

The role of vitamin K-dependent proteins in tissue calcification

Citation for published version (APA):

Jie, G. K. S. (1995). *The role of vitamin K-dependent proteins in tissue calcification*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19950623gj>

Document status and date:

Published: 01/01/1995

DOI:

[10.26481/dis.19950623gj](https://doi.org/10.26481/dis.19950623gj)

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.

SUMMARY

Vitamin K is an essential cofactor for the formation of the unusual aminoacid γ -carboxyglutamate (Gla) which is found in a limited number of proteins. In these so called 'vitamin K-dependent' or Gla-proteins, the Gla-residues are involved in the calcium-dependent binding to negatively charged phospholipid membranes (*e.g.* the blood coagulation factors FII, VII, IX and X) or to hydroxyapatite (*e.g.* the bone Gla proteins osteocalcin and matrix Gla-protein (MGP)). In the case of an impaired vitamin K-status, the formation of Gla is hampered and the Gla-proteins are synthesized and secreted in a functionally impaired form. These so called undercarboxylated or descarboxy Gla-proteins, lack the aminoacid Gla but contain glutamate (Glu) instead (**chapter 1**). Up until now, the diagnosis of vitamin K-deficiency has mainly relied on tests measuring the functional activity of the hepatic Gla-proteins involved in blood coagulation. In using the coagulation factors as a marker for vitamin K-status, we must conclude that vitamin K-deficiency is extremely rare in the general population. There is evidence, however, that tests based on blood coagulation factors are not sensitive to a marginal vitamin K-status.^{1,2}

The studies described in this thesis are investigations into the relationship between vitamin K and aspects of calcium or bone metabolism (chapters 2,3,4), as well as the vessel wall calcification process occurring in the atherosclerotic plaque (chapters 6,7,9).

Vitamin K-status was assessed with the hydroxyapatite binding assay of serum osteocalcin. This assay is based on the 'vitamin K-dependent' property of osteocalcin to bind to hydroxyapatite via its Gla-residues. Serum osteocalcin (irOC) with high affinity for hydroxyapatite (irOC_{bound}) is assumed to represent the fully carboxylated fraction, whereas that with low (irOC_{free}) affinity is thought to represent the undercarboxylated fraction.³ The hydroxyapatite binding capacity (HBC) (irOC_{bound} expressed as the percentage of the total irOC levels), can be used as a semi-quantative measure for the Gla-content of serum osteocalcin (Figure 3, chapter 1). Low HBC levels (<70%) are commonly found in subjects with an impaired vitamin K status such as those using vitamin K-antagonists (chapter 3).

The hydroxyapatite binding assay was validated in a population at high risk for a marginal vitamin K status: the newborn babies (**chapter 2**). Pregnant women were treated with either vitamin K (1 mg/day) or a placebo during the last 6

weeks of their pregnancy. The fact that all babies from the placebo treated group had very high concentrations of $\text{irOC}_{\text{free}}$ and HBC levels as low as those in adults on oral anticoagulant therapy, strongly suggested they had a poor vitamin K status. This suggestion was confirmed by the observation that the 'vitamin K-treated' babies had significantly lower $\text{irOC}_{\text{free}}$ and higher HBC levels. Since no descarboxy-prothrombin was detectable in any of the tested cord blood samples, these results then indicate that the HBC of serum osteocalcin is a more sensitive marker for measuring vitamin K than tests based on the blood coagulation prothrombin.

In the first part of the study described in **chapter 3** we have investigated the extent to which the vitamin K-status affects urinary calcium excretion. This was done in a placebo-controlled study among postmenopausal women. Vitamin K-treatment appeared to significantly decrease the fasting urinary calcium excretion in the so called fast losers of calcium (calcium/creatinine ratio > 0.5). To investigate whether vitamin K-antagonists would have an opposite effect, we performed a case control study among patients on long-term stable anticoagulant therapy. Only the group of young men (aged 25-45) contained a significantly higher fraction (7/27) of fast losers as compared with the age-matched control group (0/25). The positive association of the fasting urinary calcium with the urinary hydroxyproline excretion ($r=0.52$, $p<0.004$) indicated that the high calcium excretion in the anticoagulated young men may be related to a high bone resorption.

Chapter 4 deals with the effect of vitamin K-treatment (1 mg/day during 2 weeks) on serum osteocalcin (irOC) levels in women aged 20-85. Since vitamin K-supplementation mainly affected irOC levels in women older than 50, a second study was performed in elderly women (aged 50-85) with a longer treatment period of 3 months. Vitamin K treatment increased the serum levels of two markers for bone formation (total irOC levels and bone-specific alkaline phosphatase), whereas a 30% decrease in fasting urinary calcium excretion was noticed in the fast losers of urinary calcium. These findings are supported by several *in vitro* studies which have shown that vitamin K stimulates osteocalcin and alkaline phosphatase excretion by osteoblastic cells⁴ and decreases bone resorption.^{5,6,7}

A surprising observation of this study was that vitamin K-treatment mainly increased $\text{irOC}_{\text{bound}}$ levels, whereas the mean $\text{irOC}_{\text{free}}$ levels remained unaffected. This is in contrast with the situation found in newborn babies (chapter 2), who had lower $\text{irOC}_{\text{free}}$ levels upon vitamin K-treatment. These findings indicate that

irOC_{free} (especially in postmenopausal women) may not only represent undercarboxylated osteocalcin, as assumed up until now.^{2,3} The results of the study described in chapter 4 indicate that irOC_{free} may also partly represent osteocalcin fragments, probably derived from the process of bone resorption. Additional support for this view has recently been published by Minisola *et al.*⁸ Of interest is that the presence of osteocalcin fragments has recently been confirmed by Garnero *et al.* who, using a set of various monospecific antibodies, showed that 64% of the total circulating immunoreactive antigens can be ascribed to osteocalcin fragments.⁹

In the vitamin K-supplementation studies we have performed thus far, we have used a dosage of 1 mg phylloquinone from a pharmaceutical preparation (Konaktion[®]). Because of its highly soluble form, its bioavailability can be expected to be fairly good. We have therefore compared the bioavailability of 1 mg phylloquinone presented in the form of spinach (with or without butter) with that of Konaktion[®] (chapter 5). Compared with Konaktion[®], the absorption of phylloquinone from spinach appeared to be substantially lower. The addition of fat to spinach, did however, enhance the amount of phylloquinone absorbed about 3-fold. This study shows that the amount of bioavailable phylloquinone as estimated from the dietary vitamin K-intake, is far less than assumed up until now. Therefore, studies are needed to investigate the bioavailability of vitamin K from various sources and the effect of other components of the diet (e.g. the amount of fat) on the absorption of vitamin K.

Besides in bone, Gla-proteins are found in the calcified lesions of the atherosclerotic plaque. An impaired vitamin K-status may therefore affect the development and progression of atherosclerotic calcifications. In the study described in chapter 6.1 we investigated the vitamin K-status in postmenopausal women with or without severe atherosclerotic calcifications. In the non-atherosclerotic women, the nutritional vitamin K-intake decreased considerably with an average of 10.08 $\mu\text{g}/\text{day}$ (95%CI: 9.49-10.67), whereas in the atherosclerotic women the vitamin K-intake remained at a constant low level. Women with calcified lesions (mean intake: 189,9 $\mu\text{g}/\text{day}$) appeared to have a lower age-adjusted nutritional vitamin K-intake of 43 $\mu\text{g}/\text{day}$, constituting a difference of 18%. In addition, compared to the non-atherosclerotic women, their atherosclerotic counterparts had a poor vitamin K-status as reflected in their significantly higher irOC_{free} and lower HBC levels. These findings are in line with the hypothesis that vitamin K or Gla-proteins are involved in the development of vessel wall calcifications.

Chapter 6.2 reports the associations between the presence of atherosclerotic calcifications, bone mass and markers for vitamin K-status in the population-based study described in chapter 6. Women with atherosclerotic calcifications had an 8% lower bone mass (mean difference of 3.15 mm², 95%CI: 0.18-6.72) and in addition, both markers for vitamin K status were associated with bone mass (irOC_{free}: $r=-0.47$, $p=0.013$; HBC: $r=0.57$, $p=0.002$). The negative association of irOC_{free} with bone mass is of special interest, since recent findings indicate that high irOC_{free} levels are associated with a high risk for developing osteoporotic hip fractures.¹⁰ Thus both the lower bone mass, and the higher irOC_{free} levels in the atherosclerotic women, indicate that they may be at a high risk for osteoporotic fractures. The findings of this study support the view that osteoporosis and atherosclerosis are two related processes and that vitamin K may act as one of the common denominators in both disease states.

In **chapter 7.2** we have confirmed that substantial amounts of non-dialysable, protein-bound Gla are present in the calcified human atherosclerotic plaque. With a specific colorimetric staining method described in **Chapter 7.1**, we have been able to identify three Gla-proteins in the calcified human atherosclerotic plaque with apparent molecular weights of 10, 18 and 27 kDa. Their further isolation and characterization, however, has proven to be extremely difficult. One of the contributing factors may be the abundant presence of contaminating sialoglycoproteins or proteoglycans. This study indicates that conventional biochemical techniques are insufficient to investigate the role of vitamin K or Gla-proteins in atherosclerotic calcifications.

The initial report that a suboptimal vitamin K-status is common in postmenopausal women has been confirmed by the studies described in this thesis (chapter 3,4,6), and by reports from other investigators.^{1,10,11} In addition, evidence has been obtained that a suboptimal vitamin K-status may affect bone metabolism as well as the process of vessel wall calcifications.

The measurement of the two irOC fractions differing in their ability to bind to hydroxyapatite, has shown to be a promising tool for assessing one's (bone) tissue vitamin K-status. The additional value of this distinction is illustrated by the finding of Szulc *et al.* that irOC_{free} may be used as a marker for developing hip fractures.¹⁰ The hydroxyapatite binding assay is a semi-quantative measure and can therefore only be used as an estimate of the degree of carboxylation of serum osteocalcin. Tests are needed which have been precisely characterized with respect to the immunoreactive forms of osteocalcin that are detected, and are able to directly detect undercarboxylated irOC levels.

The finding that vitamin K-status may affect bone metabolism and atherosclerotic calcifications raises the question of whether the recommended daily allowances (RDA) for vitamin K should be reconsidered. The future use of extra-hepatic Gla-proteins (osteocalcin, MGP) may become important tools in reestablishing the RDA-values. Furthermore, studies aimed to investigate the efficacy of vitamin K (phylloquinone and menaquinone) absorption from different food products are needed.

SAMENVATTING

Vitamine K is een essentiële cofactor in de aanmaak van het ongewone aminozuur γ -carboxyglutaminezuur (Gla) dat in een beperkt aantal eiwitten voorkomt. In deze zogenaamde 'vitamine K-afhankelijke' of Gla-eiwitten, zijn de Gla-residuen betrokken in de calcium-afhankelijke binding aan negatief geladen fosfolipid membranen (zoals bij de bloedstollingsfactoren FII, VII, IX en X) of aan hydroxyapatiet (zoals bij de Gla-bevattende boteiwitten osteocalcine en matrix Gla proteïne (MGP)). Bij een slechte vitamine K-status, zal de aanmaak van Gla verstoord zijn en zullen de Gla-eiwitten aangemaakt en uitgescheiden worden in een niet-functionele vorm. Deze zogenaamde ondergecarboxyleerde of descaboxy Gla-eiwitten, bevatten glutaminezuur (Glu) in plaats van Gla (**hoofdstuk 1**). Om de diagnose vitamine K-deficiëntie vast te stellen heeft men tot nu toe hoofdzakelijk gebruik gemaakt van testen die gevoelig zijn voor de functionele activiteit van de hepatische bloedstollings Gla-eiwitten. Als we de stollingseiwitten gebruiken als merkstof voor de vitamine K-status, valt op dat een vitamine K-deficiëntie in de algemene bevolking zeldzaam is. Er zijn echter aanwijzingen dat testen gebaseerd op bloedstollingsfactoren, niet gevoelig genoeg zijn om een gering tekort aan vitamine K aan te tonen.^{1,2}

De studies in dit proefschrift beschrijven het onderzoek naar de relatie tussen vitamine K en aspecten van het calcium- of botmetabolisme (hoofdstukken 2,3,4), alsook de relatie met de verkalkingsprocessen in de atherosclerotische plaque (hoofdstukken 6,7,9).

De vitamine K-status werd onderzocht met behulp van de 'hydroxyapatiet bindings assay' van het serum osteocalcine. Deze assay is gebaseerd op de 'vitamine K-afhankelijke' eigenschap van osteocalcine om aan hydroxyapatiet te binden met behulp van zijn Gla-residuen. Het immuunreactieve serum osteocalcine (irOC) met een hoge affiniteit voor hydroxyapatiet (irOC_{bound}) wordt verondersteld de gecarboxyleerde fractie te zijn, terwijl de osteocalcine fractie met een lage affiniteit voor hydroxyapatiet het ondergecarboxyleerde osteocalcine (irOC_{free}) vertegenwoordigt.³ De hydroxyapatiet bindings capaciteit (HBC) (= irOC_{bound} uitgedrukt als een percentage van het totale irOC gehalte), kan aangewend worden als een semi-kwantitatieve maat voor het Gla-gehalte van het serum osteocalcine (Figuur 3, hoofdstuk 1). Lage HBC gehalten (<70%) komen frequent voor bij diegenen met een verminderde vitamine K-status zoals diegenen die vitamine K-antagonisten gebruiken (orale antistollingsmiddelen zoals sintrom mitis* (hoofdstuk 3)).

De hydroxyapatiet bindings assay werd gevalideerd in een bekende risicogroep voor vitamine K-deficiëntie: de pasgeborenen (**hoofdstuk 2**). Zwangere vrouwen werden gedurende de laatste 6 weken van hun zwangerschap behandeld met vitamine K (1 mg/dag) of een placebo. Het feit dat alle baby's uit de met een placebo behandelde groep zeer hoge concentraties $\text{irOC}_{\text{free}}$ hadden, met HBC gehalten vergelijkbaar met die van volwassenen onder orale antistolling, suggereert heel sterk dat ze een slechte vitamine K status hebben. Dit werd ondersteund door de observatie dat de 'vitamine K behandelde' baby's significant lagere $\text{irOC}_{\text{free}}$ en hogere HBC gehalten hadden. Aangezien descarboxy-protrombine in geen van de geteste navelstreng bloedmonsters werd aangetroffen, geven deze resultaten aan dat het HBC gehalte van het serum osteocalcine een gevoeligere marker is voor het meten van de vitamine K status dan testen, gebaseerd op de bloedstollingsfactor protrombine.

In het eerste deel van het onderzoek zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, hebben wij onderzocht in welke mate de vitamine K-status de calcium uitscheiding in de urine beïnvloedt. Het betreft een placebo-gecontroleerde studie onder postmenopauzale vrouwen. Behandeling met vitamine K leidde tot een significante daling van de nuchtere calcium uitscheiding in de urine bij vrouwen met een hoge calcium uitscheiding (bij de zogenaamde fast losers: calcium/creatinine ratio > 0.5). Of vitamine K-antagonisten juist een tegenovergesteld effect zouden hebben werd onderzocht in een case control onderzoek bij patiënten onder langdurige, stabiele antistollingstherapie. Alleen bij de jonge mannen (25-45 jr) werd een significant hoger aantal fast losers (7/27) aangetroffen dan in een leeftijds-gematchte controle groep (0/25). De positieve associatie van de nuchtere calcium uitscheiding in de urine met de hydroxyproline uitscheiding ($r=0.52$, $p<0.004$), geeft aan dat de hoge calcium uitscheiding in de geantistolde groep jonge mannen gerelateerd is aan een hoge botresorptie.

Hoofdstuk 4 beschrijft de effecten van vitamine K-behandeling (1 mg/dag gedurende 2 weken) op het serum osteocalcine (irOC) gehalte bij vrouwen van 20-85 jr. Hieruit bleek dat vitamine K behandeling hoofdzakelijk een effect had op het irOC gehalte bij de vrouwen ouder dan 50 jr. Er werd daarom een tweede, langdurige studie verricht bij oudere vrouwen (50-85 jr). Vitamine K behandeling gedurende 3 maanden leidde tot een verhoging van het serum gehalte van twee merkstoffen voor botvorming (totale irOC gehalte en het bot-alkalische fosfatase en een afname met 30% van de calcium uitscheiding in de urine bij de 'fast losers'. Deze bevindingen worden ondersteund door verschillende *in vitro* studies

die aantonen dat vitamine K de osteocalcine en alkalische fosfatase uitscheiding door osteoblast cellen stimuleert⁴ en de botresorptie doet afnemen.^{5,6,7}

Een verrassende observatie van deze studie was de bevinding dat vitamine K-behandeling hoofdzakelijk het $\text{irOC}_{\text{bound}}$ gehalte deed toenemen, terwijl het gemiddelde $\text{irOC}_{\text{free}}$ gehalte hetzelfde bleef. Dit is in tegenstelling tot de resultaten bij de pasgeborenen (hoofdstuk 2), bij wie de $\text{irOC}_{\text{free}}$ spiegels juist daalden na vitamine K therapie. Deze gegevens wijzen erop dat $\text{irOC}_{\text{free}}$ (met name bij postmenopauzale vrouwen), in tegenstelling tot wat tot nu toe werd aangenomen, mogelijk niet alleen het ondergecarboxyleerde osteocalcine voorstelt.^{2,3} De resultaten van de studies beschreven in hoofdstuk 4 wijzen erop dat $\text{irOC}_{\text{free}}$ ook voor een deel bestaat uit osteocalcine fragmenten, mogelijk afkomstig uit het botresorptie proces. Deze visie wordt ondersteund door de recente studie van Minisola *et al.*⁸. De aanwezigheid van circulerende osteocalcine fragmenten is recent bevestigd door Garnero *et al.* die, met behulp van verschillende monospecifieke antilichamen, aantoonde dat 65% van het totale immuunreactieve circulerend antigeen toegeschreven dient te worden aan osteocalcine fragmenten.⁹

In de vitamine K-suppletie studies die wij tot nu toe verricht hebben, is er een dosering gebruikt van 1 mg fylloquinon (= vitamine K₁) afkomstig van een farmaceutisch preparaat (Konakion®). Vanwege zijn hoog oplosbare vorm, is de te verwachten biologische beschikbaarheid groot. Wij hebben daarom de biologische beschikbaarheid van 1 mg fylloquinon in de vorm van spinazie (met of zonder boter) vergeleken met die van Konakion® (hoofdstuk 5). De absorptie van fylloquinon uit spinazie bleek substantieel lager te zijn dan die uit Konakion®. Toevoeging van vet aan spinazie, verbeterde echter de absorptie van fylloquinon uit spinazie met een factor 3. Deze studie geeft aan dat de hoeveelheid biologisch beschikbare fylloquinon, zoals die geschat wordt uit de dietaire vitamine K inname, aanzienlijk minder is dan tot nu toe werd aangenomen. Er zijn daarom studies nodig die de biologische beschikbaarheid van vitamine K uit verschillende voedingsbronnen en de effecten van andere componenten uit het dieet (zoals de hoeveelheid vet) op de absorptie van vitamine K bestuderen.

Behalve in bot, worden Gla-eiwitten ook gevonden in de verkalkte atherosclerotische plaque. Een preciaire vitamine K-status zou daarom de vorming en progressie van de atherosclerotische verkalkingen kunnen beïnvloeden. In hoofdstuk 6.1 wordt een studie beschreven die de vitamine K-status onderzoekt in postmenopauzale vrouwen met of zonder ernstige atherosclerotische verkalkingen van de vaatwand. In de niet-atherosclerotische vrouwen blijkt de vitamine K-inname via de voeding aanzienlijk af te nemen met het toenemen van de leeftijd: gemiddeld

10.08 $\mu\text{g}/\text{dag}$ per jaar (95% betrouwbaarheidsinterval (BI): 9.49-10.67), terwijl de vitamine K inname in de atherosclerotische vrouwen op een constant laag niveau blijft. Vrouwen met atherosclerotische verkalkingen (gemiddelde vitamine K-inname: 189,9 $\mu\text{g}/\text{day}$) bleken een 18% (43 $\mu\text{g}/\text{dag}$) lagere vitamine K-inname (leeftijds-gecorrigeerd) te hebben. Bovendien bleken de vrouwen met atherosclerotische verkalkingen een slechtere weefsel vitamine K-status te hebben, zich uitend in statistisch significant hogere $\text{irOC}_{\text{free}}$ en lagere HBC gehalten. Deze bevindingen ondersteunen de hypothese dat vitamine K of Gla-eiwitten betrokken zijn in de ontwikkeling van vaatwand verkalkingen.

Hoofdstuk 6.2 beschrijft de associatie tussen de aanwezigheid van atherosclerotische verkalkingen, botmassa en markers voor de vitamine K status in de populatiestudie beschreven in hoofdstuk 6.1. Vrouwen met atherosclerotische verkalkingen bleken een 8% lagere botmassa (gemiddeld verschil van 3.15 mm^2 , 95% BI: 0.18-6.72) te hebben. Bovendien waren beide markers voor vitamine K status gecorreleerd aan de botmassa ($\text{irOC}_{\text{free}}$: $r=-0.47$, $p=0.013$; HBC: $r=0.57$, $p=0.002$). De negatieve associatie van $\text{irOC}_{\text{free}}$ met de botmassa is met name interessant, omdat recente gegevens erop wijzen dat hoge $\text{irOC}_{\text{free}}$ gehalten geassocieerd zijn met een hoger risico voor het ontwikkelen van osteoporotische heup fracturen.¹⁰ Zowel de lagere botmassa als de hogere $\text{irOC}_{\text{free}}$ gehalten in de atherosclerotische vrouwen geven aan dat atherosclerotische vrouwen een hoger risico hebben voor osteoporotische fracturen. Deze bevindingen ondersteunen de hypothese dat osteoporose en atherosclerose twee aan elkaar gerelateerde processen zijn, waarbij een tekort aan vitamine K een belangrijke rol speelt.

In **hoofdstuk 7.2** bevestigen wij dat aanzienlijke hoeveelheden niet-dialyseerbare eiwitgebonden Gla aanwezig is in de verkalkte humane atherosclerotische plaque. Met een specifieke colorimetrische kleuring, beschreven in **Hoofdstuk 7.1**, hebben wij de aanwezigheid van drie Gla-eiwitten in de verkalkte humane atherosclerotische plaque aangetoond, met een moleculair gewicht van 10, 18 en 27 kDa. Hun isolatie en karakterisatie bleek echter extreem moeilijk te zijn. Eén van de bijdragende factoren is waarschijnlijk de overvloedige aanwezigheid van contaminerende sialo-glycoproteïnes of proteoglycanen. Deze studie geeft aan dat conventionele biochemische technieken niet voldoende zijn om de rol van vitamine K of Gla-eiwitten in atherosclerotische verkalkingen te onderzoeken.

De waarneming dat een suboptimale vitamine K status veelvuldig voorkomt bij postmenopauzale vrouwen werd bevestigd door de studies beschreven in dit proefschrift (hoofdstuk 3,4,6) en die van andere onderzoekers.^{1,10,11} Bovendien hebben wij aanwijzingen gevonden dat een marginale vitamine K-status zowel het botmetabolisme als het proces van vaatwandverkalkingen kan beïnvloeden.

De bepaling van de twee iOC fracties, met een verschillende affiniteit voor hydroxyapatiet, blijkt een veelbelovende manier te zijn om iemands (bot) weefsel vitamine K-status te bepalen. De additionele waarde van deze bepaling wordt geïllustreerd door de bevinding van Szulc *et al.* dat iOC_{free} gebruikt kan worden als risicoindicator voor een heupfractuur.¹⁰ De hydroxyapatiet bindings assay is een semi-kwantitatieve meting en kan daarom alleen gebruikt worden als een schatting van de carboxyleringsgraad van het serum osteocalcine. Er zijn daarom bepalingmethoden nodig, die precies gekarakteriseerd zijn met betrekking tot de immuunreactieve vormen van het osteocalcine dat ze detecteren, en die tevens in staat zijn om direct het ondergecarboxyleerde osteocalcine aan te tonen.

De inzichten dat de vitamine K-status het botmetabolisme en het proces van atherosclerotische verkalkingen beïnvloedt roept de vraag op of de huidige aanbevolen dagelijkse hoeveelheid vitamine K niet heroverwogen dient te worden. Het is de verwachting dat in de toekomst het gebruik van extra-hepatische Gla-eiwitten (zoals osteocalcine, MGP en PGP) belangrijke hulpmiddelen zullen zijn om de dagelijks aanbevolen hoeveelheid vitamine K te bepalen. Studies die de efficiëntie van vitamine K absorptie (zowel fyloquinon als menaquinon!) uit verschillende voedingsbronnen bestuderen zijn bovendien aangewezen.

REFERENCES

1. Ferland G, Sadowski JA, O'Brien ME. Dietary induced subclinical vitamin K deficiency in normal human subjects. *J Clin Invest* 1993;9:1761-8.
2. Knapen MHJ, Hamulyák K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla-protein) and urinary calcium excretion. *Ann Int Med* 1989;111:1001-5.
3. Price PA, Williamson MK, Lothringer JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem* 1981;256:12760-6.
4. Akedo Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Mizuno Y, Kaneki M, Nakamura T, Ouchi Y, Orimo H. Vitamin K₂ modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:814-20.
5. Hara K, Akiyama Y, Tajima T, Shiraki M. Menatetrenone inhibits bone resorption partly through inhibition of PGE₂ synthesis in vitro. *J Bone Miner Res* 1993;8:535-42.
6. Akiyama Y, Hara K, Ohkawa I, Tajima T. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats. *Japan J Pharmacol* 1993;62:145-153.