 17 HPLC sestava Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA)	57
Obr. 18 LC sestava Agilent 1290 s detektorem 6470 – trojitý kvadrupól (Agilent Technologies, USA)	57
Obr. 19 Analýza směsi standardů vitamínu K pomocí HPLC	63
Obr. 20 Analýza směsi standardů vitamínu K pomocí LC-MS/MS	65
Obr. 21 Kalibrační křivka vitamínu K ₁	67
Obr. 22 Kalibrační křivka menachinonu-4 (vitamin K ₂)	67
Obr. 23 Kalibrační křivka menachinonu-7 (vitamin K ₂)	67
Obr. 24 Kalibrace vitamínu K ₁ metodou LC-MS/MS	77
Obr. 25 Kalibrace MK-4 (vitamin K ₂) metodou LC-MS/MS	77
Obr. 26 Kalibrace MK-7 (vitamin K ₂) metodou LC-MS/MS	78
Obr. 27 Krabicový graf vitamínů K u pacientek s osteoporózou a postmenopauzálních žen	85
Obr. 28 Krabicový graf MGP u postmenopauzálních žen bez osteoporózy a u pacientek s osteoporózou	88
Obr. 29 Porovnání dat vitamínů K ₁ , MK-4 a MK-7 u pacientů s osteoporózou	89
Obr. 30 Vliv konzumace natto na riziko zlomeniny krčku femuru	91
Obr. 31 Porovnání dat 25-OH vitamínu D a vitamínu MK-7 u dobrovolníků užívajících Femoralex forte	98
Obr. 32 Porovnání T-skóre u pacientů užívajících Femoralex forte a stravu bohatou na vápník.	101
Obr. 33 Porovnání T-skóre u pacientů užívajících vitamin D a stravu bohatou na vápník	101
Obr. 34 Vitamin K u všech pacientů s CF a u pacientů s CF neužívajících vitamin K ₁	108
Obr. 35 Závislost koncentrace vitamínu K ₁ na hodnotě INR	109
Obr. 36 Závislost koncentrace vitamínu K ₁ na koncentraci PIVKA-II (CMIA)	110
Obr. 37 Závislost koncentrace vitamínu K ₁ na koncentraci PIVKA-II (ELISA)	111
Obr. 38 Korelační analýzy vitamínu K ₁ , MK-4 a MK-7	114
Obr. 39 Párový neparametrický t-test vitamínu K ₁ , MK-4 a MK-7	115

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled vlastností vitamínu K ₁ , MK-4 a MK-7.....	12
Tab. 2 Přehled vitamínu K.....	14
Tab. 3 Přehled vitamín K dependentních proteinů.....	27
Tab. 4 Přehled typů MGP.....	33
Tab. 5 Funkce VKDP v organismu.....	49
Tab. 6 Přímé a nepřímé metody stanovení vitamínu K.....	52
Tab. 7 Základní charakteristika souboru pacientů.....	61
Tab. 8 Gradient mobilních fází.....	64
Tab. 9 Opakovatelnost stanovení vitamínu K pomocí HPLC.....	69
Tab. 10 Reprodukovatelnost stanovení vitamínu K pomocí HPLC.....	70
Tab. 11 Výška píků šumu blanků.....	72
Tab. 12 Koncentrace vitamínů K skladovaného při cca 4 °C.....	73
Tab. 13 Koncentrace vitamínů K skladovaného při cca -20 °C.....	74
Tab. 14 Koncentrace vitamínů K skladovaného při cca -70 °C.....	74
Tab. 15 Kvantifikační a konfirmační přechody forem vitamínu K.....	76
Tab. 16 Opakovatelnost měření pomocí LC-MS/MS.....	79
Tab. 17 Reprodukovatelnost měření pomocí LC-MS/MS.....	80
Tab. 18 Porovnání LOD, LOQ a výtěžnosti metod HPLC s FLD a LC-MS/MS.....	82
Tab. 19 Hladiny vitamínu K ₁ a MK-7 u pacientů s osteoporózou a u kontrolní skupiny bez osteoporózy.....	83
Tab. 20 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů vitamínů K u pacientů s osteoporózou a postmenopauzálních žen analyzovaných pomocí HPLC metody.....	84
Tab. 21 Přehled fyziologických mezí u OC, ucOC, MGP, ucMGP, PIVKA-II.....	86
Tab. 22 Přehled průměru, SD, mediánů a kvartilů pro OC, ucOC, PIVKA-II, MGP, ucMGP u pacientů bez prokázané osteoporózy a u pacientů s prokázanou osteoporózou.....	87
Tab. 23 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů pro 25-OH vitamínu D a vitaminy K u pacientů bez prokázané osteoporózy a u pacientů s prokázanou osteoporózou.....	87
Tab. 24 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů s osteoporózou změřených pomocí LC-MS metody.....	89
Tab. 25 Publikované hladiny koncentrací vitamínu K u pacientů s osteoporózou.....	94
Tab. 26 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů bez prokázané osteoporózy.....	95
Tab. 27 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u dobrovolníků užívající tři měsíce přípravek Femoralex forte – první část.....	97
Tab. 28 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u dobrovolníků užívající tři měsíce přípravek Femoralex forte – druhá část.....	97
Tab. 29 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u pacientů užívajících Femoralex forte.....	99
Tab. 30 Přehled průměrů, SD, mediánů a kvartilů u kontrolní skupiny (u pacientů užívajících vitamin D).....	100
Tab. 31 Referenční rozmezí vitamínu K ₁ , MK-4 a MK-7.....	103
Tab. 32 Hladiny vitamínu K u zdravé populace.....	105
Tab. 33 Koncentrace lipofilních vitamínů a hladina INR u pacientů s CF.....	106
Tab. 34 Referenční rozmezí vitamínů A, D, E a INR.....	107
Tab. 35 Mediány a kvartily vitamínu K při porovnání HPLC metody s LC-MS metodou.....	113
Tab. 36 Porovnání HPLC s FLC a LC-APCI/MS.....	115

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace související s disertační prací:

a) publikace s impakt faktorem (IF):

1. **Dunovska K**, Klapkova E, Sopko B, Cepova J, Prusa R.: LC-MS/MS quantitative analysis of phylloquinone, menaquinone-4 and menaquinone-7 in the human serum of a healthy population. PeerJ. 2019 (**IF: 2.38**)
2. Klapkova E, Cepova J, **Dunovska K**, Prusa R.: Determination of vitamins K1 , MK-4, and MK-7 in human serum of postmenopausal women by HPLC with fluorescence detection. Journal of clinical laboratory analysis. 2018 (**IF: 1.521**)
3. Klapkova E, Cepova J, Pechova M, **Dunovska K**, Kotaska K, Prusa R. A Comparison of Four Methods (Immunochemistry and HPLC) for Determination of 25-(OH)-Vitamin D in Postmenopausal Women. Clinical Laboratory 2017, 63(2):385-388. (**IF: 0.84**)

b) publikace bez IF:

1. Čepová J, Pechová M, Klapková E, **Dunovská K**, Průša R. (Ne)jen vitamin D v graviditě. Acta medicinae 2016, 5(4), 59-61.
2. Laburda M, Vondra K, Zamrazil V, Čepová J, Klapková E, **Dunovská K**. Vitamin K and its importance for the vessel wall and bone metabolism. Osteologický bulletin 2017, 1.
3. Čepová, J., **Dunovská, K.**, Klapková, E., Pechová, M., Průša, R.: Vitamín K (nejen) v těhotenství, New EU Magazine of Medicine, 1-4, 67-71, 2017, ISSN: 1802-1298.”
4. **Dunovská K**, Klapková E, Čepová J, Průša R. Vitamin K a jeho význam v laboratorní medicíně. Klinická biochemie a metabolismus, 26 (47), 2018, No. 1, p. 27–34.
5. **Dunovská, K.**, Čepová, J., Klapková, E.: Vitamin K a jeho potravinové zdroje. Bulletin Sdružení praktických lékařů ČR 2019, 19(6), 28-33.
6. Čepová, J., **Dunovská, K.**, Klapková, E. Vitamin D a vitamin K a jejich souvislost s osteoporózou. Farmakoterapeutická revue 2019, 5(3), 395-399.

Publikace nesouvisející s disertační prací:

a) publikace s IF:

1. Klapkova E, Nescakova M, Melicharcik P, Jahoda D, **Dunovska K**, Cepova J, Prusa R. Vancomycin and its crystalline degradation products released from bone grafts and different types of bone cement. Folia Microbiol 2020 (IF: 1.73)

b) publikace bez IF:

1. **Dunovská K**, Čepová J, Průša R. Porovnání koncentrací glykovaného hemoglobinu u dvou typů odběrových zkumavek Greiner Vacuette na přístroji Capillars 2 Flex-Piercing. FONS 2017, 2, 14-15.
2. Melounová K, **Dunovská K**, Pospíšilová R. Stanovení glykovaného hemoglobinu na analyzátoru Capillars 2 - Flex Piercing. FONS 2016, 4, 12-15.
3. Illner J, Klimeš J, Polák M, **Dunovská K**, Čepová J. Zkušenosti se zaváděním síťového systému glukometrů v režimu POCT ve FN Motol, část druhá – IKK a EHK - II. část, FONS 2016, 3, 14.
4. Illner J, Klimeš J, Polák M, **Dunovská K**, Čepová J. Zkušenosti se zaváděním síťového systému glukometrů v režimu POCT ve FN Motol, část první, FONS 2016, 2, 15.
5. Illner, J., **Dunovská, K.**, Čepová, J.: Stanovení množství křemíku v moči u zdravých jedinců po konzumaci pramenité minerální vody Krondorf, FONS Bulletin, 3, 10-12, 2017, ISSN: 1211-713.

PŘÍLOHY

Příloha 1: Sekvence aminokyselin VKDP

Červenou barvou jsou vyznačena Glu, u kterých probíhá γ -glutamylkarboxylace

Modrou barvou jsou označeny Glu, které nejsou karboxylovány

Růžovou barvou jsou vyznačeny tzv. „Gla domény“

VKDP	Sekvence aminokyselin maturovaného proteinu
Osteokalcin	YLYQWLGAPVPYPDPLEPRREVC EL NPDCE EL ADHIGFQ EA YRRFYGPV
Matrix Gla protein	Y ES H ES M ES Y EL N PF I NR R N A N T F I S P Q Q R W R A K V Q E R I R E R S K P V H EL N R E AC D D Y R L C E R Y A M V Y G Y N A A Y N R Y F R K R R G T K
Gla rich protein	SPKSRDE V N V E N R Q K L R V D EL R R E Y Y EE Q R N E F E N F V EE Q N D E Q E E R S R E A V E Q W R Q W H Y D G L H P S Y L N R H H T
Gas6	ALLPARE AT Q FL R PR Q RR A F Q V F EE A K Q G H L E R E C V E E L C S R E E A R E V F E N D P E T D Y F Y P R Y L D C I N K Y G S P Y T K N S G F A T C V Q N L P D Q C T P N P C D R K G T Q A C Q D L M G N F F C L C K A G W G G R L C D K D V N E C S Q E N G G C L Q I C H N K P G S F H C S C H S G F E L S S D G R T C Q D I D E C A D S E A C G E A R C K N L P G S Y S C L C D E G F A Y S S Q E K A C R D V D E C L Q G R C E Q V C V N S P G S Y T C H C D G R G G L K L S Q D M D T C E L E A G W P C P R H R R D G S P A A R P G R G A Q G S R S E G H I P D R R G P R P W Q D I L P C V P F S V A K S V K S L Y L G R M F S G T P V I R L R F K R L Q P T R L V A E F D F R T F D P E G I L L F A G G H Q D S T W I V L A L R A G R L E L Q L R Y N G V G R V T S S G P V I N H G M W Q T I S V E E L A R N L V I K V N R D A V M K I A V A G D L F Q P E R G L Y H L N L T V G G I P F H E K D L V Q P I N P R L D G C M R S W N W L N G E D T T I Q E T V K V N T R M Q C F S V T E R G S F Y P G S G F A F Y S L D Y M R T P L D V G T E S T W E V E V V A H I R P A A D T G V L F A L W A P D L R A V P L S V A L V D Y H S T K K L K Q L V V L A V E H T A L A L M E I K V C D G Q E H V V T V S L R D G E A T L E V D G T R G Q S E V S A A Q L Q E R L A V L E R H L R S P V L T F A G G L P D V P T S A P V T A F Y R G C M T L E V N R R L L D L D E A A Y K H S D I T A H S C P P V E P A A A

<p>Periostin</p>	<p>NNHYDKILAHSRIRGRDQGPVNCALQQILGTTKCKYFSTCKNWKYSICGQKTTVLYECCPGYMRMEGMKGCPAVLPI DHVYGTGLGIVGATTTQRYSDASKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLDSDIRRGLESNVNVELLNALHSHMINKRMLT KDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNGVVTVNCARIIHGNQIATNGVVHVIDRVLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFRAAAITS DILEALGRDGHFTLFAPTNEAFEKLPKRGVLEERIMGDKVASEALMKYHILNTLQCSESIMGGAVFETLEGNTIEIGCDGD SITVNGIKMVNKKDIVTNGVIHLIDQVLIPDSAKQVIELAGKQQTTFDLVAQLGLASALRPDGEYTLTLLAPVNNAFSD DTLSMDQRLKLLILQNHILKVKVGLNELYNGQILETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCMEKGSKQGRNGAIHIFREIIPKA EKSLHEKLEKQDKRFSTFLSLEAADLKELLTQPGDWTLFVPTNDAFKGMTSEEEKELIRDKNALQNIILYHLTPGVFIGK GFEPGVTNLIKTTQGSKIFLKEVNDTLLVNELKSKESDIMTTNGVIHVVDKLLYPADTPVGNQDLEILNKLIKYIQIF VRGSTFKLEIPVTVYTTKIITKVVPEPKIKVIEGSLQPIIKTEGPTLTKVKIEGEPEFRLIKEGETITEVIHGEPIIKKYTKIIDGV PVEITEKETREERIITGPEIKYTRISTGGGETEETLKKLLQEEVTKVTKFIEGGDGHLFEDEEIKRLLQGDTPVRKLAN KKVQGSRRRLREGRSQ</p>
<p>Faktor II</p>	<p>ANTFLEEVKGNLERECVREETCSYEEAFEALESSTATDVFWAKYTACETARTPRDKLAACLEGNCAEGLGTNYRGH VNITRSGIECQLWRSRYPHKPEINSTTHPGADLQENFCRNPDSSTTGPWCYTDDPTVRRQECESIPVCGQDQVTVAMTPR SEGSSVNLSPPLEQCVDPDRGQQYQGRLAVTTHGLPCLAWASAQAKALSQHDFNSAVQLVENFCRNPDGDEEGVWC YVAGKPGDFGYCDLNYCEEAVEEETGDGLDESDRAIEGRTATSEYQTFNPRTFGSGEADCGLRPLFEKKSLEDKTE RELLESYIDGRIVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSR TRYERNIEKISMLEKIYIHPRYNWRENLDRIALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGNLKE TWTANVGKQPSVLQVVNLPIVERPVCKDSTRIRITDNMFCAGYKPEEGKRGDACEGDSGGPFVMMKSPFNRRWYQM GIVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLKKWIQKVIDQFGE</p>
<p>Faktor VII</p>	<p>ANAFLLELRPGSLERECKEEQCSFEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGR NCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLADGVSCPTVEYPCGKPILEKRNASKPQGRIVGGK VCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYV PGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRMTQDCLQQ SRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKL MRSEPRPGVLLRAPFP</p>

Faktor IX	<p>YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGF EGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEgyRLAENQKSCepAVPFCGRVSVSQTskLTRAETVFPDvd YVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIvTAAHCVETGVKITVV AGEHNIEETEHETEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLeldePLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGR VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGECA MKGKYGIYTKVSRyVNWIKETKLT</p>
Faktor X	<p>ANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYFEAREVFEDSDKTNEFWNKYKDGdQCETSPCQnQGKCKDGLGEYtCTCLEGF EGKNCELFTRKLCsLDNGDCDQfCHEEQNSVVCSCARGYTLADNGKACIPTGPYPCGKQTLERRKRSVAQATSSSGE APDSITWKPYDAADLDPTENPFDLLDFNQTQPERGDNNLTRIVGGQECKDGECPWQALLINEENEGFCGGTILSEFYIL TAAHCLYQAKRFKVRVGDNRNTEQEEGGEAVHEVEVVIKHNRFTKETYDFDIAVLRlKTPITFRMNvAPACLPERDWA ESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVPYVDRNSCKLSSSFIITQNMFCAGYDTKQEDACQGDSSGGPHVTRF KDTYFVTGIVSWGEGCARKGKYGIYTKVTAFLK</p>
Protein C	<p>ANSFLEELRHSSLERECIEEICDFEAKEIFQNVDDTLAFWSKHVDGDQCLVLPLEHPCASLCCGHGTCIDGIGSFSCDC RSGWEGRFRCQREVSFLNCSLDNGGCTHYCLEEVGWRRCSCAPGYKLGDDLLQCHPAVKFPCGRPWKRMEEKRSHL KRDTEDQEDQVDPRLIDGKMTRRGDSPWQVLLDSKKKLACGAVLIHPSWVLTAAHcMDESKLLVRLGEYDLRR WEKWELDLDIKEVFVHPNYSKSTTDNDIALHLaQPATLSQTIVPICLPDSGLAERELNqAGQETLVTGWGYHSSREK EAKRNRTFVLNFIKIPVPHNECSEVMSNMVSENMLCAGILGDRQDACEGDSSGGPMVASFHGTWFLVGLVSWGEGC GLLHNYGVYTKVSRyLDWIHGHIRDK EAPQKSWAP</p>

Protein S	ANSLL E ETKQGN L ERECI E ELCN K EEARE V FEND P ETDYFYPKYLVCLRSFQTGLFTAARQSTNAYPDLRSCVNAIPD QCSPLPCN E DGYMSCKDGKASFTCTCKPGWQ G E K CE F DINE C CKDPSNINGGCSQICDNTPGSYHC S CKNGFV M LSNK KDCKDV E CSLKPSICGTAVCKNIPG D F E CE C PE G YRYNLKSK S CE D IDE C SE N MCAQLCVNYPGGYTCYCDG K KG F KLAQDQK S CE V VSVCLPLNLDTKY E LLYLA E QFAGVVLYLK F RL P E I SR F SA E FD F RTYD S EG V ILYA E SIDHSA W LLI ALRGG K I E VQLK N EHTSKIT T GGDVIN N GLWN M VS V EE L EHSISIKIA K E A VMDINKPGPL F K P EN G L L E T KVYFAG F RK V E S ELIKPIN P RLDGCIRSW N LMK Q AS G IK E II Q E K Q N KHCLV T V E KGSYYP G SGIAQFHIDY N NVSS A EG W HV N TLNIRPSTGT G V M LALVSG N NTVPFAVSLVD S T S E K SQDILL S V E NTVIYRIQ A LSL C SDQ Q SH L E F RVNR R N L E L ST P L KI E TISH E DLQRQLAVLDKAM K AKVATYLGGL P DVP F SATPVNAFY N GC M E V N I NGVQLD L DE A ISKHNDIRAH S C P S V W KK T KN S
Protein Z	AGSYLL E EL F EG N LE K ECY E ICVY E ARE V FENE V VTDE F WRRYKGGSPCISQPCLHNGSCQDSIWGYTCTCSPG Y E GSNC E LAK N E C HP E RTDGCQHFCLPG Q E S YTCSCAQGYRL G EDHKQCVPHDQCACGVLT S E K RAPDLQDLPWQ V KL T N SE G KDFCGG V I R EN F VLTTAKCSLLHRNITVKTYFN R TSQDPLMIKITHVHVHMRYDADAG E NDLS L LE L EW P IQ C PGAGLPVCT P E K DF A E H LLIPRTRGLLSGWARNGTDLGNSL T TRPVTL V E G EECGQVLN V T V TRTY C ERSS V AAM H WMDGS V TR E HRGS W FLT G VLGSQP V GGQA H M V LVTK V SR Y SL W FK Q IM N
PRGP1	ANGFFEEIRQGNIERECKEEFCTFEEAREAFENNEKTKEFWSTYTK AQQGESNRGSDWFQFYLT F PLIFGLFI L L V I FLI WRC F LR N K T RR Q T V TEGHIP F P Q HL N I T PPPP P DE V FDSSGLSPG F LG Y V V GRSD S V S TRLS N CD P PP T Y E E A T G Q V N LQRSE T EP H LD P PP E Y E DIVNS S AS A IP M VP V TT I K
PRGP2	ANHWDLELLTPGNLERECLEERC SW E E A RE Y FED N TL T ER F W E SY I Y N G K G R GRVD V AS L AVGLTGGILL I V L A GL G A F W Y L R W R Q HR G Q Q PC P Q E AG L IS P LS P LN P LG P PT P LP P PP P PP P GL P TY E Q A LA S G V HD A PP P PY T SL R RP H

TMGP3	AN E FL EEL RQGT IEREC M E ICS YEE V K EV FEN K E KT ME FWKGYPN AVYS VRDPSQSSD AMY VVV PLL GV ALL LIVIA LFIIWRCQLQK AT RHHPSYAQNRYLASRAGHTLPRVMVYRGTVHSQ G EP S GH REA ANSPQVVLG PS RGGRTTVRL ES TLYLP E LSLSRLSSTTPPPSY EE VTAPQESS SE ASVSYS DP PKY EE I VA ANPGADK
TMGP4	LLYNRFDL E LFTPGNL EREC N EEL CNY EE ARE I FV DE DKTIAFWQ E YSAKGPTTKSDGN RE KIDVMGLLTGLIAAGVF LVIFGLLGYYLCITKCNRLQHPCSSAVY ER GRHTPSIIFRR PEE AALSPLPSV ED AGLPSY E Q AV ALTRKHSVSPPPYP GHTKGFRVFKK S MSLPSH
Transtyretin	MASHRLLLLCLAGLVFV S EAGPTGT G ESK C PLMVKVLD AV RGSPAINVAVHVFRKAADDTW E PFASGKTS ES GLHG LT TE EE FV E GIYKV E IDTKSYWKALGISPF HE HA E VVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNP KE