Maastricht University

Absorption, tissue distribution and bioactivity of vitamin K and related compounds in the rat

Citation for published version (APA):

Ronden, J. E. (1998). *Absorption, tissue distribution and bioactivity of vitamin K and related compounds in the rat*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht.
https://doi.org/10.26481/dis.19980306jr

Document status and date:
Published: 01/01/1998

DOI:
10.26481/dis.19980306jr

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2024

Summary and general discussion

Vitamin K has a well-established function as a cofactor for the mammalian enzyme γ-glutamylcarboxylase which converts glutamate (Glu) residues into γ-carboxyglutamate (Gla) residues of several proteins. Vitamin K-dependent proteins include the blood coagulation factors II (prothrombin), VII, IX and X, protein C, S and Z; the bone proteins BGP (osteocalcin) and MGP as well as a recently discovered protein, Gas-6. **Chapter 1** reviews literature on vitamin K in general (discovery, functions, chemical structures and sources); the mammalian requirement of vitamin K as well as the pharmacokinetic properties of vitamin K and two other structurally strongly related compounds: ubiquinone and plastoquinone.

Vitamin K and prenylated benzoquinones (ubiquinone and plastoquinone) are highly comparable regarding their structure, their function in plants and with respect to the food items in which they occur. Because of these similarities, we have investigated whether ubiquinone and plastoquinone have either vitamin K activity or vitamin K-antagonistic activity in vitro (**chapter 2.1 and 2.2**) and in vivo (**chapter 2.3**). Neither decyl-derivatives nor authentic compounds of ubiquinone and plastoquinone could act as cofactors for γ-glutamylcarboxylase. In contrast, they showed vitamin K-antagonistic activity in the in vitro γ-glutamylcarboxylase and KO-reductase assays. The inhibition may be due to a mechanism on an enzymatic level, e.g. the compounds may interact with the substrate binding site. On the other hand, a more chemical based mechanism of interaction cannot be excluded. We found that redox-active compounds having higher redox potentials than that of the K-KH_2 equilibrium all inhibited the KH_2-dependent carboxylase. In vivo, we did not observe any effects on plasma prothrombin values in rats after oral or subcutaneous administrations of ubiquinone-9 and 10 (1 to 10 mg per day) during 2 weeks. Tissue analysis revealed that both serum and liver ubiquinone levels increased after oral or subcutaneous administration of ubiquinone-9 or 10. Subcellular fractionation of the liver showed an equal distribution for vitamin K and ubiquinones with a relatively high degree of accumulation in microsomes, mitochondria and nuclei. Remarkably, the concentration of vitamin K in microsomes was about 3 orders of magnitude lower than that for ubiquinones, whereas no inhibition of the γ-glutamylcarboxylase was measured. So, the discrepancy between in vitro and in vivo data cannot be explained on the basis of differences in (subcellular) tissue distribution of vitamin K and ubiquinones. Possibly, intracellular transport systems are capable of preventing the 1000-fold excess of endogenous and nutritional ubiquinones from interacting with the enzymes of the vitamin K-cycle. Our results suggest that the reported benificial effect of administration of high doses of ubiquinones to patients suffering from cardiovascular diseases, is not associated with an anticoagulant effect of ubiquinones.[1] Alternatively, the antioxidant activity of ubiquinones may contribute to the prevention of lipid peroxidation of membranes and LDL.

In **chapter 3** we have focussed on the absorption, tissue distribution and bioactivity of compounds known to possess vitamin K-activity, using the rat as an experimental animal model. We have investigated the dose-response of phylloquinone (vitamin K_1), menaquinone-4 (MK-4) or menaquinone-9 (MK-9) on plasma prothrombin synthesis in time after three administration routes: orally, subcutaneously and colorectally (**chapter 3.1**). The rats were rigorously prevented from coprophagy by the use of tail cups. Our results showed that the K-vitamers were hardly absorbed from the colon. After both oral and subcutaneous administration, a maximal effect of phylloquinone on prothrombin synthesis was noticed after 6-10 hours, whereas for MK-9 this was much later. We found that menaquinone-9 had a sustained effect on prothrombin synthesis. On a molar base, the vitamin K bioactivity in rats was in the order: MK-9 > phylloquinone > MK-4. In **chapter 3.2** we studied the effect of chronic administration of a large range of accurately defined doses of vitamin K on both plasma prothrombin concentrations and on the distribution of vitamin K in various tissues. The minimal dietary requirement (MDR) for both phylloquinone and MK-4 to attain maximal prothrombin synthesis was established. The MDR-values were 0.6 and 6-10 µg/g food for phylloquinone and MK-4 respectively and the difference was explained by the limited hepatic accumulation of MK-4. The MDR-value can only be defined for the synthesis of vitamin K-dependent clotting factors and is not necessarily similar for other Gla-proteins. Vitamin K was found in a wide variety of tissues. The distribution at low to moderate intake levels of vitamin K is tissue-specific, with relatively high MK-4 levels in pancreas and testis versus relatively high phylloquinone levels in liver and heart. At high to very high intake levels of vitamin K (3 mg/g food), the main vitamin K stores appeared to be liver and heart. In humans, Thijssen and Drittij-Reijnders[2] observed a comparable tissue-specific distribution pattern for phylloquinone and MK-4. Remarkably, we also found accumulation of substantial amounts of MK-4 after dietary intake of phylloquinone. This effect was most prominent in pancreas and testis and suggests that phylloquinone is converted into MK-4. This conversion has been observed previously in various animal tissues by others.[3-6] In 1964, Billeter and Martius suggested a role for the intestinal bacteria in this conversion.[4] To elucidate whether gut bacteria are involved in the conversion of phylloquinone into MK-4, we studied in **chapter 3.3** the tissue distribution of vitamin K in germ-free rats. These rats do not possess an intestinal flora and are kept in sterile isolators. Our results showed MK-4 accumulation after oral intake of phylloquinone in most extrahepatic tissues of the germ-free rat. The tissue-specific distribution of MK-4 was comparable with that observed in conventional rats after phylloquinone intake. Moreover, a similar tissue distribution pattern was also observed after menadione supplementation in germ-free rats. Our data demonstrate that the conversion of phylloquinone into MK-4 is not mediated by intestinal bacteria. Neither the mechanism nor the reason for this conversion are known.

Mammalian vitamin K status depends on two potential sources: 1) the diet and 2) the intestinal bacteria which produce a wide range of menaquinones. As is dicussed in paragraph

1.2.9, the contribution of the intestinal flora to human vitamin K status has remained uncertain, leaving the diet as the major source of vitamin K.
Since the development of sensitive HPLC methods to determine vitamin K, several food composition tables for phylloquinone have been published. We have assessed the concentration of both phylloquinone and menaquinones in various nutrients selected from an European diet **(chapter 4)**. High levels of phylloquinone were observed in vegetables such as spinach and sauerkraut. Margarin based on plant oils also contains relatively high amounts of phylloquinone. MK-4 was mainly found in products of animal origin, whereas long-chain menaquinones were predominantly present in dairy produce, notably cheese and curd cheese. The food composition of a Dutch meal makes it likely that phylloquinone contents in the food are higher than the total content of menaquinones. However, differences in absorption, transport and cofactor activity between phylloquinone and menaquinones from food may determine the in vivo vitamin K-activity. The uptake of vitamin K from food is highly variable and depends on several factors such as 1) the amount of fat in the diet;[7, 8] 2) the degree to which it is bound to components in the foodmatrix (for example, the binding to thylakoid membranes in vegetables or the solubilization in fat like in cheese). Our study showed that if meals of generally accepted size and composition are consumed, a single menaquinone-rich meal (cheese, curd cheese, chicken) hardly affected vitamin K serum levels, whereas a phylloquinone-rich meal from green vegetable origin increased serum vitamin K levels. Food composition tables on vitamin K contents may prove to be a valuable tool for the management of patients on oral anticoagulant therapy. Instability of INR-values frequently occurs in these patients and variations in dietary vitamin K intake has been mentioned as one of the possible causes of this instability. In addition to the measurement of food contents of vitamin K, the bioavailability of vitamin K from the diet needs to be determined to know if dietary vitamin K can influence the level of anticoagulation. Therefore, we offered the earlier mentioned meals seperately to two mildly anticoagulated male volunteers and measured the effect on blood coagulation. No marked changes were observed in the INR-values or at the plasma factor VII and factor II levels as a consequence of the meals. It should be noticed that our results were obtained in only two volunteers and need to be confirmed in a larger population. A follow-up study should also include experimental conditions like the frequency of consumption of vitamin K-rich meals and use of oral anticoagulants with different half-life times.

Nowadays, high doses of MK-4 (45 mg per day) are prescribed in Japan for the treatment of osteoporosis in elderly women. In Europe, several trials with post-menopausal or osteoporotic women are conducted with high doses of phylloquinone. Thus far, side-effects of high doses of vitamin K have not been reported in the literature. In **chapter 5** we have studied whether such high doses of phylloquinone or MK-4 could affect thrombosis tendency, platelet aggregation and clotting parameters in the rat. We used the rat aorta loop model to study the arterial thrombosis tendency. This model is based on a method by which a loop-shaped polyethylene cannula is inserted into the abdominal aorta of a rat. At places

where the cannula is in permanent contact with the vessel wall, endothelial damage and flow disturbances result in the formation and growth of a thrombus, which reaches an occlusive state after about five days. The period between insertion and complete obstruction of the loop is called the obstruction time (OT) and is a measure for the arterial thrombosis tendency of the rat. The obstruction time is inversely correlated with the arterial thrombosis tendency. High doses of either phylloquinone or MK-4 (3 mg K/g diet) did not significantly affect platelet aggregation, thrombin potential or plasma prothrombin concentrations. On the other hand, MK-4 significantly prolonged the mean obstruction time, whereas phylloquinone shortened the OT at equal intake levels. Since both vitamers only differ in their aliphatic side chain, we also tested the effect of their side chains on the arterial thrombosis tendency: geranylgeraniol in the case of MK-4 and phytol in the case of phylloquinone. A similar trend on arterial thrombosis tendency was observed for the side chains as for the whole vitamin K compounds, suggesting that the modulation of the arterial thrombosis tendency is accomplished by the side chain of vitamin K. Hara et al. observed that both MK-4 and geranylgeraniol by itself showed an activity which differed from that of phylloquinone. Also in the case of these authors, this did not concern the effect on the carboxylation reaction but, instead, the affection of the proliferation and differentiation of osteoclasts in a co-culture system.[9] These observations suggest a new function for vitamin K which is not related to the cofactor activity for the carboxylation reaction in which the naphtoquinone structure plays an essential role. The mechanism which underlies the effect of vitamin K on arterial thrombosis tendency is not clear at the moment.

The presence of vitamin K in a wide variety of tissues suggests the existence of thusfar unknown physiological functions for vitamin K or vitamin K-dependent proteins. One of these functions may be related to the above described effect on arterial thrombosis tendency. Furthermore, Vervoort et al.[10] suggested an antioxidant function for phylloquinone in preventing lipid peroxidation induced by various prooxidants in vitro.

During the last few years, many new Gla-proteins have been discovered which are not involved in the blood coagulation process. Examples are osteocalin (regulation of bone growth), matrix Gla-protein (inhibition of arterial mineralization), Gas6 (induction of cell growth) and two new so-called proline-rich Gla-proteins with a thus far unknown function.[11] The fact that vitamin K is involved in so many different physiological processes, makes that the scientific interest for this thus far relatively unknown vitamin increases rapidly.

Samenvatting en algemene discussie

In zoogdieren heeft vitamine K een goed gedocumenteerde functie als cofacter voor het γ-glutamylcarboxylase enzym, dat in sommige eiwitten glutaminezuur residuen (Glu) omzet in γ-carboxyglutaminezuur residuen (Gla). Tot de vitamine K-afhankelijke eiwitten behoren de bloedstollingsfactoren II (protrombine), VII, IX en X, de eiwitten C, S en Z; de boteiwitten BGP (osteocalcine) en MGP evenals een recent ontdekt eiwit, Gas-6. **Hoofdstuk 1** geeft een literatuuroverzicht omtrent vitamine K in het algemeen (ontdekking, functies, chemische structuren en bronnen); de vitamine K behoefte van zoogdieren evenals de farmacokinetische eigenschappen van vitamine K en twee structureel nauw verwante stoffen: ubichinon en plastochinon.

Vitamine K en geprenyleerde benzochinonen (ubichinon en plastochinon) zijn sterk vergelijkbaar zijn wat betreft hun structuur, hun functie in planten en de voedingsmiddelen waarin ze voorkomen. Geïnspireerd door deze overeenkomsten, hebben we onderzocht of ubichinon en plastochinon vitamine K activiteit danwel vitamine K-antagonistische activiteit vertonen in vitro (**hoofdstuk 2.1** en **2.2**) en in vivo (**hoofdstuk 2.3**). Noch de deciel-derivaten noch het authentieke ubichinon en plastochinon konden als cofactor fungeren voor het γ-glutamylcarboxylase. Integendeel, ze vertoonden een vitamine K-antagonistische werking by de γ-glutamylcarboxylase en KO-reductase analyses in vitro. De remming zou mogelijk toe te schrijven zijn aan een mechanisme op enzymatisch niveau, de genoemde stoffen zouden bijvoorbeeld een interactie kunnen aangaan met de bindingsplaats voor het substraat. Anderzijds kan een mechanisme dat gebaseerd is op een meer chemische interactie niet worden uitgesloten. We hebben gevonden dat redox-actieve bestanddelen met een hogere redoxpotentiaal dan die van het K-KH_2 evenwicht, allen het KH_2-afhankelijke carboxylase remmen. In vivo hebben we geen effecten kunnen waarnemen op plasma protrombine concentraties in ratten na orale of subcutane toedieningen van ubichinon-9 en -10 (1 tot 10 mg per dag) gedurende 2 weken. Weefselanalyse onthulde dat na orale of subcutane toediening van ubichinon-9 of -10, de ubichinon niveau's toenamen in zowel serum als lever. Subcellulaire fractionering van de lever toonde een gelijke verdeling aan voor vitamine K en ubichinonen met een relatief sterke accumulatie in de microsomen, de mitochondriën en de kernen. Het is opvallend dat de vitamine K concentratie in de microsomen ongeveer 3 ordes van grootte lager was dan die van de ubichinonen, terwijl het γ-glutamylcarboxylase niet meetbaar werd geremd. De discrepantie tussen de in vitro en in vivo data kan dus niet worden verklaard op basis van verschillen in (subcellulaire) weefselverdeling van vitamine K en ubichinonen. Mogelijk zijn intracellulaire transportsystemen in staat om te voorkomen dat de 1000-voudige overmaat aan endogene- en voedingsubichinonen een interactie aangaan met de enzymen van de vitamine K-cyclus. Onze resultaten suggereren dat het gerapporteerde gunstige effect van toediening van hoge doses ubichinonen aan cardiovasculaire patiënten, niet geassocieerd is met een

anticoagulant effect van ubichinonen.[1] Aan de andere kant zou de antioxidant activiteit van ubichinonen kunnen bijdragen aan het voorkomen van lipide peroxidatie van membranen en LDL.

In **hoofdstuk 3** hebben we ons gericht op de absorptie, weefselverdeling en bioactiviteit van stoffen waarvan bekend is dat ze vitamine K-activiteit bezitten, waarbij we gebruik hebben gemaakt de rat als experimenteel diermodel. We hebben de respons onderzocht van een éénmalige dosis fyllochinon (vitamine K_1), menachinon-4 (MK-4) of menachinon-9 (MK-9) op de plasma protrombinesynthese, waarbij gebruik gemaakt werd van drie toedieningsroutes: oraal, subcutaan en colorectaal en waarbij het effect werd vervolgd in de tijd (**hoofdstuk 3.1**). Door gebruikmaking van aan de staart vastgehechte opvangbuizen voor de faeces werd coprofagie door de ratten rigoreus voorkomen. Onze resultaten toonden aan dat de K-vitamines nauwelijks werden geabsorbeerd in het colon. Na zowel orale als subcutane toediening, werd na 6-10 uur een maximaal effect van fyllochinon op de protrombinesynthese gezien, voor menachinon-9 was dat veel later. We vonden dat menachinon-9 een relatief langdurig effect had op de protrombine synthese. Op molaire basis was de bioactiviteit van vitamine K in ratten als volgt: MK-9 > fyllochinon > MK-4. In **hoofdstuk 3.2** hebben we het effect bestudeerd van het chronisch toedienen van vitamine K in verschillende en nauwkeurig bepaalde doseringen op zowel de protrombineconcentraties in plasma, alsmede de verdeling van vitamine K over verscheidene weefsels. De minimale voedingsbehoefte (Engelse afkorting: MDR) voor zowel fyllochinon als MK-4 om maximale protrombinesynthese te bereiken werd vastgesteld. De MDR-waarden waren 0.6 en 6-10 µg/g voedsel voor fyllochinon en MK-4 respectievelijk en het verschil werd verklaard door de beperkte hepatische accumulatie van MK-4. De MDR-waarde kan alleen worden gedefinieerd voor de synthese van vitamine K-afhankelijke stollingsfactoren en hoeft niet noodzakelijk hetzelfde te zijn voor andere Gla-eiwitten. Vitamine K werd in een grote variëteit aan weefsels gevonden. De verdeling van vitamine K is niet gelijkmatig over alle weefsels: bij lage tot matige vitamine K-inname vonden we relatief hoge MK-4 niveau's in het pancreas en de testis en relatief hoge fyllochinon niveau's in de lever en het hart. Bij hoge tot zeer hoge inname niveau's van vitamine K (3 mg/g voeding), bleken de lever en het hart de voornaamste vitamine K opslagplaatsen te zijn. In de mens werd door Thijssen en Dritij-Reijnders[2] een vergelijkbaar weefsel-specifiek verdelingspatroon voor fyllochinon en MK-4 waargenomen. We vonden verder een opmerkelijke accumulatie van MK-4 na orale toediening van fyllochinon. Dit effect was het grootst in het pancreas en de testis en suggereert dat fyllochinon wordt omgezet in MK-4. Deze omzetting is ook door anderen beschreven[3-6] in verscheidene dierlijke weefsels. In 1964 suggereerden Billeter en Martius[4] een rol voor de darmbacteriën in deze omzetting. Om de mogelijke betrokkenheid van darmbacteriën bij de omzetting van fyllochinon in MK-4 op te helderen, hebben we in **hoofdstuk 3.3** de weefselverdeling van vitamine K in kiemvrije ratten bestudeerd. Deze ratten bezitten geen darmflora en worden in steriele isolatoren gehuisvest. Onze resultaten toonden MK-4 accumulatie na orale inname van

fyllochinon in de meeste extra-hepatische weefsels van de kiemvrije rat. De weefsel-specifieke verdeling van MK-4 was vergelijkbaar met die in conventionele ratten na fyllochinon inname. Bovendien werd een soortgelijk weefselverdelingspatroon ook waargenomen na menadion suppletie in kiemvrije ratten. Onze data tonen aan dat bij de omzetting van fyllochinon in MK-4, darmbacteriën niet zijn betrokken. Zowel het mechanisme als de reden voor deze omzetting zijn niet bekend.

De vitamine K status in zoogdieren is afhankelijk van twee potentiële bronnen: 1) de voeding en 2) de darmbacteriën die een reeks menachinonen produceren. Zoals is bediscussieerd in paragraaf 1.2.9, is de bijdrage van de darmbacteriën aan de humane vitamine K status onzeker, waardoor de voeding overblijft als de voornaamste bron van vitamine K. Sinds de ontwikkeling van gevoelige HPLC methoden om vitamine K te bepalen, zijn er meerdere voedingstabellen voor fyllochinon gepubliceerd. We hebben de concentratie bepaald van zowel fyllochinon als menachinonen in een aantal voedingsmiddelen die zijn geselecteerd uit een Europees dieet (**hoofdstuk 4**). Hoge fyllochinon niveau's werden aangetoond in groenten als spinazie en zuurkool. Ook plantaardige margarine bevat relatief hoge hoeveelheden fyllochinon. MK-4 werd voornamelijk gevonden in producten van dierlijke oorsprong, terwijl lange-keten menachinonen overwegend aanwezig waren in zuivelprodukten, met name kaas en kwark. De voedingssamenstelling van een Nederlandse maaltijd maakt het waarschijnlijk dat het gehalte aan fyllochinon in het voedsel hoger is dan het totaal aan menachinonen. Echter, verschillen in absorptie, transport en cofactor activiteit tussen fyllochinon en menachinonen uit de voeding kunnen een belangrijke factor zijn voor de in vivo vitamine K-activiteit. De opname van vitamine K uit voedsel varieert sterk en is afhankelijk van o.a. de hoeveelheid vet in de voeding[7,8] en de mate waarin het gebonden is aan componenten uit de voedselmatrix (bijvoorbeeld de binding aan thylakoïde membranen in groenten of de vetoplosbaarheid in kaas). Onze studie toonde aan dat wanneer maaltijden van algemeen geaccepteerde grootte en samenstelling worden geconsumeerd, een enkele menachinon-rijke maaltijd (kaas, kwark, kip) de vitamine K gehaltes in serum nauwelijks beïnvloedde, terwijl een fyllochinon-rijke maaltijd van groene groente-oorsprong de serum vitamine K niveau's liet stijgen. Voedingstabellen over vitamine K gehaltes kunnen een waardevol instrument zijn voor de behandeling van patiënten op orale antistollingstherapie. Instabiliteit van INR-waarden komt frequent voor in deze patiënten en variaties in de voedingsinname van vitamine K werd genoemd als één van de mogelijke oorzaken van deze instabiliteit. Naast de meting van de vitamine K gehaltes in voeding, moet ook de biologische beschikbaarheid van vitamine K uit het dieet worden bepaald om te weten of vitamine K uit voeding het niveau van antistolling kan beïnvloeden. Daarom hebben wij de eerder genoemde maaltijden apart aan twee mild geantistolde mannelijke vrijwilligers aangeboden en het effect op de bloedstolling gemeten. Er werden geen opvallende veranderingen waargenomen als gevolg van de maaltijden op de INR-waarden of op de plasma factor VII en factor II concentraties. Het moet opgemerkt worden dat onze resultaten in slechts twee

proefpersonen zijn verkregen en dat ze bevestigd moeten worden in een grotere populatie. Een vervolgstudie zou ook experimentele condities als de consumptiefrequentie van vitamine K-rijke maaltijden en het gebruik van orale antistollingsmiddelen met verschillende halfwaardetijden moeten bevatten.

Tegenwoordig worden in Japan hoge doses MK-4 (45 mg per dag) voorgeschreven voor de behandeling van osteoporose in oudere vrouwen. In Europa worden verscheidene onderzoeken uitgevoerd waarbij hoge doses fyllochinon worden gegeven aan postmenopauzale of osteoporotische vrouwen. Tot nu toe zijn er in de literatuur nog geen bijwerkingen van hoge doses vitamine K gerapporteerd. In **hoofdstuk 5** hebben we bestudeerd of zulke hoge doses fyllochinon of MK-4 van invloed zouden kunnen zijn op de tromboseneiging, plaatjesaggregatie en stollingsparameters in de rat. We hebben het aorta-lus model gebruikt om de arteriële tromboseneiging te bestuderen. Dit model is gebaseerd op een methode waarbij een lus-vormige polyethyleen buis wordt geplaatst in de abdominale aorta van de rat. Op de plaatsen waar de buis in permanent contact verkeert met de vaatwand, resulteren endotheliale beschadigingen en wervelingen in de bloeddoorstroming in de aanmaak en groei van een trombus, die na ongeveer vijf dagen een afgesloten toestand bereikt. De periode tussen het plaatsen en de complete afsluiting van de lus wordt de obstructietijd (OT) genoemd en is een maat voor de arteriële tromboseneiging van de rat. De obstructietijd is omgekeerd evenredig met de arteriële tromboseneiging. Hoge doses fyllochinon of MK-4 (3 mg vitamine K/g voeding) beïnvloedde de plaatjesaggregatie, trombine potentiaal of plasma protrombine concentraties niet significant. Anderzijds verlengde MK-4 de gemiddelde obstructietijd significant, terwijl fyllochinon de OT verkortte bij gelijke innameniveau's. Aangezien beide vitamines alleen verschillen in hun alifatische zijketen, hebben we ook het effect getest van hun zijketens *op de arteriële tromboseneiging*: geranylgeraniol in het geval van MK-4 en fytol in het geval van fyllochinon. Een soortgelijke trend op de arteriële tromboseneiging werd waargenomen voor de zijketens als voor de hele vitamine K bestanddelen, wat suggereert dat de modulatie van de arteriële tromboseneiging wordt gemedieerd door de zijketen van vitamine K. Hara et al.[9] namen waar dat zowel MK-4 als geranylgeraniol zelf een activiteit bezitten die verschilt van fyllochinon. Ook in het geval van deze auteurs betrof dit niet een effect op de carboxyleringsreactie maar een beïnvloeding van de proliferatie en differentiatie van osteoclasten in een co-cultuur systeem. Deze observaties suggereren een nieuwe functie voor vitamine K die niet gerelateerd is aan de cofactor activiteit voor de carboxyleringsreactie, waarbij de naftochinon structuur een essentiële rol speelt. Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan het effect van vitamine K op de arteriële tromboseneiging is nog niet duidelijk op dit moment.

De aanwezigheid van vitamine K in een grote verscheidenheid aan weefsels suggereert het bestaan van tot nu toe onbekende fysiologische functies voor vitamine K of vitamine K-afhankelijke eiwitten. Eén van deze functies zou gerelateerd kunnen zijn aan het hierboven beschreven effect op de arteriële tromboseneiging. Bovendien suggereerden Vervoort

et al.[10] een antioxidant functie voor fyllochinon waarbij lipide peroxidatie, geïnduceerd door verschillende pro-oxydanten in vitro, kan worden voorkomen.

De laatste jaren zijn er vele nieuwe Gla-eiwitten ontdekt, die niet betrokken zijn bij het bloedstollingsproces. Voorbeelden zijn osteocalcine (regulatie botgroei), matrix Gla-proteïne (remming arteriële mineralisatie), Gas6 (inductie celgroei) en twee nieuwe zogenaamde proline-rijke Gla-eiwitten, waarvan nog geen functie bekend is.[11] Het feit dat vitamine K betrokken blijkt bij zoveel verschillende fysiologische processen maakt dat de wetenschappelijke belangstelling voor dit tot op heden betrekkelijk onbekende vitamine snel toeneemt.

References

1. Greenberg, S. & Frishman, W.H. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. J. Clin. Pharmacol. 1990; 30: 596-608.
2. Thijssen, H.H.W. & Drittij-Reijnders, M.J. Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. Br. J. Nutr. 1996; 75: 121-127.
3. Billeter, M. & Martius, C. Über die Umwandlung von Phyllochinon (Vitamin K_1) in Vitamin $K_{2(20)}$ im Tierkörper. Biochem. Z. 1960; 333: 430-439.
4. Billeter, M., Bolliger, W. & Martius, C. Untersuchungen über die Umwandlung von verfütterten K-Vitaminen durch Austausch der Seitenkette und die Rolle der Darmbacterien dabei. Biochem. Z. 1964; 340: 290-303.
5. Thijssen, H.H.W., Drittij-Reijnders, M.J. & Fischer, M.A. Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations. J. Nutr. 1996; 126: 537-543.
6. Thijssen, H.H.W. & Drittij-Reijnders, M.J. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. Br. J. Nutr. 1994; 72: 415-425.
7. Gijsbers, B.L.M.G., Jie, K-S.G. & Vermeer, C. Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. Br. J. Nutr. 1996; 76: 223-229.
8. Uematsu, T., Nagashima, S., Niwa, M., Kohno, K., Sassa, T., Ishii, M., Tomono, Y., Yamoto, C. & Kanamaru, M. Effect of dietary fat content on oral bioavailability of menatetrenone in humans. J. Pharm. Sci. 1996; 85: 1012-1016.
9. Hara, K., Akiyama, Y., Nakamura, T., Murota, S. & Morita, I. The inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain. Bone 1995; 16: 179-184.
10. Vervoort, L.M.T., Ronden, J.E. & Thijssen, H.H.W. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. Biochem. Pharmacol. 1997; 54: 871-876.
11. Kulman, J.D., Harris, J.E., Haldeman, B.A. & Davie, E.W. Primary structure and tissue distribution of two novel proline rich gamma-carboxyglutamic acid proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 1997; 94: 9058-9062.