

Vitamin K, osteoporose og warfarin

VITAMIN K, OSTEOPOROSE OG WARFARIN

Obligatorisk oppgave

Erlend Gyllensten Singaas

medisinstudent, kull H01

Innledning

Osteoporose er et stort folkehelseproblem, som rammer en betydelig del av den aldrende befolkningen, med store omkostninger både for enkeltindividet og samfunnet. Den bakenforliggende patogenesen synes multifaktoriell, og mange forskjellige forhold er involvert. De siste 30 årene har det vært en økende erkjennelse av at vitamin K-avhengige proteiner ikke bare spiller en rolle for koagulasjonen, men også er involvert i andre prosesser, deriblant benvevets fysiologi. Samtidig benytter mange eldre warfarin, en vitamin K-antagonist som forstyrrer de vitamin K-avhengige proteinenes funksjon, hvilket nettopp er basis for at medikamentet benyttes i klinikken som en koagulasjons-hemmer.

Målet med denne oppgaven har vært å se nærmere på tilgjengelig litteratur innen feltet "vitamin K, osteoporose og warfarin". Søk etter aktuelle artikler ble gjort i Medline fram til 1.august 2005, men oppgaven omfatter også noen arbeider av nyere dato enn dette. Benyttede søkeord har vært "warfarin", "vitamin K-antagonists", "oral anticoagulation", "vitamin K", "vitamin K-dependent proteins", "osteocalcin", "bone mineral density", "osteoporosis" og "fracture rate".

Innholdsfortegnelse

Vitamin K – biokjemi og fysiologi	s 4
Vitamin K-avhengig karboksylase	s 7
Vitamin K-avhengige proteiner	s 9
Epidemiologi – vitamin K, osteokalsin, osteoporose	s 14
Vitamin K – serumnivå, markører og behelse	s 20
Underkarboksylert osteokalsin og behelse	s 21
Vitamin K-status og behelse i spesielle grupper	s 23
Vitamin K-inntak og markører på vitamin K-status, bentetthet	s 26
Vitamin K-supplement og behelse	s 31
Intervensjonsstudier – effekt av vitamin K på BMD og frakturnrate	s 36
Alternative effekter av vitamin K i basale forsøk	s 42
Warfarin og vitamin K-avhengige proteiner	s 43
Warfarin, vitamin K og osteoporose	s 45
Warfarinbehandling og forandring i biokjemiske parametre	s 45
Warfarinbehandling og effekt på BMD, frakturrisiko	s 49
Diskusjon	s 66
Referanser	s 68

Vitamin K – biokjemi og fysiologi

Vitamin K er en stor gruppe kjemiske forbindelser som karakteriseres av en felles menadion (2-metyl-1,4-naftokinon) -ring, med en metylgruppe i 2.posisjon og en alifatisk sidekjede i 3.posisjon. Variasjonene mellom de ulike vitamin K-forbindelsene ligger i forskjeller i lengde og saturasjon av den alifatiske sidekjeden. Fyllokinon (vitamin K₁) har her en 20-karbonfitylgruppe (4 prenyl-enheter, hver med 5 karbonatomer, hvorav den første enheten er umettet), og dannes særlig i bladgrønne planter (1). Fyllokinon er en vannløselig og flytende olje ved romtemperatur, følsom for lys, alkaliske og reduserende betingelser, men relativt luft- og varmestabil (2).

Menakinonene (MK, vitamin K₂) dannes av grampositive bakterier, og har i 3.posisjon en polyisoprenyl-sidekjede med 4-13 polyisoprenylgrupper, alle umettede. De betegnes MK-n, hvor n indikerer antall isoprenylgrupper i sidekjeden. Menadion (vitamin K₀, MK-0), er syntetisk og ikke biologisk aktivt, men kan alkyleres til menakinon (særlig MK-4) i animalsk vev (3) og slik få virkning i organismen.

Vitamin K i kosten

Den viktigste kilde til vitamin K er fyllokinon fra kosten. Fyllokinon finnes i mange matvarer, men oftest i svært lave konsentrasjoner. Betydelige mengder sees kun i grønne bladgrønnsaker som spinat og kål, dessuten brokkoli (100-700µg/100g). Mindre mengder finnes i planteoljer, fett og margarin (50-200µg/100g), melkeprodukter (0,5-15µg/100g), kjøtt (0,5-5 µg/100g), cerealer og brødprodukter (0,1-10 µg/100g), fisk (0,1-1 µg/100g), frukt (0,1-3µg/100g), egg og andre grønnsaker (2,4,8).

Kilder til menakinoner er fermenterte matvarer som ost (40-90µg/100g), natto (gjærede soyabønner – fyllokinon 20-40 µg/100g, menakinon 900-1200µg/100g), andre melkeprodukter (0,2-50µg/100g), samt lever. Kjøtt kan inneholde signifikante mengder MK-4, som sannsynligvis stammer fra menadion en finner i tilskudd som gis til storfe (i kjøtt: alle menakinoner 1-30 µg/100g) (2,4,5,8).

Mikrofloral syntese av menakinoner

Menakinoner dannes av bakteriefloraen i jejunum, ileum og colon. Anaerobe bakterier står sentralt, og kvantitativt viktige former av vitamin K₂ er bl.a. MK-10 og MK-11, dannet av Bacteroides, MK-8 av Enterobacteria, MK-7 av Veillonella species, MK-6 fra Eubacterium. Propionibacterium, Bacteroides fragilis, Arachnia og E.coli spiller også en rolle. Den totale mengden MK i tarminnholdet i distale colon utgjør ca. 20µg/g tørrvekt, hvor MK-10 dominerer (1,6,7).

Resultater fra tidlige dyrestudier, hvor man påviste store mengder MK i avføring og intestinalt innhold, førte til en generell oppfatning om at mikrobiell produksjon av menakinon i tarmen utgjør en viktig vitamin K-kilde. Oppfatningen styrkes av at primær, kostbetinget vitamin K-mangel sees sjeldent, samt den veletablerte assosiasjonen mellom human vitamin K-mangel og antibiotikabehandling (8). Likevel er menakinon fra tarmen sannsynligvis en mindre betydningsfull kilde enn tidligere antatt. Absorpsjonen av MK har vært undersøkt i dyreforsøk, og i rottemodeller skjedde det verken gallesaltmediert eller portal absorpsjon av MK-9 fra colon (9). I et annet forsøk kunne man indusere

vitamin K-mangel hos rotter ved å hindre at dyrene spiste sine egne ekskrementer (koprofagi) (10). Dette indikerer at rotter kun kan nyttiggjøre seg intestinally produsert MK vha. en ny passasje gjennom gastrointestinal-traktus, og da sannsynlig absorpsjon fra proksimale deler av tynntarmen. Koprofagi som metode til å gjøre intestinally MK tilgjengelig er ikke aktuelt hos mennesker. I et tredje dyreforsøk målte man innholdet av MK i ekskrementene til rotter som ble gitt ulike dietter (11). Gruppen av dyr som fikk en vitamin K-fattig diett utviklet mangelsymptomer (hypoprotrombinemi) etter 3 dager, til tross for at mengden MK i colon hos disse faktisk hadde økt sammenlignet med hos dyrene i kontrollgruppen, som fikk en vanlig diett. MK fra tarmen kan altså ikke alene opprettholde syntesen av protrombin, dvs. kosten må være den viktigste kilden til vitamin K.

Man har heller ikke hos mennesket evidens for at det i særlig grad absorberes MK fra colon. Riktignok kan man ikke utelukke at mindre mengder tas opp fra denne regionen via passiv diffusjon (11,12), men ikke i en slik grad at utvikling av hypoprotrombinemi kan hindres hvis vitamin K mangler i kosten. Dette skyldes at menakinonene i tarmen er tett bundet til bakterienes cytoplasmatiske membran, samtidig som de er sterkt lipofile molekyler, hvilket gjør det vanskelig å se for seg hvordan store mengder MK skal kunne bli tilgjengelig for absorpsjon (1). Samtidig er det i de aktuelle tarmavsnittene lite gallesalter tilgjengelig. Terminale ileum er pga. sin mengde av både gallesalter og MK et potensielt sted for absorpsjon, men om dette har praktisk betydning er ikke verifisert (1,6).

Likevel har man et forhold som indirekte peker mot at MK kan ha fysiologisk betydning hos mennesket: 90% av vitamin K-lageret i leveren utgjøres av MK (8,11,13), hovedsakelig MK 7-13, i tilsvarende relative mengder og inter-individuelle variasjoner som de man ser i tarmen. En forklaring på dette kan imidlertid være at leveren i stor grad retinerer disse sterkt lipofile forbindelsene, slik at mengden MK over lengre tid blir høy. MK man finner i leveren kan da teoretisk sett stamme fra to ulike kilder: en ineffektiv diffusjonsprosess fra colon hvor man har høy konsentrasjon av MK produsert i tarmen, eller evt. fra en effektiv absorpsjonsprosess i tynntarmen vha. gallesalter, hvor de små mengdene av MK som kan finnes i kosten absorberes (8).

Biologisk signifikans av fyllokinon vs. menakinon

Både fyllokinon og menakinon fungerer som kofaktor for leverens karboksylase in vitro (14). I tidlige studier, hvor man ga rotter med vitamin K-mangel ulike varianter av vitamin K intracardialt, så man at de langkjedede menakinonene (MK 7, 9, 10) reverserte hypoprotrombinemi mest effektivt, og var opptil 25 ganger så aktivt som fyllokinon (15). Derimot fant Suttie et al.(16) at tegn på mild vitamin K-mangel relativt raskt kunne induseres hos mennesker ved å begrense inntaket av matvarer rike på fyllokinon, noe som indikerer at leverens menakinonlagre har begrenset fysiologisk verdi. Ved redusert tilgang på vitamin K i kosten, forbrukes leverens lagre av fyllokinon raskt, mens menakinon-lagrene er mer varige (17). Likevel ser man at alvorlig vitamin K-mangel med blødning er svært sjeldent, selv ved grav underernæring (18), hvilket sannsynliggjør at evnen til å utnytte menakinoner, bl.a. fra leveren, forhindrer utvikling av alvorlige mangelsymptomer. Ulike menakinoner finnes i betydelige mengder i cellenes

membranøse organeller, kanskje finnes det mekanismer hvorved disse gjøres tilgjengelige for karboksylasen ved mangeltilstander (8)?

En mulig forklaring på den store forskjellen i biologisk aktivitet mellom fyllokinon og menakinon som man så i tidlige studier, kan dog også til dels skyldes måletekniske forhold; fyllokinon omsettes mye raskere enn menakinon, og taper derfor raskere sin aktivitet (8).

Absorpsjon av vitamin K i tarmen

Absorpsjonen av fyllokinon (og sannsynligvis menakinon) synes å skje på tilsvarende vis som for andre fettløselige vitaminer og næringsstoffer (12,19). I løpet av den intraluminale fasen av absorpsjonen inngår vitamin K i miceller sammen gallederter og produkter fra lipolysen (forårsaket av enzymer fra pancreas). Videre transport skjer sannsynligvis bare via kylomikroner fra enterocytter. 40-70% av vitamin K absorberes fra tarmen, hovedsakelig fra jejunum og ileum, svært lite fra colon (2,8,19).

Graden av opptak av vitamin K viser stor variasjon, og avhenger av vitaminets struktur og om det er løst i en fettfase. Dette ser man ved at fyllokinon fra brokkoli absorberes bedre hvis det er løst i en olje enn rett fra brokkoli (20).

Ved ekstrahepatisk cholestase (obstruktiv ikterus) eller uttalt pankreasinsuffisiens blir absorpsjonen av vitamin K nedsatt (19). Cholestase gir mangel av komponentene i micellene med detergent-egenskaper (gallederter). Kronisk pankreatitt gir nedsatt dannelse av forbindelser som inngår i micellene, f.eks. 2-monoglyserider og fettsyrer. Dette medfører også nedsatt absorpsjon av fyllokinon, men ikke like uttalt som ved galledert-mangel (19). Galledertene er essensielle for absorpsjonen av vitamin K, hvilket reflekteres i at vitamin K-mangel er vanligere ved cholestatisk sykdom enn andre kroniske gastrointestinale lidelser, pankreatitt inkludert (18).

Transport i plasma

Plasmtransport av vitamin K synes å være mediert av lipoproteiner (1). Viktigst er lipoproteiner rike på triglyserider, i mindre grad "low-density"-lipoproteiner (LDL). Dette forklarer den sterke positive korrelasjonen mellom triglyserider og fyllokinon i plasma (21,22). Det meste av vitamin K følger kylomikronrestpartikler til leveren (23). Nivået av fastende vitamin K i plasma påvirkes sterkt av hvilken variant av apoE individet besitter (22), en vanlig genetisk polymorfisme. Personer med apoE2-varianten har høyest nivå av vitamin K i plasma, de med apoE4 har lavest, mens personer med apoE3 inntar en mellomstilling. Dette samsvarer med forbindelsen mellom apoE-fenotypen og leverens kapasitet for clearance av kylomikronrestpartikler fra sirkulasjonen, der apoE2 gir lav kapasitet, apoE3 igjen i midten, mens personer med apoE4 har størst kapasitet.

Vevsdistribusjon, lagring og omsetning av vitamin K i kroppen

Leveren ansees å være det viktigste lagringsstedet for vitamin K (1), og står også for produksjonen av de vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorene. Menakinon utgjør 90% av leverlagrene (hovedsakelig MK-7-10), fyllokinon 10% (24), hvilket antyder at leveren

omsetter fyllokinon raskere enn de langkjedede menakinonene. I tarmen dominerer MK (85% av vitamin K), MK9-11 utgjør mesteparten (7). I benvev er det påvist fyllokinon og MK6-8 (25), i plasma dominerer fyllokinon og MK-7 (24).

MK-4 er et atypisk menakinon i det at det i liten grad dannes ved bakteriell syntese, men derimot i visse vev kan dannes fra menadion (MK-0), som er syntetisk (1). I rottemodeller har man sett at bl.a. hjernen, spyttkjertler og pancreas har selektiv kapasitet til å samle MK-4 i konsentrasjoner flere ganger høyere enn for fyllokinon (26), betydningen av dette er ikke kjent. Fyllokinon fra kosten er en mulig forløper for MK-4.

Kroppens lagre av vitamin K beregnes til 1-10 µg/kg, hvilket tilsvarer omtrent det gjennomsnittlige, daglige inntaket av vitamin K i et vestlig kosthold (24,27). Dette utgjør et svært lite lager sammenlignet med de andre fettløselige vitaminene (2).

Vitamin K med metabolitter skilles ut fra kroppen på tre forskjellige måter: ukonjugert i galle, konjugert til vannløselige forbindelser som skilles ut i tarmen, eller i urinen (2). Fyllokinon har svært høy omsetningshastighet i kroppen, med halveringstid på omtrent 1-1,5 døgn (27). Langkjede menakinoner omsettes langsommere, sannsynligvis pga at de er svært lipofile og har større affinitet for membraner.

Anbefalt daglig inntak av vitamin K

I Norden anbefaler man inntak av vitamin K tilsvarende 1 µg/kg/d (28). Nyere amerikanske retningslinjer foreslår et inntak på 90-120 µg/d (29). Basert på NORKOST II (1997) (30), som registrerte kostholdet hos 2672 voksne menn og kvinner mellom 16 og 72 år, og fyllokinon-innholdet i ulike matvarer, har Drevon et al. (2) funnet at daglig inntak av vitamin K i Norge utgjør 40-45% av amerikanernes anbefalinger. Det hefter visse usikkerheter ved dette resultatet, bl.a. kan inntaket av menakinon være underestimert, men man får likevel inntrykk av at vitamin K-inntaket i Norge er betydelig lavere enn optimalt. Særlig aktuelt er dette siden man nå vet at et vitamin K-inntak som gir optimal karboksylasjon av koagulasjonsfaktorene, ikke nødvendigvis er tilstrekkelig for å sikre tilsvarende for de vitamin K-avhengige benproteinene.

Vitamin K-avhengig karboksylase

Vitamin K fungerer som kofaktor for en enzymatisk reaksjon der glutamyl-enheter (glu) i visse vitamin K-avhengige proteiner γ -karboksyleres til γ -karboksy glutamyl (gla). Proteinene modifiseres av den vitamin K-avhengige γ -karboksylasen i cellens endoplasmatiske retikulum. Dette er inntil videre den eneste vitamin K-funksjonen man kjenner godt til i høyere organismer (31).

Glutamyl-enhetene som karboksyleres, befinner seg innen et område av de vitamin K-avhengige proteinene som kalles Gla-domenet. Denne endringen er nødvendig for at de vitamin K-avhengige proteinene skal kunne utøve sin biologiske aktivitet (31). Karboksyleringen endrer konformasjonen innen gla-domenet og muliggjør binding av kalsium (8). Slik kan hydrofobe enheter innen domenet via kalsium-broer bindes til negativt ladede fosfolipid-lag. Dette er avgjørende for de vitamin K-avhengige koagulasjons-proteinenes funksjon, f. eks. for at faktor VII skal kunne bindes til

membranfosfolipider tilknyttet tissue faktor (TF) i det ”eksterne” koagulasjonssystem, eller for at faktor II (protrombin) skal kunne interagere med fosfolipider i blodplatemembranen (32).

Vitamin K-epoksid syklus

Vitamin K som inntas via kosten har kinon-struktur. Den vitamin K-avhengige γ -karboksylasen (E_1) kan derimot ikke nyttiggjøre seg av denne formen, det er den reduserte kinol-versjonen av vitaminet som har biologisk aktivitet (8). Samtidig som karboksylasen medierer γ -karboksyleringen av glutamyl konverteres vitamin K-kinol til vitamin K-2,3-epoksid, slik at enzymet også har epoksidase-aktivitet. Epoksidet som dannes resirkuleres vha. to enzymer, først en reduksjon til vitamin K-kinon katalysert av vitamin K-epoksid reduktase (E_2). Vitamin K-kinon gjennomgår så en ny reduksjon, tilbake til vitamin K-kinol, mediert av en vitamin K-reduktase (E_3). Både epoksidase- og de to reduktase-aktivitetene er dithiol-avhengige. E_2 og E_3 antas å være mediert av samme enzym. Disse reaksjonene inngår i en metabolsk syklus som foregår i leveren, og kalles vitamin K-epoksid syklus (2,8,31,33). Eksogent vitamin K (-kinon), dvs. fra kosten eller gitt medikamentelt, entrer syklusen via en reaksjon katalysert av et NAD(P)H-avhengig enzym med vitamin K reduktase-aktivitet (E_4) (34).

Vitamin K-epoksid syklus og warfarin

Vitamin K-epoksidase (E_2) og -reduktase (E_3) hemmes av warfarin og andre forbindelser i coumarin-gruppen (8,33,35). Ved tilførsel av farmakologiske doser av warfarin vil vitamin K-kinol forbrukes, samtidig som man ser en dose-avhengig opphopning av vitamin K-epoksid. Manglende tilgang til vitamin K-kinol gir intracellulær akkumulering av forløpere til de vitamin K-avhengige proteinene, samt sekresjon av underkarboksylerte vitamin K-avhengige proteiner (8). Graden av dette avhenger av dose og varighet av tilførselen av warfarin.

Den NAD(P)H-avhengige vitamin K-reduktasen påvirkes i liten grad av warfarin, og på denne måten kan vitamin K som tilføres under antikoagulasjons-behandling med warfarin likevel gjøres tilgjengelig for karboksylasjons-reaksjonen (34,36,37). Av denne grunn bør pasienter som behandles med warfarin være forsiktige med inntaket av vitamin K fra kosten, da INR-verdien, som søkes holdt innenfor et bestemt vindu, forstyrres (38). Samtidig er det nettopp denne mekanismen man utnytter når man tilfører vitamin K (f.eks. Konakion®) til pasienter med faretruende høye INR-verdier, f. eks. pga. overdosering av warfarin.

Vitamin K-avhengige proteiner

Vitamin K ble påvist tidlig på 1930-tallet av en dansk forsker, Henrik Dam, som beskrev en fettløselig faktor nødvendig for normal hemostase (39). I de påfølgende tiårene trodde man at koagulasjonen var den eneste fysiologiske prosessen vitamin K var involvert i, og de vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorene, faktor II, VII, IX, X, samt protein C og S, er vel beskrevet. Protein Z er også et Gla-protein med en rolle i koagulasjonen, som inhibitor av FXa (40). Det er vist for disse proteinene at deres biologiske aktivitet er avhengig av Gla-enheters binding til kalsiumioner, som muliggjør interaksjon mellom proteinene, Ca^{2+} og fosfolipider (41). Omdannelsen av Glu-enheter til Gla i proteinene skjer vha. en vitamin K-avhengig karboksylase.

På slutten av 1970-tallet ble man derimot oppmerksom på at vitamin K kunne være av betydning for funksjoner utover koagulasjonen. Det ble beskrevet en tilstand hos barn hvis mødre ble behandlet med vitamin K-antagonister i første trimester av svangerskapet; føtalt warfarin syndrom (chondrodysplasia punctata) (42,43). Lidelsen kjennetegnes ved uttalt forkalkning av brusk med påfølgende abnorm utvikling av ben, bl.a. nasal hypoplasi og irregulær vekst av ansiktsskjelettet og lange knokler. I dyreforsøk har man funnet at warfarinbehandling har konsekvenser særlig i raskt voksende benvev (unge dyr), med forstyrret kalsiumregulering og uttalt, abnormal utfelling av kalsiumsalter i områder som normalt ikke skal forkalkes, f. eks. vekstplatene (44). Denne avleiringen av kalsiumsalter gir deformerte ben og redusert vekst. Slike oppdagelser utløste leting etter Gla-proteiner i benvev, og først ute var oppdagelsen av det vitamin K-avhengige proteinet osteokalsin (bone Gla-protein) i 1975 (45,46). Dette vakte umiddelbart oppsikt i forskerkretser som befattet seg med vitamin K, men utover disse miljøene tok det nærmere 20 år før de andre funksjonene til vitamin K, unntatt koagulasjonen, vakte interesse. Senere er det beskrevet tilfeller hvor chondrodysplasia punctata har forekommet uten at barnas mødre har brukt warfarin. Hos noen barn har man kunnet påvise kongenitt mangel av vitamin K epoksid reduktase (47), hos andre har det dreid seg om manglende vitamin K-inntak hos mor i svangerskapet (105).

Siden oppdagelsen av osteokalsin har flere vitamin K-avhengige proteiner kommet til, med funksjoner innen vidt forskjellige felt. Matrix Gla-protein (MGP) ble kjent tidlig på 1980-tallet, og er den mest potente inhibitor av forkalkning av bløtvev man kjenner til (48), og finnes, som osteokalsin og protein S, i benvev. Gas-6 (growth-arrest-sequence protein 6) er også et vitamin K-avhengig protein, som inngår i reguleringen av celleproliferasjon og apoptose (49). Gas-6 er også påvist i nervesystemet, og uttrykkes i store deler av hjernen (50, 51). Karboksylering av proteinet er nødvendig for at det skal kunne utøve sin effekt. Gas-6 produseres bl.a. i både spinale motornevroner og store nevroner i dorsalrotsgangliene, og ser ut til å ha betydning for vekst av både glatte muskelceller og Schwannske celler i CNS. Man tror Gas-6 kan være involvert i patofysiologien ved mb. Alzheimer (52), og synes også å være involvert i atherosklerose, ved å forhindre at karveggen degenereres (53).

Med utviklingen av genteknologien har man funnet to nye grupper av Gla-proteiner, med foreløpig ukjente funksjoner; proline-rich Gla-proteins (PRGPs) og trans-membrane Gla-proteins (TMGPs) (54,55).

Nephrocalcin er et Gla-protein i nyrene, som kan redusere utfellingen av kalsiumoksalatkrystaller i urinen (49,56,57,58). Man har observert økt underkarboksylering av Gla-proteiner i urinen hos pasienter rammet av residiverende nephrolithiasis med kalsiumoksalatstein (56). Nephrocalcin er kanskje involvert i reduksjon av kalsium-ekskresjonen i urinen hos postmenopausale kvinner med økt kalsiumtap, såkalte "fast losers" (59). Dette indikerer en funksjon for vitamin K-avhengige proteiner i kalsium-homeostasen.

Osteokalsin

Osteokalsin er et vitamin K-avhengig protein. Det består av 49-50 aminosyrer, avhengig av hvilken dyreart man undersøker (60). Blant aminosyrene finner man tre Gla-enheter (γ -karboksyglutamat) i hhv. 17-, 21- og 24-posisjon i kjeden (61), som dannes post-translasjonelt fra glutamat (Glu) vha. den vitamin K-avhengige karboksylasen. Tilsvarende mekanisme sees for de andre vitamin K-avhengige proteinene.

Humant osteokalsin er påvist i benvev og dentin (61). Proteinet produseres av differensierte osteoblaster ved dannelsen av benmatrix (62), og er spesifikk markør for disse cellene (63). Karboksylering gir en konformasjonsendring av proteinet som muliggjør binding til kalsiumioner. Fullt karboksylert med 3 Gla-enheter har osteokalsin stor affinitet for kalsiumioner i hydroksoapatitt-molekylet, og bindes derfor til dette og inngår i benmatriks (64). Denne affiniteten medfører at osteokalsin kan regulere hvor raskt hydroksoapatittkrystaller vokser i løsninger (65,66,67,68), hvilket antyder at proteinet er involvert i reguleringen av mineralisering og vekst av mineralkrystaller. Konsentrasjonen av proteinet i ben er direkte proporsjonal med mengden kalsium samme sted (69,70). På denne måten kan man tenke seg at osteokalsin er med på å øke mineraliseringen av benvevet, med den følge at benmineraltettheten økes. Syntesen av osteokalsin økes av 1,25-dihydroksovitamin D (71). Flere studier har vist at nivået av sirkulerende osteokalsin stiger med økende alder (72,73,74), mens andre ikke kunne reproducere dette (75).

Osteokalsins eksakte rolle i benmetabolismen er ennå ikke fullstendig klarlagt, men man har holdepunkter for at proteinet regulerer modningen av benmineraliseringen. I en modell med osteokalsin "knock-out"-mus så Ducy et al. (76) økt bendannelse, uten at antallet osteoblaster eller osteoklaster var forandret. "Knock-out-musene" utviklet større knokler enn normale mus, slik at karboksylert osteokalsin synes å nedregulere osteoblast-aktiviteten og dermed bendannelsen. Til tross for mange rapporter om at osteokalsin affiserer mineraliseringen av benvevet (67,77,78,79) og/eller turnover av mineralene (44,46,61,64,65,66,80,81,82,83,84,85,86,87), kunne ikke Ducy et al. med sin metodikk se forskjeller i benmineraliseringen mellom dyrene med og uten osteokalsin, og det var ingen forskjell i benstyrken hos musene. Boskey et al. (88) brukte tilsvarende populasjoner av mus som Ducy et al., men undersøkte benmineraliseringen med mer sensitiv metodikk (Fourier Transform Infrared Microspectroscopic analysis, FT-IRM). De målte parametre på benkvalitet (mineral: matrix-ratio, karbonat:fosfat-ratio, krystallstørrelse), og påviste forandret benmineralisering hos "knock-out"-musene. På grunnlag av dette kan man si at osteokalsin sannsynligvis er involvert i styringen av deponeringen av normal hydroksoapatitt, både i ben som vokser og i ben som remodelles. Dette skjer vha. at proteinet stimulerer en sakte mineralisering og inhiberer

overdreven mineralisering. Ducy et al. kunne vha. modellen også vise at kombinasjonen av osteokalsinmangel og østrogenmangel (oophorektomi) hos mus gir betydelig økt bentap, sammenlignet med mus kun med østrogenmangel (76). Dette indikerer en protektiv rolle for osteokalsin etter menopausen. Derimot ga osteokalsinmangel ingen forandring i benresorpsjonen eller osteoklastfunksjonen hos dyr med intakte ovarier. Dette står i kontrast til at domenet i proteinets C-terminal er vist å ha kjemotaktiske egenskaper for forløpercellene til osteoklastene (monocytter) (86), hvilket kunne antyde en rolle for osteokalsin også i benresorpsjonen. I samsvar med dette har man sett at benpartikler uten osteokalsin, som implanteres subkutant i rotter, resorberes dårlig (89). Videre, hvis normale benpartikler og benpartikler uten osteokalsin implanteres samtidig, resorberes de normale raskere (81). Osteokalsin kan med dette være et matrikssignal for rekruttering og differensiering av osteoklaster (83), og slik påvirke den alltid pågående remodelleringen av benvev. Man kan da se for seg at mangel av osteokalsin gir nedsatt rekruttering av osteoklaster, og dermed nedsatt remodellering av benvev. Dette er observert i form av redusert turnover av ben i warfarin-behandlede lam (61). Osteokalsin kan på grunnlag av dette synes å være viktig faktor i ivaretakelsen av benkvaliteten, når bendannelsen og benresorpsjonen kommer i ubalanse i forhold til hverandre (90).

Osteokalsin som produseres avleires hovedsakelig i benvevets ekstracellulærmatriks (60). Osteokalsin i benmatriks har svært lang halveringstid, slik at det utgjør omkring 80% (2,4) av den totale mengde γ -karboksylglutamylosterifisert protein i benvev, og er med dette et av de vanligste proteinene i kroppen. Osteokalsin utgjør ca. 15-20% (60) av alt non-kollagent protein i benvev. En mindre fraksjon av nylig syntetisert osteokalsin frigjøres til sirkulasjonen, og kan derfor måles. Osteokalsin i plasma stammer fra nylig produksjon, ikke fra benresorpsjon eller frigjøring fra benmatriks, og kan derfor benyttes som en markør på osteoblastaktivitet (91).

Osteokalsin er også påvist i glatte muskelceller i kar, og produksjon av osteokalsin-mRNA foregår i blodplater (92,93).

Furie et al. (94) har vist at hvis utilstrekkelige mengder vitamin K er tilstede ved produksjonen av de aktuelle proteinene, dannes underkarboksylerte versjoner hvor noen eller alle Gla-enheter mangler. Med tap av Gla-enheter vil man sannsynligvis få tap av funksjon, men hvilken grad av underkarboksylering som er nødvendig for at dette skal skje, er ikke kjent for de ulike vitamin K-avhengige proteinene.

Underkarboksylering av osteokalsin

De vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorene produseres i leveren, som tar opp vitamin K fra sirkulasjonen svært effektivt. Når man legger koagulasjons-parametre (INR og cephotest) til grunn, sees vitamin K-mangel pga. mangelfull ernæring svært sjeldent (95,96). Indusert vitamin K-mangel på bakgrunn av antikoagulasjon-behandling, er derimot svært vanlig, men naturlig nok en annen sak.

Fra undersøkelser gjort i en frisk befolkning, har man funnet at ved et vitamin K-inntak som gir full karboksylering av alle koagulasjonsfaktorene, vil 10-30% (avhengig av målemetodikk) av sirkulerende osteokalsin være underkarboksylert (59,97). Fullstendig karboksylering av sirkulerende osteokalsin synes å være svært sjeldent, unntatt hos personer som tar vitamin K-tilskudd. Underkarboksylering av osteokalsin er også vist å være vanlig i benvev. Flere studier antyder en sammenheng mellom inntak av

vitamin K og bentetthet, og dermed også korrelasjon mellom vitamin K-status og frakturrisiko. Dette behandles i detalj senere.

Matrix Gla-protein

Matrix Gla-protein (MGP) er et vitamin K-avhengig protein bestående av 79 aminosyrer, hvorav fem Gla-enheter (98,99). Proteinets finnes i høye konsentrasjoner i ben og brusk og akkumuleres i områder med pågående forkalkning, bl.a. hjerteklaffer (100). Dets mRNA er påvist også i andre vev, som f.eks. lunge, nyre, milt, samt i glatte muskelceller i veggen til blodkar (101). MGP er av avgjørende betydning for å forhindre prematur forkalkning, og inhiberer avleiring av ekstracellulær kalsiummatriks i både brusk og arterievegger (53,102,103).

MGP forhindrer som nevnt forkalkning av brusk, og hos rotter som langtidsbehandles med warfarin (44), er det sett at epifyseskiven i knoklene lukkes, hvilket er forenlig med nedsatt funksjon av MGP ved tilførsel av warfarin. Samme mekanisme antas å være involvert ved føtalt warfarin syndrom (43), hvor behandling med vitamin K-antagonist gir nedsatt aktivitet av MGP og osteokalsin, med en overdreven og feilslått mineralisering av brusk og beinvev til følge (60,102).

Luo og medarbeidere (103) kunne vha. sin musemodell gi betydelige bidrag til forståelsen av funksjonene til MGP. Etter delesjon av MGP-genet så forfatterne rask forkalkning av elastiske lameller i arterienes media, men ikke i arterioler, vener eller kapillærer. Innen to måneder var dyrene døde etter at deres forkalkede aorta thoracalis eller abdominalis rumperte. I den samme modellen så man samtidig abnormal forkalkning av brusk, inkludert vekstplaten, som medførte kortvoksthet, osteopeni og frakturer. Keutels syndrom, en autosomal recessiv lidelse, har blitt vist å være assosiert med en DNA-mutasjon som medfører at en ikke-funksjonell versjon av MGP uttrykkes (104). Hos de rammede ser man unormal forkalkning av brusk, som kommer til uttrykk ved unormale aurikler, nese, larynx, trachea, ribbein, dessuten midt-facial hypoplasi. Man ser perifere pulmonale stenoser, samt at de terminale phalangene er korte. Disse funnene styrker oppfatningen om at også MGP har betydning for dannelsen av ben, men samsvarer ikke helt med funnene i musemodellen, da pasienter med Keutels syndrom, så vidt man vet, ikke har økt risiko for kardiovaskulær sykdom (104,106).

Et viktig poeng er at forandringene man ser i arterieveggen ved endret funksjon av MGP ikke har karakter av atherosklerose, som er en sykdom i karenes intima, med inflammasjon, makrofag-tilstrømning, dannelse av plakk og dermed fortykkelse av blodåreveggen. Ved dysfunksjon av MGP har man derimot funn som ved Mönckebergs sklerose, forandringer man ser i karveggen ved diabetes mellitus og økende alder (53,107,108,109). Forkalkningen starter omkring elastinfibrene, med økende avleiring av kalsiumsalter med karskade til følge. Det kan likevel synes som om vitamin K-avhengige proteiner, særlig protein S og Gas6, spiller en rolle i atherosklerose (53).

Gla-enhetene er av avgjørende betydning for de vitamin K-avhengige proteinenes funksjon, og MGP er intet unntak. I en dyremodell (110) fikk rotter høye doser warfarin, samtidig som de ble gitt tilstrekkelig vitamin K til at normal hemostase ble opprettholdt, hvilket er mulig da man vet at leveren utnytter vitamin K mer effektivt enn andre vev (deriblant karveggen) (111,131). Price et al. (110) fant at rottene viste de samme tegnene til arteriell forkalkning som man fant i den nevnte musemodellen, men i mindre uttalt

grad, hvilket antyder en restfunksjon av gjenværende, ufullstendig dekarboksylert MGP. Samtidig så man en kraftig økning av MGP-antigen i rottens aorta og MGP-mRNA i glatte muskelceller i karveggen, slik at produksjonen av MGP var økt. I tilslutning til denne modellen har forfatterne også vist at warfarin-indusert arterieforkalkning øker under vekst (112); man observerte massiv forkalkning hos 20 dager gamle dyr, mot mindre forandringer hos 42 dager gamle rotter, og ingen hos 10 måneder gamle dyr. En diett som vedlikeholdt vekten men forhindret vekst, begrenset forkalkningen effektivt. Samtidig fant man at vitamin D fremmet arteriell forkalkning vesentlig. Årsaken til disse forholdene er ikke kjent, men det kan reflektere de høyere nivåene av kalsium og fosfat man finner hos rasktvoksende dyr og ved vitamin D-tilførsel (112).

Man kjenner heller ikke til på hvilken måte Gla-enhetene er avgjørende for proteinenes fysiologiske funksjon, annet enn at man vet at de binder kalsium. Price (110) påviste i tillegg at MGP kun kan frigjøres fra forkalket arterievegg ved demineralisering av vevet, og slutter på dette grunnlaget at proteinet bindes sterkt til hydroksoapatittkrystaller, og hindrer deres vekst og mulighet til å danne nye krystaller. Andre (113) foreslår derimot at MGP trer inn tidligere i prosessen, og inhiberer en eller flere faktorer evne til å indusere osteogenese. Bak denne hypotesen står det faktum at man under kartleggingen av bone morphogenetic proteins-2/4 og MGP, og deres ekspresjon i karveggen og benvev, hadde vansker med å skille disse proteinene fra hverandre (113).

På grunnlag av de nevnte forhold kan man konkludere med at MGP er av avgjørende betydning for reguleringen av forkalkning av arterier og andre vev *in vivo* (108), og at det ikke finnes noen annen inhibitor som overtar funksjonene til MGP ved mangel av proteinet.

Shanahan et al. (107) brukte immunhistokjemiske og molekylærbiologiske metoder til å sammenligne glatte muskelceller i karveggen hos diabetikere og friske mtp. ekspresjon av proteiner som regulerer mineraliseringsprosessen. De fant at Mönckebergs sklerose ser ut til å være en aktiv prosess som kan være styrt av glatte muskelceller med modifisert fenotype. Cellene ser ut til å uttrykke egenskaper assosiert med osteoblaster, og selve mineraliseringsprosessen har paralleller til osteogenesen. Osteokalsin var en av flere osteogene markører hvis mRNA var økt i cellene hos diabetikerne sammenlignet med de friske. I karvegg med Mönckebergs sklerose var MGP-mRNA redusert, mens MGP-ekspresjonen var kraftig økt i områder tilstøtende til forkalkningen. Det sistnevnte forholdet kan representere et forsøk i omkringliggende områder på å øke clearance av kalsium, en feedback-mekanisme. Igjen synes det som om reduserte nivå av MGP disponerer for forkalkning (53,107).

Vitamin K1 intervensjonsstudier – vaskulær helse

På basis av at man har tegn til at prosessen bak arteriell forkalkning ligner bendannelse, har sammenhengen mellom vitamin K og vaskulær helse blitt undersøkt. Man har dessuten i flere år kjent til en epidemiologisk assosiasjon mellom osteoporose og forkalkning av aorta (114). Jie et al. (115) og Geleijnse et al. (116) fant i populasjonsbaserte studier signifikant invers relasjon mellom forkalkning av aorta og inntak av hhv. vitamin K₁ og K₂. Geleijnse et al. fant også at vitamin K₂-inntaket var negativt korrelert med insidensen av både ischemisk hjertesykdom og kardiovaskulær mortalitet.

Protein S

Protein S er et vitamin K-avhengig protein først og fremst assosiert med koagulasjonprosessen, hvor det inngår sammen med protein C i det inhiberende systemet for å forhindre at koagulasjons-kaskaden skyter over mål (32,53).

Protein S kan ha funksjoner utover koagulasjonen, og har muligens en rolle ved reguleringen av benvevets turnover. Maillard et al. (117) har vist at protein S er tilstede i benmatriks, det secernerer av osteoblaster in vitro, en sekresjon som reduseres ved warfarinbehandling. To barn med arvelig protein S-mangel hadde i tillegg uttalt osteopeni (118), og dette peker også i retning av at protein S er involvert i benmetabolismen.

Epidemiologi - vitamin K, osteokalsin, osteoporose

Osteoporose er et stort folkehelseproblem, i Norge og på verdensbasis forøvrig. 35% (240000) av norske kvinner har hatt minst et brudd etter menopausen, tallene for menn er lavere, 16% (92000). Årlig er det omtrent 10000 lårhalsbrudd i Norge, hvorav 80% hos kvinner. Opptil 20% av pasientene dør innen et år etter bruddet, og så mange som 50% vil ikke kunne vende tilbake til et fullt ut uavhengig liv. Mange vil ikke kunne utskrives fra sykehus eller annen pleieinstitusjon, og osteoporose utgjør med dette en stor samfunnsøkonomisk belastning (119).

Mange faktorer spiller inn ved utviklingen av osteoporose, slik som økende alder, østrogenmangel, kjønn, rase, familieanamnese, kost, medikamentbruk mfl. (119). Mye av oppmerksomheten omkring ernæringsfaktorer har dreid seg om kalsium, som antas å spille en sentral rolle i patofysiologien. Etter hvert som man ble klar over at det fantes vitamin K-avhengige proteiner i benvev, har interessen økt for å lete etter sammenhenger mellom vitamin K-status og ulike benhelse-parametre. En rekke studier har etter hvert kommet til, både epidemiologiske undersøkelser og intervensjonsstudier.

Inntak av vitamin K og markører på vitamin K-status

For å kunne undersøke hvilken rolle vitamin K har i forhold til f.eks. benvev, er man avhengig av å kunne måle individers vitamin K-status, samt se denne i relasjon til vitamin K-inntak. Studier fra Storbritannia har vist at inntaket av vitamin K varierer kraftig i befolkningen (120-123). Yngre synes å ha et vitamin K-inntak omkring 90 µg daglig, mens eldre inntar 80-120 µg/d. Undersøkelser fra Holland (124), hvor inntaket av grønnsaker tradisjonelt sett har vært høyt, har vist høyere tall, mens kostregistreringer i USA (125) har gitt tall på nivå med de britiske. Konsentrasjonen av vitamin K₁ i plasma er positivt (120) og lineært (126) korrelert med inntaket av vitamin K₁ i kosten, men man ser at mengden ikke stiger ytterligere når inntaket overgår 200 µg/d (126). Derimot har man sett at supplement av vitamin K₁ gitt som farmakologisk preparat har større biotilgjengelighet enn tilsvarende mengder i vanlig kost. Ved tilførsel av farmakologisk vitamin K₁ har man sett at konsentrasjonen i plasma kan fortsette å stige doseavhengig og lineært til svært høye nivå (127).

Vitamin K i serum (fyllokinon) anses som en generell markør på vitamin K-status (120). Man må imidlertid være oppmerksom på det faktum at vitamin K transporteres i

sirkulasjonen av lipoproteiner, og det er vist i mange studier at konsentrasjonen av vitaminet korrelerer med mengden lipider i plasma (8,13,128). Av denne grunn bør vitamin K måles fastende om morgenen (109). Samtidig påvirkes konsentrasjonen også av inntaket av fyllokinon det siste døgnet, og verdien kan dermed variere betydelig (109,125).

Vestlig kosthold inneholder forholdsvis begrensede mengder menakinon, hvilket gjenspeiles i at menakinonene (MK 4-13) hos forsøkspersoner ofte finnes i så lave konsentrasjoner, at de ikke er målbare med vanlig utstyr (109). Situasjonen er derimot en annen i Japan, hvor natto, en rik kilde til vitamin K₂, inngår i kostholdet. MK-7 er hos japanerne vist å utgjøre den største vitamin K-komponenten i plasma (129,143). Likevel kan den samlede menakinon-fraksjonen også hos europeere utgjøre en vesentlig mengde vitamin K i sirkulasjonen og vevene for øvrig. For å oppnå oversikt over begge fraksjoner av vitamin K i blodet, både K₁ (fyllokinon) og K₂ (menakinon), og dermed vitamin K-status, foreslås det å måle metabolitter av vitamin K i urinen. Både vitamin K₁ og K₂ metaboliseres og skilles ut i urinen som metabolitter med forkortede sidekjedder (5C, 7C). Hvis man kunne måle disse metabolittene, ville man få oversikt over det totalte forbruket av vitaminet (både K₁ og K₂) (109). En del gjenstår imidlertid før dette evt. blir aktuelt.

Måling av fyllokinon i serum gir en indikasjon på global vitamin K-status i form av at fyllokinon-inntaket den siste tiden reflekteres (130). Man har riktignok holdepunkter for at nivået i serum ikke nødvendigvis gjenspeiler vitamin K-status i de ulike vevene (109). Vitamin K-avhengige proteiner produseres bl.a. i leveren og benvev. Underkarboksylerte varianter av disse proteinene er funksjonelt defekte, og måling av disse i serum er en sensitiv markør på funksjon av vitamin K i det vevet der det aktuelle proteinet er produsert (96,109, 130,132). Det er kjent at leveren utnytter tilgjengelig vitamin K mye mer effektivt enn benvev (131), og i fravær av malabsorpsjon, er det svært uvanlig at vitamin K-mangel pga. utilstrekkelig inntak fra kosten blir så uttalt at koagulasjonen påvirkes klinisk eller biokjemisk. De vitamin K-avhengige benproteinene er mye mer sårbare for redusert inntak av vitamin K, og en viss grad av underkarboksylering av osteokalsin (10-30%) er vanlig blant friske personer i alle aldersgrupper (59,97,134). Leveren produserer vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorer, faktor II, VII, IX, X, inkludert protein C og S. Man har derfor tidligere benyttet koagulasjonsparametre som protrombintid (INR) og cephotest (APTT) som mål på vitamin K-status, og alvorlig vitamin K-mangel kan diagnostiseres vha. slike tester. Nivået av underkarboksylert protrombin, dvs. protrombin produsert i fravær av vitamin K (PIVKA-II), er derimot en mye mer sensitiv indikator på suboptimal tilgjengelighet av vitamin K i leveren enn INR (96,133), da sistnevnte forblir uendret inntil konsentrasjonen av protrombin (faktor II) faller under 50% av vanlige nivå (95).

Osteokalsin produseres i praksis kun i ben, og underkarboksylert osteokalsin (ucOC, Glu-OC) er et sensitivt mål på vitamin K-status i benvev. Denne markøren er den første som affiseres ved vitamin K-mangel, og den siste som responderer ved tilførsel av vitamin K (134). I studier er det sett korrelasjon mellom nivåene av sirkulerende vitamin K (fyllokinon) og karboksylert osteokalsin (cOC, intakt osteokalsin, iOC), mens fyllokinon er inverst korrelert med underkarboksylert osteocalcin (ucOC). Alle disse tre parametrene bør måles for å få en nøyaktig indikasjon på vitamin K-status og funksjon (96,109,130,134-136). Gundberg et al. (137) fant i sin studie, at det mest nøyaktige målet for underkarboksylert osteokalsin er å uttrykke underkarboksylert osteokalsin som

prosent av totalt osteokalsin, evt. som ratio med ucOC og cOC. Dette fordi forfatterne fant stor variasjon i måleresultatene ved bruk av ulike metodikker.

I tillegg til målinger av fyllokinon og osteokalsin, er γ -karboksyglutaminsyre (Gla) i urinen et sensitivt mål på vitamin K-status (96,186). Kollektivt har disse parametrene blitt vurdert i relasjon til vitamin K-mangel (16,138,139), vitamin K-antagonisme (136,140,141) og tilskudd av vitamin K (130).

På samme måte som for lever og benvev, vil det være interessant å undersøke vitamin K-status i andre vev. Matrix Gla protein (MGP) produseres i hovedsak av chondrocytter og glatte muskelceller i karveggen, og det foreligger holdepunkter for at MGP bl.a. er involvert i patofysiologien ved Mönckebergs sklerose. Underkarboksylerede former av MGP ville kunne reflektere vitamin K-status i brusk og arterier, men har hittil vært lite brukt (109).

Osteokalsin og grad av karboksyilasjon

Mindre enn maksimal γ -karboksylering av sirkulerende osteokalsin er vanlig (59,97,134) og er assosiert med lav benmasse og økt risiko for hoftebrudd, hvilket gjennomgås grundig senere. Likevel, assosiasjon medfører ikke nødvendigvis kausal sammenheng mellom disse faktorene, og indikatorene på vitamin K-insuffisiens kan for så vidt snarere reflektere en generell underernæring enn isolert vitamin K-mangel (60). Ut fra dette kan man ikke sikkert si at mangel på vitamin K medfører økt bentap. Hvis subklinisk vitamin K-mangel skulle ha negative konsekvenser for benhelsen, har man hittil antatt at dette ville reflekteres i redusert γ -karboksylering av vitamin K-avhengige benproteiner. Dette fordi man inntil nå kun har hatt kjennskap til en biologisk funksjon av vitamin K i særlig grad; vitaminets rolle som kofaktor til γ -karboksylassen (1,8,60). Dette enzymet er nødvendig for syntese av Gla-enheter, som er helt nødvendige for de vitamin K-avhengige proteinenes funksjon.

Flere studier utført i populasjoner av ulik sammensetning, har vist at redusert inntak av fyllokinon (<35 $\mu\text{g/d}$) gir rask reduksjon av fyllokinon i plasma og ekskresjon av Gla-enheter i urinen (130,131,136), sistnevnte et mål på omsetning av alle vitamin K-avhengige proteiner. Samtidig ble det sett økning i underkarboksylerede former av de vitamin K-avhengige proteinene osteokalsin og protrombin. Funnene i disse undersøkelsene indikerer utvikling av subklinisk vitamin K-mangel. De klassiske markørene på vitamin K-status, koagulasjonparametrene, forble hos disse forsøkspersonene uendret.

Ferland et al. (138) lot en populasjon bestående av både unge og gamle over 13 dager få en diett inneholdende begrensede mengder vitamin K. De observerte et markant fall i plasma fyllokinon og en signifikant økning i plasma underkarboksyleret protrombin i begge grupper. Her fant man hos de gamle dog ingen effekt av redusert vitamin K-inntak på ekskresjon av Gla i urinen, og dette ble forklart med at de gamle kunne være relativt motstandsdyktige ovenfor lite vitamin K i kosten. Booth et al. (131) observerte derimot i en studie blant eldre kvinner effekt på ekskresjonen av Gla i urinen etter en periode med vitamin K-fattig kost. Forskjellen mellom de to undersøkelsene på dette punktet kan skyldes at forsøkspersonene til studien til Booth et al. ble utsatt for en lengre periode med et lite inntak av vitamin K.

Vitamin K-status hos friske japanske kvinner

Tsugawa og medarbeidere (143) ønsket å undersøke assosiasjonen mellom biokjemiske markører på vitamin K-status og indikatorer på benmetabolisme hos friske japanske kvinner, samt ut fra grad av γ -karboksylering av osteokalsin evaluere aldersrelaterte forskjeller i benvevets vitamin K-behov. 396 kvinner i alderen 30-88 år (gjennomsnittlig 63 år) ble rekruttert, og disse ble fordelt i tre grupper etter alder (30-49 år, 50-69 år, ≥ 70 år), alle i den første gruppen var premenopausale, de andre postmenopausale. Vitamin K_1 , MK-4, MK-7, ucOC, intakt osteokalsin (iOC), samt andre markører på turnover av ben ble målt.

Benturnover-markørene, inkl. ucOC, var signifikant korrelert med alder, dette gjaldt ikke for iOC. MK-7 utgjorde den største vitamin K-komponenten i plasma til disse japanske kvinnene, i motsetning til europeiske populasjoner, hvor fyllokinon dominerer. Dette er ikke overraskende da det japanske kostholdet bl.a. inneholder mye natto, en rik kilde til vitamin K_2 . Kvinnene hadde mer vitamin K_1 enn MK-4 i plasma, over 40% av kvinnene hadde ikke påvisbar konsentrasjon av sistnevnte, som vist av andre (129). Videre fant man bl.a. at vitamin K_1 og MK-7 var signifikant negativt korrelert med plasma ucOC og ucOC:iOC (ratio) hos forsøkspersonene over 50 år, mens ingen slik korrelasjon ble gjenfunnet hos de yngre. Alder var altså positivt korrelert med disse to variablene. Ut fra dette kan man få inntrykk av at konsentrasjonen av vitamin K i plasma nødvendig for γ -karboksylasjon av osteokalsin er lavere hos yngre enn hos eldre personer. Man har også i andre studier sett at konsentrasjonen av sirkulerende ucOC er høyere hos eldre kvinner enn yngre (59,97), hvilket altså ble gjenfunnet her, siden ucOC og ucOC:iOC økte med alderen og nådde de største konsentrasjonene hos de eldste. Dette antyder altså en aldersavhengig forskjell i effektiviteten av osteokalsin-karboksyleringen.

I denne studien kunne man statistisk vise at behovet for vitamin K øker med alderen. Kvinnene i alderen 30-49 år hadde minimum ucOC:iOC ved betydelig lavere plasmaverdier av vitamin K_1 og MK-7 enn de eldre kvinnene, tilsvarende var verdiene lavere for gruppen 50-69 år enn for de over 70 år. Man vet ikke hvorfor behovet for vitamin K øker med alderen, forfatterne her (143) foreslår at dette kan skyldes en reduksjon i antall osteoblaster, som i denne sammenhengen er målcellene for vitamin K, eller at γ -karboksylasens enzymatiske aktivitet reduseres med alderen.

Det bør også nevnes at man her observerte at konsentrasjonen av vitamin K_1 korrelerte negativt med konsentrasjonen av DPD i urin. Booth et al. (144) har vist at personer som får en vitamin K-fattig diett over 15 dager, har økt turnover av ben målt ved konsentrasjonene av osteokalsin i serum og NTx i urin. Disse markørene ble normalisert ved tilførsel av vitamin K_1 (200 $\mu\text{g}/\text{d}$) i 10 dager. Ved vitamin K_1 -tilskudd kunne Sokoll (130) og Binkley (134) ikke vise signifikant forandring i markører på benturnover, mens Knapen (145) og Douglas (146) fant stigning i disse. Tsugawa et al. fant som nevnt at vitamin K_1 kun var signifikant korrelert med DPD i urinen, ikke konsentrasjonen av NTx i urinen eller BAP (benspesifikk alkalisk fosfatase) i plasma. Iflg. forfatterne kan dette indikere at vitamin K er en svak regulerende faktor av benturnover hos kvinner.

Optimal karboksylering av osteokalsin

Fyllokinon i plasma, underkarboksylert protrombin (PIVKA-II) og underkarboksylert osteokalsin (ucOC) responderer på vitamin K-tilførsel, mens ekskresjonen av Gla-enheter

i urinen har vist varierende respons på tilskudd av vitamin K i forskjellige studier. Binkley et al. (135) undersøkte i hvilken grad ulike doser av fyllokinon-tilskudd kunne øke γ -karboksyleringen av osteokalsin. Populasjonen i studien bestod av friske voksne mellom 19 og 36 år. Først ble det gjort en substudie hvor seks kvinner og fire menn først fikk placebo daglig i en uke, deretter tilskudd av fyllokinon i tre uker, 500 $\mu\text{g}/\text{d}$ den første uka, og henholdsvis 1000 og 2000 $\mu\text{g}/\text{d}$ de påfølgende to ukene. Osteokalsin og underkarboksyliert osteokalsin (ucOC) ble målt ved baseline og etter hver uke. %ucOC ble signifikant redusert, fra 7,48% ved baseline til 2,49% etter uke en, videre 1,9% og 1,75% etter henholdsvis uke to og tre. Tilskudd av både 1000 $\mu\text{g}/\text{d}$ og 2000 $\mu\text{g}/\text{d}$ reduserte %ucOC signifikant mer enn tilførsel av 500 $\mu\text{g}/\text{d}$, forskjellen i reduksjon av %ucOC mellom tilskudd av 1000 og 2000 $\mu\text{g}/\text{d}$ var derimot ikke signifikant.

I neste substudie (135) ble 58 kvinner og 42 menn randomisert til å motta placebo eller supplement av fyllokinon (250, 375, 500 og 1000 $\mu\text{g}/\text{d}$) i to uker. %ucOC mfl. ble målt ved baseline og etter hver uke. I gruppene som fikk fyllokinon observerte man økning i serum fyllokinon etter både uke en og to sammenlignet med baseline. Økningen var doseavhengig, og signifikant større hos de som mottok 1000 $\mu\text{g}/\text{d}$ sammenlignet med de andre gruppene som fikk tilskudd, mens forskjellene var nonsignifikante mellom de som fikk 250, 375 og 500 $\mu\text{g}/\text{d}$. %ucOC ble signifikant redusert hos de som fikk tilskudd, også her doseavhengig. Reduksjonen var signifikant større hos de som fikk 1000 $\mu\text{g}/\text{d}$ fyllokinon sammenlignet med de andre gruppene, mens det heller ikke her var signifikante forskjeller i reduksjonene mellom gruppene som fikk 250, 375 og 500 $\mu\text{g}/\text{d}$. Totalt osteokalsin i serum ble ikke påvirket av fyllokinon-supplementene. I denne populasjonen var osteokalsin i utgangspunktet gjennomsnittlig 92% karboksyliert. Dette tallet tilsvarende hva man har sett i andre studier, resultatene varierer noe avhengig av hvilken målemetode man benytter (60). Tilskudd av 250 μg fyllokinon daglig økte andelen karboksyliert osteokalsin til 96%, mens omkring 1000 $\mu\text{g}/\text{d}$ er nødvendig for å oppnå optimal karboksylering av osteokalsin. Forsøkspersonene i studien var unge og friske, derfor er det usikkert hvorvidt resultatene er overførbare til eldre. I en annen studie, hvor man ga unge voksne og eldre over 65 år tilskudd av fyllokinon (134), så man riktignok lik reduksjon av %ucOC i de to gruppene. I sistnevnte studie fikk man også reduksjon i totalt osteokalsin ved tilskudd av fyllokinon, noe man ikke oppnådde i studien med de unge, friske voksne, hvilket iflg. forfatterne kan skyldes confounding pga. høye verdier hos noen av de unge mennene.

Fyllokinon i kosten vs. fyllokinon-tilskudd

Biotilgjengeligheten av fyllokinon-tilskudd synes større enn for fyllokinon i kosten (109). Maksimal karboksylering av osteokalsin oppnås først ved tilskudd av 1000 μg fyllokinon daglig (135). Gjennomsnittlig daglig inntak av fyllokinon ligger omkring 80-150 $\mu\text{g}/\text{d}$, og hvis man skulle oppnå maksimal osteokalsin-karboksylering vha. kosten, antas det at man må innta et sted mellom 2-5000 μg fyllokinon daglig (134), hvilket blir vanskelig å oppnå. Skulle det derfor vise seg at maksimal karboksylering av osteokalsin er gunstig, må dette nås vha. tilskudd av fyllokinon (109).

Mangel av fyllokinon – leverens utnyttelse vs. annet vev

Booth et al. (131) rekrutterte 21 kvinner mellom 60 og 80 år (gjennomsnittsalder 70.4 år) til en studie, for å undersøke relasjonen mellom fyllokinon-inntak og karboksylering av hepatiske og ekstrahepatiske vitamin K-avhengige proteiner. De første 14 dagene av forsøket fikk kvinnene en diett inneholdende 90 µg fyllokinon daglig, som tilsvarer daglig anbefalt inntak av vitamin K i USA. De påfølgende 28 dagene fikk de en fyllokinon-fattig (18 µg/d) diett, før de over tre perioder à 14 dager først fikk 86, deretter 200 og til slutt 450 µg fyllokinon daglig. Ulike markører på vitamin K-status ble målt flere ganger i løpet av forsøket.

Allerede i løpet av perioden hvor kvinnene fikk 90 µg fyllokinon daglig, så man tegn til subklinisk vitamin K-mangel. Fyllokinon ble over disse 14 dagene signifikant redusert i forhold til baseline, tilsvarende økte ucOC signifikant. Ingen av disse to viste ytterligere signifikant forandring i løpet av de påfølgende 28 dagene med fyllokinon-fattig kost. Det ble ikke gjort noen registrering av mengden vitamin K i normalkosten til disse kvinnene, men ut fra andre studier vet man at kvinner i denne aldersgruppen gjennomsnittlig har et inntak omkring 130-150 µg fyllokinon daglig (125). Derfor utgjorde et inntak på 90 µg/d sannsynligvis en reduksjon i forhold til det normale for forsøkspersonene.

Urin-ekskresjonen av Gla viste en nedadgående trend over de første 14 dagene av forsøket, og var signifikant redusert i forhold til baseline innen utgangen av perioden med fyllokinon-fattig diett. Tilsvarende økte PIVKA-II (underkarboksylert protrombin) i løpet av den første perioden, hvor inntaket tilsvarte amerikanske ”guidelines”, og fortsatte økningen i andre periode, en økning som var signifikant ved slutten av denne. Koagulasjonsparametrene som ble målt, PT og APTT, var uforandret gjennom hele forsøksperioden. γ -karboksyleringen av protrombin ble normalisert ved tilskudd av 200 µg fyllokinon daglig, mens alle andre biokjemiske markører på vitamin K-status forble subnormale selv ved tilførsel av fyllokinon-tilskudd 450 µg/d. Plasma fyllokinon økte riktignok noe ved tilskudd over 200 µg/d, men selv da under det normale.

Forfatterne mener at en mulig årsak til at fyllokinon ikke akkumuleres i plasma før ved doser over 200 µg/d, er at leveren tar opp mye vitamin K for å ivareta karboksyleringen av de hepatiske vitamin K-avhengige proteinene. Først ved doser over dette vil fyllokinon kunne finnes i plasma i noe større mengder. PIVKA-II var i samsvar med dette korrelert med nivået av fyllokinon-inntaket via kosten eller supplement. Samtidig så man at ucOC forholdt seg resiprokt til plasma fyllokinon, slik at underkarboksyleringen av osteokalsin, et protein som produseres i osteoblastene, først kunne reduseres når nivået av fyllokinon i plasma steg. Denne observasjonen, at leveren først sørger for å karboksylere de hepatiske vitamin K-avhengige proteinene før fyllokinon i plasma kan øke, er også sett i en rottemodell ved Kindberg og Suttie (142). Her så man at konsentrasjonen av fyllokinon i leveren var korrelert med inntaket av fyllokinon i kosten, mens fyllokinon i serum ikke økte med økningen i fyllokinon-inntaket før leveren inneholdt tilstrekkelig vitamin K til å ivareta optimal syntese av de hepatiske vitamin K-avhengige proteinene.

Booth et al. (131) finner på samme måte som Binkley et al. (135) at det anbefalte daglige vitamin K-inntaket, 90 µg fyllokinon daglig, ikke er tilstrekkelig mtp. å sikre maksimal karboksylering av osteokalsin.

Hvilken betydning har underkarboksylering av osteokalsin?

Disse ovennevnte studiene viser at osteokalsin under normale forhold ikke er maksimalt karboksylert hos friske mennesker. Selv om epidemiologiske data, som gjennomgås i det følgende, relaterer dette til redusert benmineraltetthet (BMD) og økt risiko for frakturer, vet man ikke hvilke følger underkarboksylering av osteokalsin har, da man kun kjenner bruddstykker av proteinets fysiologiske funksjon. Man vet heller ikke hva det evt. vil medføre hvis graden av karboksylering økes.

Vitamin K – serumnivå, markører og benhelse

Siden 1970-tallet, etter beskrivelsen av warfarin embryopathy og oppdagelsen av vitamin K-avhengige benproteiner, har man lett etter sammenhenger mellom vitamin K og benhelse. Det foreligger nå flere epidemiologiske studier som undersøker forholdet mellom nivået av vitamin K-parametre i blodet og ulike mål på benstatus.

Hart et al. (147) publiserte i 1985 et arbeid som knyttet vitamin K-nivå i serum til risiko for osteoporotiske frakturer. Studien hadde tre grupper, hvor gruppe 1 besto av 16 pasienter med hoftefrakturer, gruppe 2 inneholdt 14 pasienter med vertebrale frakturer, mens gruppe 3 utgjorde 15 kontroller. Man målte serum vitamin K₁, og fant gjennomsnittlige verdier på hhv. 71, 79 og 335 pg/mL for de tre gruppene. Flere studier har etter hvert bekreftet dette bildet, først Hodges et al. (148), som sammenlignet serumverdier av vitamin K₁, MK-7, MK-8 hos 29 pasienter med hoftefrakturer og vertebrale frakturer med tilsvarende hos 17 kontroller, og fant signifikant lavere verdier i frakturgruppen.

I en japansk undersøkelse målte Kanai et al. (149) benmineraltetthet (BMD), serum vitamin K₁ og K₂, osteokalsin og andre markører på benmetabolisme hos to grupper. Den første gruppen besto av 71 postmenopausale kvinner, hvorav 19 hadde redusert og 52 normal BMD. I denne gruppen hadde de med redusert BMD signifikant lavere verdier av vitamin K₁ og MK-7 enn kvinnene med normal BMD, derimot så man ingen signifikante forskjeller i nivå av osteokalsin eller andre markører. Den andre gruppen inneholdt 24 menopausale kvinner, og disse fikk østrogentilskudd (HRT) pga klimaterisk besvær. 18 av kvinnene her hadde normal BMD, mens 6 hadde redusert BMD. Blant de sistnevnte fant man signifikant høyere nivå av osteokalsin enn hos kvinnene med normal BMD, både før oppstart av HRT og etter behandling i 12 mnd. Osteokalsinnivået sank dog signifikant i løpet av 1 års behandling hos alle som fikk HRT, uavhengig av BMD, forøvrig var det ingen signifikante forskjeller i resultatene. Forfatterne mener med dette å finne holdepunkter for at vitamin K er involvert i utviklingen av osteoporose postmenopausalt.

Hodges og medarbeidere (150) målte i en ny studie vitamin K₁, MK-7 og MK-8 hos 51 kvinner (gjennomsnittsalder 81 år) kun få timer etter en hoftefraktur. Tilsvarende ble også undersøkt hos 38 friske kontrollpersoner i samme aldersgruppe. Alle de målte variablene var signifikant lavere i frakturgruppen, hvilket kan tyde på at pasienter med hoftefraktur har vitamin K-mangel, med de følgene det har for benmetabolismen. Nå skal man være oppmerksom på at fyllokinon (vitamin K₁) i plasma/serum er avhengig av vitamin K-inntaket siste døgn (109,125), slik at store svingninger kan sees. Det

reflekterer i hvert fall på ingen måte vitamin K-status over tid, og det er nærliggende å tro at virkningene av vitamin K på benvevet er av mer langsiktig art.

Tamatani et al. har i to mindre studier (151,152) fått tilsvarende resultater for eldre menn. Begge undersøkelsene omfattet 27 eldre menn, i den ene ble serum vitamin K₁, MK-7 og BMD målt, hvor verdiene for vitamin K₁ og MK-7 begge var positivt korrelert med mennenes BMD. I den andre ble i tillegg 25-hydroksyvitamin D målt, og de tre parametrene var alle positivt, signifikant korrelert med BMD.

Kawana et al. (162) målte i en japansk studie vitamin K₁, MK-4 og MK-7 hos 23 friske kvinner (gjennomsnittlig alder 80,1 år), 13 kvinner med vertebrale frakturer (80,3 år) og 38 kvinner med hoftebrudd (79,8 år). Her kunne man ikke påvise noen signifikant forskjell mellom gruppene av de målte variablene. Et problem forfatterne møtte var dog at et betydelig antall av personene i studien, uavhengig av gruppe, hadde så lave nivå av en eller flere av de ulike variablene at de ikke var målbare, hvilket naturligvis kan ha påvirket utfallet.

Underkarboksylert osteokalsin og benhelse

Det har vist seg, som tidligere gjennomgått, at grad av karboksylering av osteokalsin (ucOC, evt. ucOC:tOC) er en sensitiv markør på vitamin K-status. Flere studier har blitt gjort for å avdekke en evt. assosiasjon mellom ucOC og benmineralitet (BMD) eller forekomst av hoftebrudd.

Osteokalsin og risiko for brudd

Szulc og medarbeidere (156) fulgte 195 eldre kvinner prospektivt over 18 måneder. De fant at kvinnene som i starten av observasjonstiden hadde høye verdier av ucOC, hadde 5,9 ganger høyere relativ risiko for å gjennomgå hoftebrudd i løpet av perioden. Dette resultatet var basert på kun 15 hoftebrudd, og for å fundere resultatet bedre ble en større undersøkelse utført, hvor man fulgte 183 institusjoniserte kvinner mellom 70-97 år over en periode på 3 år (157). Nå ble 30 hoftebrudd observert, og totalt OC, karboksylert OC, ucOC og alkalisk fosfatase var alle signifikant høyere ved baseline hos de som senere gjennomgikk fraktur sammenlignet med de andre. Alderjustert odds ratio for hoftebrudd var tre ganger høyere hos kvinnene som hadde forhøyet ucOC ved baseline, slik at ucOC ble bekreftet som en markør for økt risiko for hoftebrudd hos eldre kvinner. Hvis disse resultatene kan reproduseres i den aldrende befolkningen generelt, foreslår forfatterne at målinger av serum ucOC tas i bruk i klinisk praksis for å estimere bruddrisiko.

Den franske EPIDOS-studien (163) var en prospektiv undersøkelse blant eldre kvinner som fortsatt bodde hjemme. 7598 kvinner over 75 år ble inkludert, og 104 hoftebrudd ble observert i løpet av en oppfølgingsperiode på 22 mnd. En kontrollgruppe på 255 aldersmatchede kvinner uten hoftebrudd ble etablert. Totalt OC og ucOC ble målt ved baseline. De 25% av gruppen med høyeste nivå av ucOC hadde økt risiko for hoftebrudd (OR 1.9, 95% CI 1.2-3.0). Totalt OC var ikke assosiert med risiko. Man justerte for BMD i collum femoris og mobilitetsstatus målt ved hastighet på gangen, men fortsatt var ucOC en uavhengig prediktor for hoftebrudd. Kvinner med både lav BMD (blant de 25% med lavest verdi) og høy ucOC (blant de 25% med høyest nivå) hadde høy risiko for hoftebrudd (OR 5.5, 95% CI 2.7-11.2) sammenlignet med de med bare lav

BMD eller høy ucOC. Tilsvarende ble vist i Holland (164) og Finland (165), hvor man i studier har sett at hemmet karboksylasjon av osteokalsin er assosiert med redusert benmasse og økt frakturrisiko. Luukinen et al. (165) målte totalt osteokalsin, karboksylert osteokalsin og ratio av disse hos 792 hjemmeboende eldre over 70 år. Ved baseline registrerte man også andre risikofaktorer for brudd vha. spørreskjema, tester og kliniske undersøkelser. I løpet av fem år ble fall og frakturer i populasjonen registrert. Man fant at konsentrasjonen av karboksylert osteokalsin i serum, og i enda større grad ratio av karboksylert til totalt osteokalsin, er prediktorer for bruddrisiko blant eldre, hvor reduksjon av de nevnte variablene gir økt risiko.

Osteokalsin og benmineraltetthet (BMD)

Szulc og medarbeidere (158) fant invers korrelasjon mellom målinger av ucOC og BMD i ulike lokalisasjoner hos 98 eldre kvinner, et sammenfallende resultat med det Schoon (154) fant blant pasienter med mb. Crohn.

Jie et al har gjort to studier blant 113 postmenopausale kvinner, med og uten atherosklerose i aorta. I den første studien (115) fant de at tilstedeværelse av atherosklerotiske forkalkninger i abdominale aorta, som anses som en sterk predictor for kardiovaskulær hjertesykdom og mortalitet, er assosiert med en marginal vitamin K-status. Man kom fram til dette på basis av estimering av inntak av vitamin K, samt at man målte to osteokalsin-fraksjoner i blodet hos deltagerne i studien. Den første fraksjonen, $irOC_{free}$, er osteokalsin med lav affinitet for hydroksyapatitt (tilsvarer ucOC), den andre, $irOC_{bound}$, er osteokalsin med høy affinitet for hydroksyapatitt, som ble uttrykt som ”hydroksyapatitt bindingskapasitet” (HBC). Kvinnene med atherosklerose hadde lavere inntak av vitamin K, økt $irOC_{free}$ og redusert nivå av HBC, hvilket indikerer en svekket vitamin K-status. I en påfølgende undersøkelse i samme populasjon (160) fant man at kvinnene med atherosklerose hadde signifikant lavere benmasse enn de uten. Samtidig så man en signifikant, invers korrelasjon mellom ucOC og benmasse hos kvinnene med atherosklerose, dette ble imidlertid ikke gjenfunnet hos de andre kvinnene. I tillegg til å påvise en sammenheng mellom økte nivå av ucOC og lav benmasse hos atherosklerotiske kvinner, peker disse to studiene også på en mulig assosiasjon mellom to prosesser, atherosklerose og osteoporose.

Osteokalsin og ultralydhastighet (UTV)

Liu og Peacock (159) målte totalt osteokalsin (tOC) og underkarboksylert osteokalsin (ucOC), og holdt dette opp mot registreringer av BMD i collum femoris og ”ultrasonic transmitted velocity” (UTV, ultralydhastighet) i os calcis. UTV anses som en markør på benkvalitet. Populasjonen besto av 257 kvinner i alderen 60–99 år, 22 av disse hadde gjennomgått hoftefraktur (i gjennomsnitt tre år før undersøkelsestidspunktet). Resultatene fra studien viste økning i tOC og ucOC med økende alder, men ingen signifikant forskjell i tOC eller ucOC ble påvist mellom personer med og uten hoftefraktur. tOC i serum var negativt korrelert med BMD i collum femoris og UTV i os calcis, disse relasjonene syntes uavhengig av alder. ucOC var negativt korrelert med UTV, tilsvarende men i mindre grad i forhold til BMD. Etter å ha korrigert for alder var sammenhengen mellom ucOC og UTV signifikant, mens korrelasjonen mellom ucOC og BMD var derimot ikke

lenger signifikant. Stigningen i tOC hos kvinner etter 60-årsalderen representerer trolig en aldersrelatert økning i turnover av bein, som er assosiert med aldersrelatert bentap (159). Økningen av ucOC står for redusert vitamin K-status med årene. ucOC viste sterkere relasjon til UTV enn BMD, hvilket kan indikere at en økning i ucOC heller medfører svekkelse av benvevets styrke pga. en endring i benkvalitet enn pga. endring i BMD.

En liten japansk studie (161) undersøkte relasjonen mellom karboksylert osteokalsin og benkvalitet. Man målte benmarkører i serum og ultralydhastighet i tibia, sistnevnte anses som en mulig indikator på benkvalitet (161), hos 14 friske barn mellom 7 og 12 år. Ratio av serum karboksylert osteokalsin og intakt osteokalsin var her positivt korrelert med ultralydhastigheten, hvilket antyder at karboksylering av osteokalsin er relatert til kvaliteten av ben.

Vitamin K-status og helse i spesielle grupper

Økte nivå av ucOC og nedsatt benmineralitet (BMD) i diabetes type II

Diabetes mellitus, både type I og type II, er assosiert med økt frakturrisiko og osteoporose (166). Ved type I kjenner man til noen mekanismer bak denne utviklingen, bl.a. at insulinmangel gir redusert osteoblast-funksjon. Hva som ligger bak redusert BMD hos pasienter med diabetes type II er derimot lite kjent, men flere faktorer er sannsynligvis involvert. Bl.a. har man sett redusert turnover av ben ved dårlig glykemisk kontroll, hvilket antas å redusere benkvaliteten uavhengig av benmineralitet (166). En japansk gruppe (166) satte søkelyset på rollen til vitamin K i denne sammenhengen. 85 eldre kvinner med diabetes type II ble inkludert i en tverrsnittstudie, hvor man målte fyllokinon og MK-7, ucOC, intakt osteokalsin (iOC), flere markører på turnover av ben, samt BMD i lumbalcolumna. Pasientene ble delt i to grupper ut fra T-score etter måling av BMD, en gruppe med score under -2,5 (osteoporotisk) og en annen med score over -2,5 (non-osteoporotisk gruppe).

Nivået av ucOC var signifikant høyere blant de med osteoporose enn de uten. I denne gruppen viste ratio av ucOC/iOC signifikant korrelasjon med Z-score, mens man ikke fant noen slik sammenheng hos diabetikerne uten osteoporose. Det var ingen signifikant forskjell i fyllokinon eller MK-7 mellom gruppene, MK-7 var faktisk litt høyere i osteoporose-gruppen, til tross for at man, gruppene sett under ett, fant en negativ korrelasjon mellom ratio av ucOC/iOC og MK-7. Dette paradokset kan antyde at selv om tilstrekkelige mengder vitamin K er tilgjengelig hos diabetikere, fremmes ikke karboksyleringen av ucOC, som man kunne vente. Man kan da tenke seg at hyperglykemi kunne redusere aktiviteten av γ -glutamylkarboksylasen hos de eldre diabetikerne (166). Redusert aktivitet av dette enzymet og underkarboksylering av osteokalsin, er satt i sammenheng med utvikling av redusert bentetthet. Oppsummeringsmessig ser man også blant disse eldre diabetikerne en sammenheng mellom redusert vitamin K-status og redusert BMD, selv om mekanismene bak dette ikke er klarlagt.

Mb Crohn, vitamin K-status og BMD

Pasienter med mb. Crohn er mer utsatt enn andre for å utvikle osteoporose (153). Årsaken til dette er ikke fullstendig klarlagt, men synes å være multifaktoriell (154). Ved sykdomsaktivitet over lengre tid utvikler de fleste mangel på fettløselige vitaminer, deriblant vitamin K (155), med underkarboksylering av bl.a. osteokalsin til følge. Schoon et. al (154) målte vitamin K-status i benvev og serum, samt BMD, hos 32 pasienter med Crohns sykdom og en kontrollgruppe av 34 friske personer. For å bli inkludert måtte pasientenes sykdom være i remisjon, og maksimale tillatte dose prednisolon var 5 mg daglig. Serum vitamin K var signifikant lavere i pasientgruppen enn hos kontrollene. Pasientene hadde videre høyere verdier av "fritt" osteokalsin (tilsvarende ucOC), og lavere verdier av hydroksoapatitt-bindingskapasitet (HBC, tilsvarende karboksyliert osteokalsin). Forskjellene var signifikante sammenlignet med kontrollgruppen, hvilket indikerer lav vitamin K-status i benvevet hos pasientene. "Fritt osteokalsin" var generelt sett lavere og vitamin K høyere hos pasienter med normal BMD sammenlignet med pasienter med nedsatt BMD, men forskjellene var her ikke signifikante. Blant pasientene fant man også en invers korrelasjon mellom "fritt" osteokalsin og BMD i lumbale columna, og "fritt" osteokalsin var en uavhengig risikofaktor for lav BMD her. Tilsvarende ble ikke funnet for vitamin D. Forfatterne (154) konkluderer med at dårlig vitamin K-status er assosiert med lav BMD hos pasienter med mb. Crohn, og at dette kan få implikasjoner for behandlingen.

Pasienter med Parkinsons sykdom

Hoftebrudd er svært vanlig blant pasienter med Parkinsons sykdom (167), og fall er viktigste årsak til skaden. Dette rammer særlig kvinner med sykdommen, men er også en vanlig komplikasjon blant menn. En sammenheng mellom immobilitet og osteoporose er velkjent (168), og immobilitet er sannsynligvis også en viktig årsaksfaktor i forbindelse med hoftebrudd blant pasienter med parkinson. I denne gruppen av pasienter er det også påvist bl.a. mangelfullt inntak av vitamin D, samt lite eksponering for sollys, hvilket induserer kompensatorisk hyperparathyroidisme, med redusert BMD til følge. Sato et al. (167) undersøkte en evt. assosiasjon mellom vitamin K og BMD hos disse pasientene. 62 kvinner med Parkinsons sykdom (gjennomsnittsalder 70.7 år) og 62 kontroller ble inkludert i en tverrsnittsstudie. Pasientene ble delt i to grupper ut fra funksjon (vurdert vha. Hoehn og Yahr stadier av Parkinsons sykdom), gruppe A og B, hvor gruppe A hadde best funksjon. Man målte metacarpal BMD, vitamin K₁ og K₂ i serum, intakt og underkarboksyliert osteokalsin, vitamin D og andre viktige parametere for benmetabolismen.

Gruppe B hadde signifikant lavere BMD metacarpalt, samt lavere nivå av vitamin K₁ og 25-hydroksovitamin D enn gruppe A. ucOC var høyere i gruppe B enn A. Konsentrasjonen av vitamin K₁ i serum var positivt korrelert med 25-hydroksovitamin D, og negativt med ucOC-nivået. Multiple regresjonsanalyser identifiserte ucOC sammen med Hoehn/Yahr –stadier, vitamin K₁, og 25-hydroksovitamin D som uavhengige determinanter for BMD.

Forfatterne konkluderer med at kvinner rammet av Parkinsons sykdom med nedsatt funksjon, har mangel av vitamin K₁, hvilket gir økende andel ucOC med påfølgende

reduisert BMD. Vitamin K, i tillegg til vitamin D og andre faktorer, bør være et fokus for behandlere som ivaretar omsorgen for disse pasientene.

Vitamin K-mangel og osteopeni hos eldre kvinner med Alzheimers sykdom

Sato et al. (169) har også undersøkt relasjonen mellom vitamin K-status og BMD hos kvinner med Alzheimers sykdom. 100 kvinner med Alzheimers (gjennomsnittsalder 79.8 år) ble sammenlignet med en kontrollgruppe, også bestående av 100 personer (80.6år). Pasientgruppen ble delt i to etter grad av demens (vha. MMS, score over og under 15). Kvinnene med alvorlig Alzheimer (MMS<15) hadde lavere BMI, lavere vitamin K₁, 25-hydroksyvitamin D₃, og lavere metacarpal BMD enn pasientene med mild grad av Alzheimer (MMS>15). Gruppen med alvorlig demens hadde dessuten høyere PTH og ucOC. Serum vitamin K₁ viste positiv korrelasjon med 25-hydroksyvitamin D₃ og MMS-score, og negativ korrelasjon med ucOC. Det synes derfor som om mangel av vitamin K₁ og dermed redusert mengde fullt karboksylert osteokalsin kan være assosiert med redusert BMD også hos disse pasientene. En må likevel være oppmerksom på at kvinnene i gruppen med alvorlig Alzheimer hadde lavere BMI enn de andre, hvilket kan uttrykke generell underernæring og forverret benstatus av den grunn.

Vitamin K status og benhelse hos barn med cystisk fibrose

Barn med cystisk fibrose (CF) er utsatte for å utvikle vitamin K-mangel pga. malabsorpsjon av fett, reseksjon av tarm, leversykdom og kronisk bruk av antibiotika (170). Conway et al. (170) gjorde en studie blant 106 barn med cystisk fibrose over 5 år. Man målte vitamin K₁, protrombin produsert i fravær av vitamin K (PIVKA-II), total (tOC), underkarboksylert (ucOC) og karboksylert osteokalsin (cOC), samt markører på bendannelse og benresorpsjon. BMD og benmineralinnhold (BMC) ble målt i lumbalcolumna og hele kroppen.

Det viste seg at 70% av barna hadde suboptimal vitamin K-status i form av lavt vitamin K₁ og/eller økte nivå av PIVKA-II. Vitamin K₁ var negativt korrelert med ucOC, men var ikke assosiert med andre markører på turnover av ben eller BMD. ucOC var korrelert med markører på benturnover, og disse viste på sin side negativ korrelasjon med BMD og BMC hos barna. Derimot var det ingen signifikant sammenheng mellom cOC eller ucOC og BMD. Man kunne altså ikke påvise noen sammenheng mellom vitamin K-mangel og lav benmasse.

Mulige confoundere kan spille inn i resultatene, man kan nevne inntak av vitamin K de siste 24 timene, som sterkt påvirker vitamin K-nivået i serum (fyllokinon) (109,125). Hos 33% av barna var dessuten vitamin K₁ så lavt at det ikke var målbart, slik at man mistet statistisk kraft til å kunne påvise en evt. assosiasjon. Likevel kan man på grunnlag av funnene se for seg at vitamin K-mangel, gjennom underkarboksylering av osteokalsin, kan forstyrre balansen mellom bendannelse og –resorpsjon.

Vitamin K-status, BMD og frakturrisiko

Som her vist, har man relativt omfattende evidens for en assosiasjon mellom biokjemisk vitamin K-mangel, redusert BMD og økt risiko for frakturer. Dette gjelder ikke bare

postmenopausale kvinner og eldre menn, men også spesielle sykdomsgrupper. Et betydelig ankepunkt mot epidemiologiske studier av tilsvarende design som disse, er at de ikke vil kunne skille mellom isolert vitamin K-mangel og generell underernæring i populasjonene. Dette medfører at man ikke sikkert kan si hva som skyldes vitamin K-mangel, og hva som skyldes mangel av andre viktige næringsstoffer, i forhold til benhelsen (60). Et virkemiddel for å komme dette problemet til livs, er å estimere vitamin K-inntaket hos forsøkspersonene, f.eks. vha. ulike spørreskjema.

Vitamin K-inntak og markører på vitamin K-status, bentetthet

Mange forskningsgrupper har gjort nettopp dette, de har relatert vitamin K-inntak til BMD og frakturrisiko i ulike populasjoner. Vermeer og medarbeidere (171) undersøkte vitamin K-inntaket og BMD hos 148 personer. Andelen (10%) med lavest BMD hadde signifikant lavere vitamin K-inntak enn de 10% i gruppen med høyest BMD (161 vs. 217 µg vitamin K/d). Dette bekrefter inntrykket fra andre epidemiologiske studier, og setter inntak av vitamin K i sammenheng med BMD. To store, prospektive kohortstudier har gått nærmere inn på dette feltet, ”Framingham Heart Study” og ”Nurses Health Study”.

Nurses health study

Utgangspunktet for studien (173) var den økende interessen og kunnskapen om vitamin K-avhengige proteiners relasjon til benhelse og osteoporose. Hypotesen man undersøkte var at høye inntak av vitamin K er assosiert med lavere risiko for hoftebrudd. Man benyttet kohorten allerede etablert av ”Nurses health study”, og registrerte dietten til 72327 kvinner mellom 38 og 63 år vha. spørreskjema ved baseline.

I løpet av en observasjonstid på 10 år så man 270 hoftebrudd forårsaket av milde eller moderate traumer. Man fant at de 20% av kvinnene med lavest vitamin K-inntak hadde signifikant høyere, aldersjustert relativ risiko for hoftebrudd enn de andre, slik at kvinnene med vitamin K-inntak over 109 µg/d hadde 30% lavere relativ risiko for hoftebrudd sammenlignet med kvinnene med lavere daglig inntak enn dette. Det var ingen signifikante forskjeller innad i gruppen av de 80% med høyest vitamin K-inntak. Inntak av salat, den viktigste kilden til vitamin K i studien, en eller flere ganger pr. dag, reduserte dessuten risikoen for hoftebrudd sammenlignet med de som spiste salat en eller færre ganger pr. uke. Ut fra dette kan man slutte at lave inntak av vitamin K øker risiko for hoftebrudd hos kvinner, med den følge at anbefalt vitamin K-inntak ikke bare bør sørge for tilstrekkelig hemostase, men også sikre optimal vitamin K-tilførsel til benvevet. Observasjonen man gjorde, at salat har beskyttende effekt, har en åpenbar svakhet. Det er lett å tenke seg at de kvinnene som spiste mye salat, var de sunneste og mest helseopptatte forøvrig, slik at flere skjulte faktorer, i tillegg til en evt. reell vitamin K-effekt, kunne spille inn.

”Framingham heart study”

Denne studien (173) inkluderte 553 kvinner og 335 menn, eldre personer med gjennomsnittsalder 75 år. Vha. spørreskjema estimerte man mengden fyllokinon i kosten, man målte BMD i seks anatomiske lokalisasjoner ved to anledninger, med et mellomrom på 4-5 år. I tillegg kartla man apo E-genotype hos personene, for å kunne vurdere en evt. assosiasjon mellom denne og frakturrisiko. Dette fordi nivå av fyllokinon i serum er avhengig av apo E-genotype (22).

Observasjonstiden var 7 år, og i denne perioden så man 36 (6,46%) hoftebrudd blant kvinnene, 8 (2,34%) blant mennene. De 25% av gruppen med høyest daglig vitamin K-inntak (median 254 µg) hadde signifikant lavere (65%) korrigert relativ risiko (0.35; 95% CI:0.13, 0.94) for hoftebrudd enn de 25% med lavest inntak (56µg/d). I denne studien, i motsetning til ”Nurses health study”, hvor man ikke fant forskjeller blant kvinnene med noe høyere inntak, så man dessuten en signifikant trend mot lavere insidens av hoftebrudd med økende fyllokinon-inntak. Forskjellen mellom studiene kan, iflg. forfatterne her, skyldes at ”Framingham heart study” hadde større variasjon i inntak av fyllokinon, fra 56 til 242µg/d, mot 109-242 µg i ”Nurses health study”, slik at førstnevnte studie hadde større styrke til å oppdage forskjeller innad blant de med høyest inntak enn sistnevnte. Det ble ikke påvist noen sammenheng mellom inntak av vitamin K og BMD i dette materialet. Tilsvarende var det ingen sammenheng mellom apo E-genotype, fyllokinon-inntak og BMD eller hoftefraktur i gruppen.

Tidligere epidemiologiske undersøkelser som har satt søkelyset på sammenhengen mellom vitamin K-inntak og frakturrisiko, har som nevnt blitt kritisert for den mulige confounder-effekten av generell dårlig ernæringsstatus. I denne studien og ”Nurses Health Study” har man korrigert for inntak av vitamin D, kalsium og totalt energiinntak i analysen.

Disse to store studiene (172,173) indikerer at risiko for hoftebrudd er størst hos de med lavest inntak av vitamin K. Derimot fant man ingen assosiasjon mellom vitamin K-inntak og BMD verken ved tverrsnitts- eller longitudinelle undersøkelser i den opprinnelige studien fra ”Framingham heart study”-kohorten. En evt. sammenheng kan ha blitt oversett pga. mulige svakheter ved spørreskjemaet, kanskje også fordi de inndelte gruppene lå for tett mot hverandre i fyllokinon-inntak, kun 50 µg/d skilte dem, slik at evt. forskjeller ble for små til å kunne oppdages. Verdien av spørreskjema reduseres dessuten ved risiko for recall bias, og fordi det i hovedsak registrerer inntaket av vitamin K den siste tiden, ikke inntaket av vitamin K gjennom hele livet (109). Gjennomsnittsalderen i kohorten var dessuten høy (75 år), og det er ikke dermed sagt at de hadde samme vitamin K-inntak ved undersøkelsestidspunktet som i voksenlivet for øvrig (se Framingham offspring). Videre utgjorde undersøkelsesgruppen 888 personer, som kan ha vært for lite til å påvise statistisk signifikante forskjeller i BMD. Alle disse forholdene kan ha maskert en evt. assosiasjon mellom inntaket av vitamin K og BMD, men selvsagt kan det være slik at det ikke finnes noen sammenheng mellom disse to.

”Framingham Offspring Study”

”Framingham Offspring Study” var en tverrsnittsstudie hvor man gjorde videre undersøkelser av relasjonen mellom vitamin K og BMD. (174). 2591 personer ble inkludert (1112 menn, 1479 kvinner, gjennomsnittsalder 59 år), man målte BMD i

trochanter femoris og lumbalcolumna, registrerte inntak av vitamin K vha. spørreskjema, og kartla en del andre faktorer som alder, BMI, røyking, alkohol, fysisk aktivitet, menopausal status og evt. østrogen-tilskudd. Blant kvinnene fant man at de 25% med lavest inntak av vitamin K (median 70µg/d) hadde signifikant lavere BMD i trochanter og lumbalcolumna enn de 25% med høyest inntak (median 309µg/d), selv etter at man hadde korrigert for evt. confoundere. Blant mennene fant man ingen signifikant assosiasjon, på samme vis som i tidligere studier. Ut fra det man fant i den opprinnelige "Framingham-studien", kunne man tro at vitamin K beskytter mot hoftebrudd uavhengig av BMD. Denne studien gir derimot inntrykk av at vitamin K likevel ikke beskytter uavhengig av BMD. Forfatterne selv er usikre på hvordan disse resultatene skal tolkes, av den grunn at selv om man korrigerer for andre faktorer innen bl.a. ernæring som påvirker BMD, vil man ikke kunne unngå alle confoundere. F. eks. vil et kosthold rikt på kilder til vitamin K, slik som grønne bladgrønnsaker, ofte bety en for øvrig sunn livsstil, med positiv innvirkning på benhelse.

En tredje studie utgått fra Framingham-materialet (175) undersøkte forholdet mellom biokjemiske mål på vitamin K-status og BMD hos menn og kvinner i forskjellige aldre. Vitamin K-status ble definert ut fra to variabler, fyllokinon i plasma, en indikator på inntaket av fyllokinon den siste tiden, og serum prosent ucOC (%ucOC), som er et sensitivt mål på tilgjengeligheten av vitamin K i benvevet. I tillegg ble BMD målt i hoften (collum og trochanter femoris) og lumbalcolumna (L2-L4). Deltagerne i studien ble delt i fire grupper: menn (n = 741), premenopausale kvinner (N = 170), postmenopausale med (n = 269) og uten østrogen-tilskudd (n = 424). Man fant at fyllokinon i plasma var positivt korrelert med konsentrasjonen av fastende triglyserider hos menn og begge gruppene av postmenopausale kvinner, hos premenopausale kvinner kun en nonsignifikant trend. Postmenopausale kvinner uten østrogen-tilskudd hadde høyere gjennomsnittlig %ucOC (23,5%) enn de andre gruppene (14,3 – 17,6%). Plasma fyllokinon og %ucOC viste ingen korrelasjon hos menn eller premenopausale kvinner, men var signifikant, inverst korrelert hos postmenopausale kvinner. Blant mennene fant man videre at lave nivå av fyllokinon og høy %ucOC var assosiert med lav BMD i hoften. I de to gruppene bestående av premenopausale og postmenopausale kvinner med østrogen-tilskudd, fant man ingen signifikante assosiasjoner mellom fyllokinon, %ucOC eller BMD. Hos postmenopausale kvinner uten østrogen-tilskudd var det en signifikant sammenheng mellom fyllokinon og BMD i columna, og en nonsignifikant invers assosiasjon mellom %ucOC og BMD samme sted. På grunnlag av dette konkluderer forfatterne med en mulig protektiv rolle for vitamin K i skjelettet hos menn. Hos kvinnene er forholdene mer kompliserte, hvor vitamin K synes å ha beskyttende egenskaper for benhelsen etter menopausen.

Noe forvirrende er det faktum at denne studien (175) viste en positiv korrelasjon mellom fyllokinon og BMD spinalt, men ingen slik sammenheng i hofta.. Kanai et al. (149) fant derimot at lave nivå av fyllokinon var assosiert med BMD i hofta, mens Szulc og medarbeidere (158) påviste en invers korrelasjon mellom høye verdier av ucOC og lav BMD i hofta. En klinisk, placebo-kontrollert studie (176) viste at tilskudd av fyllokinon, kalsium og vitamin D sammen ga signifikant reduksjon i bentapet i collum femoris, i motsetning til tilskudd av kalsium og vitamin D alene. Her fant man dog ingen effekt av fyllokinon på bentapet i columna, i motsetning til assosiasjonen man fant i "Framingham offspring"-studien (175). Av denne grunn er det nødvendig med flere kliniske studier før

man konkluderer med noe som helst i forhold til med hvilken evne fyllokinon-tilskudd reduserer bentap hos aldrende.

Vitamin K-status og østrogen i forhold til benhelse

Østrogenstatus og dens betydning for rollen til vitamin K i benmetabolismen, har ikke vært studert systematisk. Det er vist at sirkulerende osteokalsin øker med alderen hos kvinner (164), hvilket indikerer en økning i turnover av ben (177), særlig etter menopausen. Plantalech et al. (97) undersøkte hvorvidt denne økningen også er assosiert med redusert karboksylering av osteokalsin, og målte derfor total (tOC) og nonkarboksylert osteokalsin (ucOC) i serum hos 72 kvinner i alle aldre, 22 premenopausale, 20 tidlige postmenopausale og 30 eldre kvinner. tOC var også her signifikant økt hos de to gruppene av postmenopausale kvinner. ucOC var lett økt hos de tidlige postmenopausale, og markert elevert blant de eldre kvinnene. Ut fra dette fant man også at karboksylert osteokalsin var økt hos de postmenopausale kvinnene, kun signifikant dog hos de tidlige postmenopausale. Likevel, den viktigste observasjonen i studien var at ucOC øker gradvis med alderen etter menopausen.

Knäpen et al. fant i en studie signifikant, invers assosiasjon mellom %ucOC og BMD i hoften kun de første 10 år etter menopausen (164). I "Nurses health study" (172) var høyt inntak av fyllokinon forbundet med redusert risiko for hoftebrudd kun blant postmenopausale kvinner som ikke tok østrogen-tilskudd. Flere studier, inkl. "Framingham Heart Study" (173), har beskrevet at østrogenbruk reduserer bentapet hos postmenopausale kvinner (178, 179). Booth et al. (175) foreslår derfor at østrogenbruk maskerer evt. positive effekter de enkelte nutrienter, som vitamin K, måtte ha på bentettheten.

Eldre i institusjon og vitamin K-inntak

To studier, utført av henholdsvis Tse (180) og Simonen et al. (181), sammenlignet eldre som bodde i institusjon med jevnaldrende som klarte seg hjemme. Tse inkluderte 43 menn og 57 kvinner (gjennomsnittlig alder 81 år) og en kontrollgruppe på 88 personer (71.5 år), og registrerte kosten til disse retrospektivt vha. spørreskjema mtp. vitamin K-inntak. De institusjonaliserte i studiene hadde lavere inntak av vitamin K, og hos disse var inntaket negativt korrelert med alder, og positivt korrelert med vekten. Samtidig hadde disse større risiko for hoftebrudd enn de som bodde hjemme.

Vitamin K₁ og BMD, frakturrisiko i Skandinavia

En dansk gruppe, Rejnmark et al. (182), har relativt nylig publisert et arbeid blant perimenopausale og tidlige postmenopausale kvinner. Vha. tverrsnitts- og prospektivt design, undersøkte de sammenhengen mellom inntak av vitamin K₁ i kosten og BMD, samt risiko for brudd i en stor kohort. 2016 perimenopausale kvinner i alderen 43-58 år ble inkludert. Eksklusjons-kriterier var HRT før baseline, osteoporose, glukokortikoid-behandling samlet mer 6 mnd. i løpet av livet, cancersykdom, tidligere sykehusinnleggelse pga. rusmisbruk, kronisk sykdom hvis nylig diagnostisert eller dårlig kontrollert. Kvinnene kunne velge en av to armer i studien, den ene besto i å la seg

randomisere til HRT eller ingen behandling, den andre var non-randomisert, hvor kvinnene selv valgte HRT eller ingen behandling. Ved baseline og oppfølgingskonsultasjonene (5 og 10 år) gjennomgikk alle deltagerne klinisk undersøkelse og intervju, for å kartlegge risiko- og prognostiske faktorer for osteoporose (alder, menopausal alder, fysisk aktivitet, tidl. sykdommer inkludert gynekologisk anamnese, medikamentbruk, bruk av vitamintilskudd, alkohol og tobakk mm.), samtidig som kosten ble registrert vha. spørreskjema (4-7 dagers skjema) og intervju med dietetiker. Frakturer ble registrert, verifisert radiologisk, vertebrale brudd var også inkludert. BMD ble målt i lumbalcolumna (L2-L4) og collum femoris.

I løpet av 10 års observasjonstid observerte man 403 frakturer hos 360 kvinner i populasjonen, dvs. 43 kvinner fikk to brudd. For hvert kasus ble det funnet fire kontrollpersoner fra populasjonen uten brudd, disse matched kasuset i forhold til HRT eller ikke. Omkring 50% av kvinnene i studien fikk HRT ved baseline.

Gjennomsnittlig vitamin K₁-inntak blant kvinnene var 67 µg/d ved baseline, 60 µg/d etter 5 år. Det ble ikke observert noen signifikant korrelasjon mellom inntak av vitamin K₁ og BMD verken lumbalt eller i collum femoris. Det var heller ingen signifikante forskjeller i BMD mellom de 5% med lavest inntak (< 24.5 µg/d) og de 5% med høyest inntak (> 209 µg/d), verken ved baseline eller etter fem år. Det var heller ingen assosiasjon mellom vitamin K-inntak og risiko for fraktur.

Et viktig poeng ved denne studien i forhold til andre studier som har funnet en assosiasjon mellom vitamin K-inntak og BMD, frakturrisiko, er at man her fant mye lavere gjennomsnittlige vitamin K-inntak enn de andre (gjennomsnitt ved baseline 67 µg/d). Studier fra USA (Framingham heart study, Nurses health study) har hatt tall omkring 150-170 µg/d. Dette kan nok skyldes reelle forskjeller i kosten, men må, i alle fall delvis, relateres til metodologiske forskjeller mellom studiene. Denne observerte forskjellen i gjennomsnittlig inntak kan ha bidratt til å gi forskjellige resultater i studiene. En begrensning ved den danske undersøkelsen, er at omkring 50% av kvinnene fikk østrogen tilskudd. Østrogen har effekter på ben, og kan derfor ha bidratt til å maskere evt. konsekvenser av vitamin K for benvevet i populasjonen. Forfatterne konkluderer med at mer forskning på dette feltet er nødvendig, da andre studier, i motsetning til denne, har vist assosiasjon mellom vitamin K og benhelse.

Bestemte matvarer og benhelse

Det synes som om matvarer rike på vitamin K kan bidra positivt mtp. benhelse. I "Nurses health study" (172) fant man som nevnt at inntak av salat, som er en viktig kilde til vitamin K, var inverst assosiert med risiko for hoftebrudd.

Natto er et fermentert soyaprodukt mye brukt i japansk kosthold. Det inneholder mye MK-7, og er særlig mye brukt i de østre delene av landet, mindre i vest. Samtidig har Øst-Japan lavere frekvens av hoftebrudd enn de vestlige områdene. Kaneki et al. (183) undersøkte inntaket av natto hos 74 postmenopausale kvinner i Japan, og sammenholdt dette med insidens av hoftebrudd i gruppen. Inntak av natto viste seg å være assosiert med markert høyere nivå av MK-7 i serum, og inverst korrelert med frekvens av hoftebrudd. Ut fra dette ble det foreslått at den geografiske forskjellen i insidens av hoftebrudd i Japan kunne skyldes høyere inntak av natto i øst enn i vest.

Vitamin K og benstatus hos barn

Etter hvert som man har fått økende kunnskap om årsaksforholdene bak osteoporose, har man blitt oppmerksom på at det å oppnå tilstrekkelig benmasse i løpet av unge år kan begrense konsekvensene av aldersrelatert bentap senere i livet, og dermed gi redusert risiko for osteoporotiske frakturer. Med bakgrunn i den økende erkjennelsen om at vitamin K er av betydning for benhelsen, gjorde Kalkwarf et al. (184) en studie hvor de ønsket å undersøke om inntaket av fyllokinon og biokjemiske markører på vitamin K-status er relatert til BMD eller indikatorer på bendannelse og –resorpsjon hos unge jenter. 245 friske jenter i alderen 3-16 år ble inkludert. Ved baseline registrerte man vitamin K-status, i form av fyllokinon i plasma og %ucOC, og andre markører på benmetabolismen. BMD og inntak av vitamin K (spørreskjema) ble målt en gang årlig over fire år, i tillegg registrerte man faktorer som fysisk aktivitet, pubertal utvikling mm., som kunne tenkes å spille inn på variablene.

Hos disse jentene fant man ingen assosiasjon mellom inntaket av fyllokinon (median 45 µg/d) og BMD eller markører på turnover av ben. God vitamin K-status (høy fyllokinon, lav %ucOC) var forbundet med lavere benresorpsjon og –dannelse. Fyllokinon i plasma var inverst korrelert med osteokalsin og NTx, og %ucOC var positivt korrelert med konsentrasjonene av NTx og benspesifikt ALP. I løpet av fireårsperioden så man derimot ingen forbindelse mellom målene på vitamin K-status og BMD.

Forfatterne diskuterer flere årsaker til at man ikke så noen assosiasjon mellom fyllokinoninntaket og vitamin K-status, bl.a. at fyllokinon i plasma endres raskt etter inntak, og har kort halveringstid (1-3 dager), i tillegg til at inntaket av fyllokinon varierer kraftig fra dag til dag. Jentenes inntak av fyllokinon ble vurdert på grunnlag av registreringer av dietten over bare tre dager, slik at bildet kan ha blitt forstyrret av dette. På samme måte som hos andre grupper var det også hos disse unge jentene betydelig underkarboksylering av osteokalsin. Dette antyder at man kan ha nytte av å øke inntaket av fyllokinon også hos denne gruppen, selv om man ikke her klarte å påvise noen assosiasjon mellom inntak av fyllokinon og BMD. Forfatterne konkluderer med at randomiserte kliniske studier må utføres for å kunne si noe sikkert om fyllokinons rolle for bendannelse og –resorpsjon, og dermed benmasse, hos barn.

Vitamin K-supplement og benhelse

Interessen for vitamin K og vitamin K-avhengige proteiner har økt de senere årene. Flere studier, som vist, har pekt på sammenhengen mellom dårlig vitamin K-status og redusert benmineralitet (BMD), samt økt risiko for brudd. Som en naturlig forlengelse av dette har det kommet studier som har undersøkt om tilskudd av vitamin K reduserer bentapet hos bl.a. postmenopausale kvinner, og dermed reduserer insidensen av osteoporotiske frakturer. Japanske forskningsgrupper var tidlig ute på dette feltet, de har særlig konsentrert seg om effekten av vitamin K₂-tilskudd, som i en tid har vært etablert behandling for osteoporose i Japan. Europeiske forskere har i hovedsak undersøkt relasjonen mellom vitamin K₁-tilskudd og osteokalsin, og andre markører på benturnover. Det foreligger nå også prospektive undersøkelser som viser effekter av vitamin K₁-tilskudd på BMD.

Vitamin K-intervensjonsstudier og underkarboksylert osteokalsin

Plantalech og medarbeidere (185) var blant de første som undersøkte effekten av vitamin K₁-tilskudd på karboksyleringsgraden av osteokalsin. Allerede i 1990 rapporterte de at 1mg vitamin K₁ gitt til 30 eldre kvinner hadde medført signifikant reduksjon i ucOC.

Sokoll et al. (186) lot ni friske forsøkspersoner i alderen 20-33 år over to perioder, begge 15 dager, få en diett inneholdende 100 µg fyllokinon daglig. Fem påfølgende dager i den ene perioden ble så mengden av fyllokinon økt til 420 µg/d. Konsentrasjonen av totalt osteokalsin i serum ble ikke forandret i periodene, derimot økte prosentandelen av ucOC (%ucOC) gjennomsnittlig 28% på dietten med 100 µg fyllokinon ($p < 0.05$). %ucOC ble signifikant ($p = 0.0001$) redusert, gjennomsnittlig 41%, ved den supplementerte dietten (420 µg). Etter de fem dagene med store mengder fyllokinon gikk personene tilbake til en diett med 100 µg fyllokinon daglig, og da steg %ucOC igjen ($p > 0.001$). Fyllokinon i plasma viste et tilsvarende mønster, og økte signifikant ved inntak av 420 µg/d. γ -karboksyglutamat i urinen / kreatinin –ratio var uforandret i supplementperioden, men ble signifikant redusert da forsøkspersonene igjen fikk dietten med 100 µg fyllokinon daglig. Ved dette viste Sokoll at ucOC, fyllokinon i plasma og ekskresjon av γ -karboksyglutamat i urinen er sensitive markører på ernæringsstatus av vitamin K, men viste også at vitamin K-intervensjon øker karboksyleringen av osteokalsin.

Booth og medarbeidere (187) undersøkte 36 kvinner og menn, både unge (20-40 år) og gamle (60-80 år), over tre perioder à 15 dager. I disse periodene fikk forsøkspersonene en basal diett som inneholdt 100 µg/d fyllokinon, og i to av periodene var det lagt inn fem dager hvor de ble gitt enten brokkoli (377 µg/d fyllokinon) eller fyllokinon-tilsatt olje (417 µg/d). I løpet av dagene med høyt inntak av fyllokinon, ble det målt signifikant høyere konsentrasjoner av fyllokinon i plasma hos alle, samt signifikant lavere %ucOC. Ekskresjonen av γ -karboksyglutamat i urinen viste ingen signifikant forandring gjennom periodene. Ved baseline hadde de eldre signifikant høyere nivå av fyllokinon i plasma og %ucOC, tilsvarende er rapportert også hos andre (14,96). Det ble ikke observert noen forskjell i biotilgjengelighet mellom de to fyllokinon-kildene, brokkoli eller olje. På samme måte som Sokoll et al. (186), så man altså at %ucOC responderte på tilførsel av større mengder vitamin K.

Douglas et al. (146) var også blant de første som undersøkte hvilken effekt vitamin K-tilskudd har på benmetabolismen. 20 postmenopausale kvinner med osteoporose (verifisert ved BMD-måling) og tidligere Colles fraktur, ble delt i to like store grupper. Kvinnene fikk så ut fra et cross-over design, tilskudd over 2 uker av enten 1mg vitamin K₁, 1 mg vitamin K₁ pluss 400 IU vitamin D, eller kun placebo. Tilskudd av vitamin K bedret karboksylasjonen av osteokalsin, som gjennomsnittlig økte fra 56.1% til 74.8%. Karboksylasjonsgraden man oppnådde vha. supplement, var på samme nivå som hos premenopausale kontroller (kvinner i forskningsstaben). Effekten hos de som fikk både vitamin D og K samtidig var tilsvarende som ved bare vitamin K, slik at vitamin D hadde ingen tilleggseffekt på karboksylasjonen. Totalt osteokalsin økte ved tilskudd av vitamin K, og man observerte at økningen besto av karboksylert osteokalsin. Man så forøvrig ingen tegn til underkarboksylasjon av protrombin i materialet.

En populasjon bestående av 219 friske personer i alderen 18-30 år eller ≥ 65 år, fikk fyllokinon 1000 µg/d eller placebo i to uker (134). Fyllokinon, totalt osteokalsin, ucOC og markører på benturnover, ble målt før start og etter uke 1 og 2. Ved baseline var konsentrasjonen av fyllokinon i serum lavere blant de yngre enn de eldre, som forventet

utfra tidligere undersøkelser (14,96). %ucOC var høyest i gruppen av yngre menn, hvilket ikke samsvarer med hva en har funnet i andre studier, hvor %ucOC har vært høyest hos postmenopausale kvinner (59,185). Også blant kvinnene var %ucOC høyere hos de yngre, men ikke signifikant forhøyet i forhold til de eldre. Dette kan reflektere et lavt vitamin K-inntak blant de yngre forsøkspersonene, denne gruppen besto hovedsakelig av college-studenter. Forfatterne påpeker at hvis grad av osteokalsin-karboksylering har konsekvenser for hvor høy maksimal benmasse man oppnår i løpet av unge år, kan disse observasjonene være av betydning for benfysiologien. Etter tilskudd av 1000 µg fyllokinon daglig, økte fyllokinon i serum signifikant, samtidig som %ucOC ble redusert (fra 7,6% til 3,4% gjennomsnittlig), uavhengig av alder og kjønn. Forøvrig ga tilskudd reduksjon i osteokalsin, men man så ingen andre forandringer i markørene på benturnover. Forfatterne foreslår på basis av resultatene i studien at submaksimal γ -karboksylering kan bidra til høy turnover av ben, da tilførsel av fyllokinon ga reduksjon i osteokalsin, en akseptert markør på bendannelse (188). Økt turnover av ben er assosiert med raskt bentap, og slik kan vitamin K-mangel være assosiert med utvikling av osteoporose. Tilsvarende observasjoner som i denne studien er også sett i en undersøkelse utført av Booth et al. (144), hvor 15 dager med lavt vitamin K-inntak ga økt turnover av ben målt ved osteokalsin i serum og NTx i urin. Disse markørene ble så normalisert i løpet av en påfølgende periode med økt fyllokinon-inntak (200 µg/d).

En japansk gruppe (196) utførte en liten randomisert, prospektiv intervensjonsstudie blant 20 eldre osteoporotiske kvinner, som hadde gjennomgått vertebrale frakturer. Pasientene ble fordelt i to like grupper, hvorpå den ene gruppen fikk 45mg/d MK-4 og kalsium i to uker, mens kun kalsium ble gitt til kvinnene i den andre gruppen. Ved baseline var det ingen forskjeller i de målte parametrene mellom gruppene. I intervensjonsgruppen observerte man en signifikant økning av MK-4 i serum, mens MK-7 og fyllokinon var uendrede. Videre så man i denne gruppen en reduksjon av ucOC ved slutten av studien, kontrollgruppen hadde ingen slik endring. Osteokalsin i serum var stabil gjennom studien i begge grupper. Japanere konsentrerer seg i hovedsak om virkningen av vitamin K₂ i sine undersøkelser, og her ser man effekt av vitamin K₂-tilskudd på vitamin K-status, og en del interesse har rettet seg mot spørsmålet hvorvidt vitamin K₁ eller K₂ er mest potent mtp. γ -karboksylering.

Vitamin K-supplement, markører på benturnover, og kalsium i urinen

En nederlandsk gruppe har vha. flere studier bidratt med kunnskap som har kastet lys over relasjonen mellom vitamin K og benfysiologien. Knapen et al. (145) undersøkte i en studie hvilken effekt tilskudd av 1 mg vitamin K daglig har på markører for benmetabolismen. Friske kvinner ble inkludert i studien. Først fikk 145 personer tilskudd i 2 uker, siden ble det gjort placebokontrollert intervensjon i to grupper, begge bestående av 70 kvinner, over tre måneder. Blant de eldre kvinnene i studien som fikk tilskudd, så man økte nivå i serum av osteokalsin med høy affinitet for hydroksoapatitt (tilsvarer karboksyliert, eller intakt, osteokalsin, iOC), mens fraksjonen av osteokalsin med lav affinitet (ucOC) var uforandret. Blant kvinnene som fikk placebo, observerte man at ucOC/iOC-ratio steg signifikant omkring 50-årsalderen, denne forandringen kunne ikke påvises blant kvinnene som fikk tilskudd. Etter tre måneder var de vitamin K-induserte forandringene i karboksyliert osteokalsin korrelert med en endring i benspesifikk ALP,

mens ucOC var korrelert med ekskresjonen av kalsium i urinen. Blant såkalte ”fast losers” (kalsium/kreatinin-ratio > 0.5), induserte vitamin K-tilskuddet en reduksjon av kalsiumtapet på 30%. Denne vitamin K-effekten på kalsium i urinen er også påvist av andre, bl.a. av Orimo et al. (195) ved tilførsel av 90 mg vitamin K₂, og hos en gruppe maratonløpere (190).

Forfatterne formulerte ut fra resultatene at karboksylert osteokalsin (iOC) er en markør på nydannelse av ben, mens ucOC er markør på benresorpsjon. Ratio ucOC/iOC kan da benyttes som en indikator på remodelering av ben.

Knapen et al. har også i et annet arbeid (59) funnet effekt av vitamin K på kalsiumtapet i urinen. 50 friske postmenopausale kvinner (alder 55-75 år) og 50 friske premenopausale kontroller (25-40 år) ble rekruttert til en studie, og gitt 1mg vitamin K daglig i to uker. Ved baseline hadde osteokalsin hos de postmenopausale kvinnene opptil 50% lavere bindingskapasitet for hydroksyapatitt enn hos de premenopausale kontrollene. Denne forskjellen ble normalisert ved vitamin K-tilskudd hos de eldre kvinnene, tilførselen hadde ingen effekt i den yngre gruppen. Videre fant man i gruppen av postmenopausale at vitamin K-tilskudd ga reduksjon av kalsiumtapet i urinen, særlig hos ”fast losers”, og samtidig så man en parallell reduksjon i ekskresjonen av hydroksyprolin i urinen. Dette gir også en indikasjon på at vitamin K kanskje spiller en rolle i tap av benmasse ved postmenopausal osteoporose.

Vitamin K-supplement i to spesielle grupper

Vektløshet inducerer bentap via mekanismer som er lite kjent. En gruppe (189) undersøkte markører på benturnover hos to kosmonauter, som var hhv. 21 og 180 dager i rommet. Målinger før, underveis og etter romferdene, viste forandringer i div. av disse markørene, samtidig økte ucOC raskt hos begge romfarene etter avreise. Kosmonauten som var 180 dager i rommet, fikk tilskudd av 1mg vitamin K underveis, med den følge at karboksylasjonen av osteokalsin ble normalisert. Forfatterens konkluderte med at metabolismen eller virkningen til vitamin K, samt også turnover av ben, er forandret ved romferd.

Hos postmenopausale kvinner har man sett at økt vitamin K-inntak kan medføre økning av markører i serum for nydannelse av ben, reduksjon av markører for benresorpsjon og reduksjon av kalsiumtap i urinen (59). Craciun et al. (190) gjorde en studie blant 8 kvinnelige maratonløpere på elitenivå (20-44år), på den bakgrunn at hard trening kan medføre lave østrogen-nivå og amenorè. En konsekvens av sistnevnte er redusert maksimal benmasse og raskt bentap. Av de åtte utøverne hadde fire hatt amenorè i mer enn et år, mens de andre fire brukte p-piller. Kvinnene mottok så 10mg vitamin K daglig i en måned, og div. benmarkører ble målt før og etter perioden. Ved baseline hadde de fire utøverne med amenorè biokjemisk vitamin K-mangel, i form av at sirkulerende osteokalsin hadde redusert bindingkapasitet for kalsium (økt ucOC). Tilførsel av vitamin K medførte redusert ucOC hos alle kvinnene, samt 15-20% økning i markørene for bendannelse og 20-25% reduksjon i markørene for benresorpsjon. Ekskresjon av kalsium i urinen ble redusert med 21%. Disse resultatene indikerer tydelig at tilførsel av vitamin K gir bedret balanse mellom nydannelse og resorpsjon av ben.

Tilskudd av vitamin K og vitamin D

Schaafsma et al. (191) rekrutterte postmenopausale kvinner omkring 60 år til en randomisert studie, for å undersøke hvorvidt vitamin D- og K-status hos disse kunne forbedres. Kvinnene ble delt i to grupper, avhengig av om de hadde normal ($n = 96$) eller redusert ($n = 45$) BMD i lumbalcolumna. Kvinnene fikk så tilskudd i 1 år av enten 350-400 IU vitamin D₃ (som inkluderte 1000 mg kalsium), 80 µg vitamin K₁, både vitamin K₁ og D₃ (og kalsium), eller placebo. 80 µg vitamin K₁ er en relativt beskjeden mengde sammenlignet med hva som har blitt brukt i andre studier. 25-hydroksyvitamin D og prosent karboksylert osteokalsin (%carbOC) ble målt ved baseline, og etter 3, 6 og 12 mnd. Gruppen av kvinner med normal BMD fikk de ulike tilskuddene dobbelt-blindt, mens den andre gruppen ble administrert åpent.

Ved baseline fant man at %carbOC var positivt korrelert med BMD lumbalt og i collum femoris. Ut fra dette hadde kvinnene med lav BMD lavere %carbOC ved baseline enn kvinnene med normale verdier. 93% av kvinnene med lav, og 55% av de med normal BMD, hadde suboptimale nivå av %carbOC ved baseline sammenlignet med verdier for premenopausale kvinner (146,160).

Forskjellen i %carbOC mellom gruppene forsvant etter 1 år hos de som fikk supplement med vitamin K₁, og dette tilskuddet førte forøvrig nivået av karboksylert osteokalsin tilbake til premenopausale nivå. Hos kvinner med lav BMD ga ikke bare tilskudd av vitamin K₁ økt %carbOC, de som fikk vitamin D og kalsium hadde også økning. Det har tidligere blitt foreslått at vitamin D spiller en rolle for karboksyleringen av osteokalsin, men mekanismen er ikke kjent (192, 193). Det kan heller ikke utelukkes at kalsium spiller en rolle i denne sammenhengen. Tilskudd av vitamin D viste seg gunstig for vitamin D-status, og bidro til å hindre fall i 25-hydroksyvitamin D gjennom vinteren hos kvinnene med normal BMD, men ikke i samme grad hos kvinnene i gruppen med redusert BMD. Forfatterne konkluderer med at tilskudd av 80 µg vitamin K₁ og 700-800 IU vitamin D (mer enn i studien) daglig er å anbefale til postmenopausale kvinner, for å sikre benhelsen i denne gruppen.

En japansk studie (194) sammenlignet effekten av tilskudd med vitamin K og/eller vitamin D på ucOC og iOC hos pasienter med osteoporose og friske kontrollpersoner. Det ble inkludert 91 friske kvinner, hvorav 43 pre- og 48 postmenopausale. 113 kvinner med osteoporose deltok i studien, 89 med vertebrale frakturer og 24 med hoftebrudd. Kvinnene fikk så i løpet av 4 uker tilskudd av enten 45 mg vitamin K₂, 1 µg 1α-hydroksyvitamin D₃, eller begge. Ved baseline var iOC signifikant høyere blant de friske postmenopausale kvinnene og osteoporotikerne med vertebrale brudd, enn i gruppene med friske premenopausale kvinner og kvinner med hoftebrudd. ucOC viste en ikke-signifikant trend mot å være høyere i gruppene bestående av postmenopausale kvinner og pasienter med brudd, enn i gruppen med premenopausale. ucOC/iOC-ratio var signifikant høyere hos pasientene med hoftebrudd sammenlignet med kvinnene med vertebrale brudd og de postmenopausale. Etter fire uker med tilskudd, gikk ucOC signifikant ned hos de som fikk vitamin K og vitamin K + vitamin D. Hos de som fikk vitamin D alene så man ingen signifikante forandringer i konsentrasjonen av ucOC. iOC økte non-signifikant i gruppene som fikk tilskudd annet enn placebo. Vitamin K og vitamin K + D ga signifikant reduksjon i ucOC/iOC-ratio. Forfatterne kunne på grunnlag av resultatene slutte at ucOC/iOC-ratio var høyere hos pasientene med hoftebrudd enn hos de friske postmenopausale kvinnene, hvilket skyldtes at iOC var lavere blant

kvinnene med hoftebrudd. ucOC var lik i de to gruppene. De foreslo at dette skyldtes at hoftebrudd-pasientene hadde lav osteoblast-aktivitet og redusert karboksylasjon av osteokalsin, hvilket indirekte indikerer mangel av både vitamin D og K hos pasienter med denne lidelsen. Videre fant man i denne studien ingen additiv effekt av vitamin D, i tillegg til effekten av vitamin K, på karboksyleringsgraden av osteokalsin.

Intervensjonsstudier – effekt av vitamin K på BMD og frakturnrate

Japanerne har siden tidlig på 1990-tallet interessert seg for vitamin Ks rolle i patofysiologien bak osteoporose. Ekstremt høye doser av MK-4 (vitamin K₂), 45-90 mg/d, har inngått i behandlingen av postmenopausal osteoporose i flere år allerede, uten alvorlige komplikasjoner. Spørsmålet blir om resultatene fra japanske studier kan reproduseres i europeiske populasjoner, og dermed medføre forandret praksis i Vesten. En kan riktignok se for seg at predisposisjonen for osteoporose er en annen for japanere enn europeere. Hereditære faktorer er åpenbart forskjellige mellom folkeslagene, også livsstilsfaktorene er annerledes, f. eks. mtp. inntak av kalsium (109).

Europeiske intervensjonsstudier har tidligere hovedsakelig undersøkt hvilken effekt vitamin K-tilskudd har på biokjemiske markører på vitamin K-status og benturnover. Da underkarboksylering av osteokalsin i flere undersøkelser har blitt korrelert med redusert BMD og økt risiko for brudd, vil det være svært interessant å se om tilskudd av vitamin K kan ha effekt på BMD og harde endepunkt, som osteoporotiske brudd.

”Maastricht osteostudy”

I den såkalte ”Maastricht osteostudy” (176), undersøkte Braam et al. hvilken effekt tilskudd av vitamin D og mineraler har på postmenopausal bentap, samt om vitamin K₁-tilskudd har additiv effekt. Studien var prospektiv, dobbelt-blind og randomisert. 181 postmenopausale kvinner i alderen 50-60 år ble inkludert, og i løpet av en behandlingsperiode på tre år fikk de enten placebo eller tilskudd bestående av 500mg kalsium, 150mg magnesium, 10 mg sink og 8 µg vitamin D₃, eller 1mg vitamin K₁ i tillegg til det allerede nevnte tilskuddet. 150 kvinner fullførte behandlingsperioden.

I placebogruppen gikk benmineraltettheten (BMD) målt i collum femoris jevnt nedover, som forventet. I intervensjonsgruppene var BMD samme sted konstant det første året, men to og tre år etter behandlingsstart, hadde BMD her blitt signifikant redusert også hos disse. Reduksjonen i BMD var dog signifikant lavere i gruppen som fikk fullt tilskudd (mineraler, vitamin K og D) sammenlignet med de andre to gruppene. Gruppen som fikk fullt tilskudd (også vitamin K) hadde siden baseline et tap i BMD som var 1,7 % (95% CI: 0.35-3.44) mindre enn hva man fant i placebogruppen, og 1,3% (95% CI: 0.1-3.41) mindre enn i den andre tilskuddsgruppen (uten vitamin K). Forskjellen i tap i løpet av tre år av BMD målt i collum femoris, var ikke signifikant mellom placebogruppen og tilskuddsgruppen uten vitamin K.

BMD ble også målt i lumbalcolumna. Gruppen som fikk mineraler + vitamin D hadde stabil BMD det første året, mens de andre to gruppene hadde signifikant reduksjon. Etter tre år var tapet i placebogruppen størst, gruppen som fikk tilskudd inkludert vitamin K inntok en mellomstilling, mens kvinnene som fikk mineraler + vitamin D hadde minst tap

av BMD lumbalt, men forskjellene mellom gruppene var ikke signifikante. Ingen av tilskuddene så altså ut til å ha positiv effekt på benmineraltettheten i columna.

For øvrig fant man signifikant reduksjon av ucOC i serum hos de som fikk vitamin K. De første to årene av behandlingstiden viste markørene på benmetabolismen en ikke-signifikant, nedadgående trend. Denne effekten gikk tilbake etter 36 måneder, men i mindre grad hos kvinnene som fikk fullt tilskudd (inkl. vitamin K), om dette har klinisk relevans er usikkert.

Denne studien har vist at tilskudd av vitamin K₁, i tillegg til mineraler og vitamin D, kan beskytte fullstendig mot postmenopausalt bentap i lårhalsen i et år. Etter det første året gir tilskuddet partiell beskyttelse, og etter tre år kan man se ca. 35% reduksjon av bentapet i lårhalsen ved tilskudd sammenlignet med placebo. Samtidig så man ikke denne effekten på bentapet i columna, hvilket forfatterne mener må tolkes med forsiktighet, da det foreligger flere faktorer som forstyrrer DXA-målinger i ryggraden. Hvis effektene man observerte i studien forsetter også ved behandling over lang tid, kan livslangt tilskudd tenkes å utsette frakturer opptil 10 år (176).

”The Dundee Bones and Vitamins Intervention Study” (D-BAVIS)

D-BAVIS (197), en intervensjonsstudie som gikk over to år i Skottland, satte søkelyset på om vitamin K₁ og/eller vitamin D samt kalsium, har positiv innvirkning på BMD i friske, eldre kvinner, og om vitamin K₁ og D har synergisk effekt på dette. Man inkluderte 244 kvinner mellom 60-87 år, og disse ble randomisert til en av fire grupper. Gruppe 1 fikk placebo, gruppe 2 vitamin K₁ 200µg/d, gruppe 3 vitamin D₃ 10 µg/dK₁ og kalsium 1g/d, mens gruppe 4 fikk alle tilskuddene. Man målte BMD og div. markører i serum hver 6.mnd.

Ved baseline fant man tegn til suboptimal vitamin K- og D-status. Vitamin K- og vitamin D-tilskudd bedret hhv. karboksylert osteokalsin (cOC) og 25-OH-vitamin D i serum, hvilket indikerer bedret vitamin-status. Andre studier har vist en mulig bedret karboksylering av osteokalsin ved vitamin D-tilskudd, dette ble ikke sett her. Totalt osteokalsin økte tilsvarende mye i alle gruppene. NTx og benspesifikt ALP var uforandret i gruppene i hele perioden.

DXA-målinger i ultra-distale radius viste signifikant økning i både BMD og benmineralinnhold (BMC) hos gruppe 4, dvs. kvinnene som fikk vitamin D, K og kalsium. Videre så man signifikant bentap bare i midt-distale radius, mens det var intet signifikant bentap målt i hoftene; disse funnene var uavhengig av gruppetilhørighet.

Forfatterne konkluderte med at det var tegn til at vitamin D- og K-tilskudd sammen bedret BMD i ultra-distale radius, og at slik tilførsel kan være gunstig for grupper med høy risiko for osteoporose. Ultra-distale radius har for øvrig størst andel trabekulært ben av målesteden som ble brukt i studien, hvilket indikerer at type ben har betydning for virkningen av tilskuddet. Det er et poeng at mengden vitamin som ble gitt her ikke er mer enn hva man kan få inn vha. kosten.

Vitamin K₂ –intervensjonsstudier og effekt på benhelse

Mange intervensjonsstudier har undersøkt en mulig positiv effekt av vitamin K₂ på benhelsen, de fleste er utført i japanske populasjoner. Felles for nesten alle disse undersøkelsene er intervensjon med store doser vitamin K₂. Hyppigst brukt er menakinon-4 (MK-4), oftest i doser på 45 mg/d. Tilførsel av farmakologiske doser av vitamin K₂ har en tid vært etablert behandling av postmenopausal osteoporose i Japan, og så langt har det ikke vært sett alvorlige bivirkninger av denne. En omfattende gjennomgang av dette feltet går ut over denne oppgaven, men en forenklet framstilling gis her.

Vitamin K₂-tilskudd og effekt på BMD, markører på vitamin K-status

Den første intervensjonsstudien som undersøkte effekten av vitamin K på benstyrke-markører hos mennesker, ble utført blant pasienter med nyresvikt, en gruppe utsatt for økt tap av benmasse (198). 17 pasienter i hemodialyse ble gitt 45 mg/d vitamin K₂ i 12 måneder, og man observerte redusert tap av BMD målt ulike steder i skjelettet hos pasientene som fikk vitamin K, sammenlignet med placebo-gruppen.

Orimo et al. (199) fant tilsvarende i en stor, placebo-kontrollert studie blant 546 pasienter med osteoporose. Pasienter som fikk tilskudd av 45 mg/d vitamin K₂, hadde etter et år signifikant høyere BMD målt i armen enn kontrollene (2.1% økning i vitamin K-gruppen, 2.4% reduksjon i placebo-gruppen, $p < 0.001$). Effekten av vitamin K₂-supplement var større enn ved tilskudd av 1 µg/d α-hydroksyvitamin D₃. Man så derimot ingen signifikant forskjell mellom gruppene i vertebral BMD. Orimo et al. (195) forsøkte enda større doser i en annen randomisert, dobbelt-blind studie, hvor 80 pasienter med osteoporose fikk 90 mg/d vitamin K₂ eller placebo over to år. I vitamin K-gruppen økte BMD i 2. metacarp 2.2%, mens man i kontrollgruppen så en gjennomsnittlig reduksjon på 7.3% ($p < 0.05$). Samtidig ble ekskresjonen av kalsium redusert hos de som fikk vitamin K. En annen viktig observasjon i denne studien er at man ved tilskudd av 90mg/d vitamin K₂ over to år, ikke observerte noen relevante bivirkninger.

En longitudinell studie (200) undersøkte effekten av vitamin K₂-tilskudd (45mg/d) i et år på spinal BMD. 17 kvinner fikk supplement, etter et år hadde BMD hos disse økt noe (0.23% ± 0.47%), mens i kontrollgruppen (n = 19) så man reduksjon i BMD (-2.87% ± 0.51%).

Vitamin K₂-tilskudd og effekt på frakturnrate

Relasjonen mellom vitamin K₂-tilskudd og frakturnrate har også blitt undersøkt. Ishida et al. (202) fordelte 120 kvinner (46-96 år) i fem grupper, alle fikk tilskudd i et år av enten 1µg α-calcidiol, 45 mg vitamin K₂, konjugerte østrogener, etidronat eller calcitonin. I alle gruppene ble incidens av nye frakturer signifikant redusert. BMD økte også hos alle, men kun signifikant hos kvinnene som fikk østrogen. Shiraki et al. (203) gjorde et arbeid blant kvinner med osteoporose. I en studie blant 241 kvinner over to år, fikk 120 kvinner 45mg vitamin K₂ (MK-4) og kalsium daglig, mens 121 fikk kun kalsium (placebo). I løpet av observasjonstiden var det signifikant færre frakturer i vitamin K-gruppen, 14 brudd (10%) blant disse kvinnene versus 35 brudd (30%) i kalsiumgruppen. Antallet vertebrale frakturer ble særlig redusert i vitamin K₂-gruppen, kun 13 mot 30 i den andre gruppen. I

tillegg ble lumbal BMD vedlikeholdt av vitamin K₂-tilskudd, og falt kun 0.5% over to år i vitamingrouppen versus 3.3% i kontrollgruppen. I intervensjonsgruppen så man forøvrig et signifikant fall i ucOC, mens totalt osteokalsin økte i begge grupper, men signifikant mer i gruppen som fikk tilskudd. Denne økningen kan delvis skyldes økt benomsetning, men det synes mer sannsynlig at den større økningen i intervensjonsgruppen skyldtes økning i sekresjon av karboksylert osteokalsin, som dog ikke ble målt separat i denne studien. Ingen effekt av MK-4 ble sett på markørene for benresorpsjon.

Det skal forøvrig nevnes at Iwamoto et al. (204) i en liten randomisert studie blant 98 kvinner med osteoporose, fant synergistisk effekt av vitamin K og bisfosfonater mtp. å bevare BMD.

Ozuru et al. (206) ga 45 mg/d vitamin K₂ i 48 uker til 34 japanske, postmenopausale kvinner (48-82 år). Effekten av tilskuddet ble vurdert ut fra endringer i markører på bendannelse og –resorpsjon, BMD og insidens av vertebrale frakturer. Man observerte at vitamin K-tilskudd ga gradvis økning i ALP, en økning som ble signifikant etter 48 uker. Videre så man en forbigående, men signifikant, reduksjon i ekskresjonen av deoksyipyridinolin omkring fjerde uke av studien. Både total og karboksylert osteokalsin i serum økte raskt og signifikant (innen 4 uker), med en resiprok reduksjon i ucOC, disse forandringene vedvarte i hele perioden (48 uker). På den andre siden fant man ingen signifikante forandringer i lumbal BMD, dessuten oppsto kun en ny vertebral fraktur i observasjonsperioden, hos en kvinne som hadde hatt dette tidligere. Forfatterne konkluderte derfor med at vitamin K₂ muligens fremmer nydannelse av ben hos postmenopausale kvinner, i hvert fall biokjemisk sett.

Effekt av vitamin K₂-tilskudd vs effekt av vitamin D

En annen studie utført av Iwamoto et al. (201), inkluderte 92 postmenopausale kvinner mellom 55-81 år. Disse ble randomisert i en av fire grupper, hvor de over 2 år fikk enten vitamin K (45 mg/d), 1- α -hydroksyvitamin D₃ (0,75 μ g/d), en kombinasjon av vitamin D og K eller kalsium 2g/d. Tilskudd av vitamin K eller D alene ga begge signifikante økninger i BMD sammenlignet med kalsium, mens kombinasjonen av vitaminene viste synergisk effekt, med signifikant økning i lumbal BMD (1.35%).

Ushiroyama et al. (205) undersøkte, vha. en kontrollert, randomisert studie, effekten av kombinert vitamin D- og K-tilskudd på vertebral BMD hos kvinner med osteoporose. 172 kvinner med verifisert osteoporose (DEXA) ble inkludert, og fordelt i fire grupper. En gruppe fikk 45 mg/d vitamin K₂, en annen 1- α -hydroksycholecalciferol vitamin D₃, den tredje gruppen fikk både vitamin K og D, mens den fjerde fikk placebo. Behandlingen ble gitt i to år, BMD ble målt ved baseline og etter 6, 12, 18 og 24 mnd. Ulike markører på vitamin K-status og benmetabolismen ble også målt.

Man fant at kombinert terapi med vitamin K og D over 24 måneder signifikant økte BMD (4.92% \pm 7.89%) sammenlignet med baseline og med kontrollgruppen. Vitamin K₂ alene ga ikke-signifikant økning av BMD i forhold til baseline (0.135 \pm 5.44%), men BMD i denne gruppen var ved 18 og 24 mnd. signifikant større enn i kontrollgruppen. Kombinert terapi ga dessuten stimulering av både nydannelse av ben og benresorpsjon, målt ved markører for benmetabolismen. Forfatterne konkluderer med at kombinert tilskudd av vitamin K og D øker turnover av ben, fremmer bendannelse, hvilket fører til markert økning i BMD og bedret benkvalitet.

Vitamin K₂-tilskudd i spesielle grupper

Hemiplegi

Sato et al. (207) undersøkte slagpasienter, som ofte har betydelig tap av bentetthet pga. immobilisering, hyperkalsemi og vitamin D-mangel, med påfølgende benresorpsjon (207). Bentapet er oftest størst på den hemiplegiske siden av kroppen. Undersøkelsen omfattet 108 hemiplegikere, 54 fikk 45mg/d vitamin K₂ i et år, de resterende fikk placebo. BMD ble målt i 2. metacarp, og etter et år så man på den hemiplegiske siden 4.3% økning i BMD hos de som fikk vitamin K₂, mot 4.7% reduksjon i BMD hos kontrollene. På den ”friske” siden var BMD redusert hos begge grupper, hhv. 0.9% og 2.7% for vitamin K₂- og placebogruppen. Vitamin K₂ reduserte bentap pga. inaktivitet effektivt i denne gruppen.

Parkinsons sykdom

Pasienter rammet av mb. Parkinson har økt risiko for osteoporose sammenlignet med den eldre befolkningen forøvrig, dette skyldes bl.a. immobilisering og vitamin D-mangel (208). Sato et al. (209) inkluderte 108 kvinner med osteoporose og mb. Parkinson over 65 år, 54 kvinner fikk vitamin K₂ (45 mg/d) i et år, 54 fikk placebo og utgjorde kontrollgruppen. I intervensjonsgruppen så fant en hoftefraktur i løpet av perioden, sammenlignet med 10 brudd i kontrollgruppen (8 hofte-, 1 radius-, 1 ankelfraktur). Alle hoftebruddene skyldes fall, og det var ingen signifikant forskjell i antall fall mellom de to gruppene. I den ubehandlede gruppen fant man reduksjon i BMD på 4.3% ($\pm 2.5\%$), i jevnaldrende friske personer var tilsvarende tall 1.3% ($\pm 0.4\%$). I intervensjonsgruppen så man en økning i BMD ($0.9\% \pm 1.2\%$).

Prednisolon

Prednisolon gitt over tid er en viktig årsak til medikament-indusert, sekundær osteoporose (119). Yonemura et al. (210) ga i en randomisert, kontrollert prospektiv studie 20 pasienter med glomerulonefritt, som var under prednisolonbehandling, 45 mg vitamin K₂ daglig over 10 uker. Dette tilskuddet reduserte det steroidinduserte bentapet (BMD) i lumbalcolumna signifikant.

I en større studie (211) ble 60 glomerulonefritt-pasienter, som fikk prednisolon, randomisert i fire grupper. En gruppe fikk 1- α -hydroksyvitamin D₃ (0.5 μ g/d), en annen fikk vitamin K₂ (45mg/d), den tredje gruppen fikk både vitamin K og D, mens den siste gruppen utgjorde kontrollene. Samtidig fikk alle som nevnt prednisolon, 0.7mg/kg/d, opptil 40mg/d i fire uker, som de påfølgende fire ukene ble redusert til 25mg/d. Studien gikk over åtte uker. I kontrollgruppen fant man en signifikant reduksjon i lumbal BMD fra baseline på 3.19% ($\pm 1.11\%$), som var signifikant større sammenlignet med reduksjonene i gruppene som fikk vitamin D, vitamin K, og kombinasjon av vitamin D og K (hhv. $0.28\% \pm 1.3\%$, $0.5\% \pm 1.17\%$, $0.44\% \pm 1.36\%$).

I en liten studie blant barn (212) behandlet med prednisolon i kombinasjon med vitamin D₃, hadde vitamin K₂ gitt over 12 uker additiv effekt kombinert med vitamin D₃. Man så signifikant økning i lumbal BMD og karboksylert osteokalsin ved tilførsel av begge vitaminene, sammenlignet med vitamin D₃ alene.

GnRH-agonister

GnRH-agonister (f eks leuprolide) brukes i behandlingen av østrogen-avhengige lidelser, bl.a. endometriose og leiomyom. Bruk av disse medikamentene medfører også bentap, pga. deres antiøstrogene virkning (208). Somekawa et al. (213) gjorde en studie blant 110 kvinner (gjennomsnittsalder 46.2 år), behandlet med leuprolide. De ble delt i fire grupper, hvor de over 6 måneder enten fikk tilskudd av 45 mg/d vitamin K₂, 0,5µg/d 1,25-hydroksy-vitamin D₃, eller både vitamin D og K. Den siste gruppen utgjorde kontrollgruppe. Etter endt observasjonstid, ble BMD målt i lumbalcolumna. I kontrollgruppen så man en reduksjon i BMD på 5.25%, hos de som fikk vitamin D₃ 4.13%, vitamin K₂-gruppen 3.72%, mens vitamin D og K sammen reduserte bentapet mest effektivt.

Primær biliær cirrhose

Pasienter med primær biliær cirrhose risikerer malabsorpsjon av fett, hvilket bl.a. kan medføre mangel av vitamin K og D (214). I denne gruppen sees også økt insidens av osteodystrofi og økt frakturnrate (208). En randomisert, kontrollert studie (214) inkluderte 27 pasienter med primær biliær cirrhose. Intervensjonsgruppen (n = 14) fikk vitamin K₂ (45 mg/d) i to år, kontrollgruppen (n = 13) fikk placebo. Etter et år så man en liten økning i BMD hos de som fikk vitamin K (0.3% ± 2.3%), derimot så man en reduksjon i kontrollgruppen (-3.5% ± 1.2%). Etter to år ble det observert reduksjon i BMD i forhold til baseline i begge grupper, 0.8% (± 3.4%) og 6.9% (± 2.1%) i hhv. intervensjons- og kontrolgruppen. BMD var signifikant høyere hos pasientene som fikk vitamin K sammenholdt med de som fikk placebo.

Anorexia nervosa

Vitamin K₂ (45mg/d) ble gitt til 10 pasienter med anoreksi i 11 mnd. (215), og sammenholdt med resultatene fra en kontrollgruppe på 10 anoreksipasienter, fant man at vitamin K-tilskudd medførte signifikant reduksjon i bentap (målt ved BMD), -2.8% og -6.9% i hhv. intervensjons- og kontrollgruppen. Karboksylert osteokalsin økte også signifikant ved vitamin K-tilskudd sammenlignet med placebo. Anoreksi er en tilstand som kan medføre alvorlig vekttap, osteoporose og osteopeni. Sykdommen er vanlig i Norge, med en prevalens omkring 0,3% blant kvinner i alderen 15-29 år (216). Vitamin K kan vise seg å være et nyttig tilskudd til disse kvinnene, som risikerer senfølger i form av bl.a. osteoporose.

Alternative effekter av vitamin K i basale forsøk

Vitamin K₂ gitt i farmakologiske doser synes å ha god effekt på benstatus. Til tross for at både kliniske og basalmedisinske studier viser assosiasjon mellom osteokalsin, andre vitamin K-avhengige proteiner og benhelse, er det stor usikkerhet omkring osteokalsins egentlige fysiologiske rolle. For å kunne forklare de observerte effektene av vitamin K på benhelsen i klinikken, er man på jakt etter alternative mekanismer for vitamin K i forhold til benvev.

In vitro-studier har f. eks. vist at vitamin K₂ ikke bare sikrer γ -karboksylasjonen av osteokalsin, men også øker nivåene av osteokalsin-mRNA (217). Dette indikerer at vitamin K₂ også styrker produksjonen av selve proteinet, men denne effekten forutsetter at vitamin D er tilstede (218), som induserer produksjonen. Akkumulering av karboksylert osteokalsin er viktig for mineraliseringsprosessen in vitro.

I cellekulturer har man sett at MK-4 spesifikt influerer differensieringen og funksjonene til benmargsceller, slik at adipogenesen og osteoklastogenesen hemmes (219). Man mener at redusert adipogenese åpner for stimulering av osteoblastogenese, slik at MK-4 på denne måten beskytter benmassen ved å fremme nydannelse av ben og hemme resorpsjon. Denne effekten kommer i tillegg til vitamin K sin rolle i γ -karboksylasjonen. Koshihara et al. (217,218,220) fant tilsvarende resultater i sine cellekulturer, hvor både MK-4 og vitamin K₁ fremmet differensieringen av mesenchymale celler i benmargen til osteoblast-forløpere, mens osteoklastdannelsen ble hemmet.

Studier av cellekulturer har funnet at vitamin K (K₂ mer potent enn K₁) hemmer lipopolysakkarid (LPS)-stimulerte fibroblasters produksjon av interleukin 6 (IL-6) (221). Man vet at IL-6 medierer økt benresorpsjon og redusert bendannelse, slik at faktorer som hemmer IL-6, kan forventes å redusere bentapet mediert på dette viset (109). Analogt til dette har man også sett at vitamin K hemmer produksjonen av prostaglandin E₂ (PGE₂) (222), som også fremmer benresorpsjon. Disse oppdagelsene indikerer at vitamin K i farmakologiske doser modulerer fysiologiske responser gjennom manipulasjon av cytokin-nettverk. Dette kan åpne for nye muligheter innen terapeutisk intervensjon ved metabolsk bensykdom.

Urayama et al. (223) viste at vitamin K₂ inhiberer apoptotisk død av humane osteoblaster i cellekultur. Apoptose var induert av bl.a. Fas. Slik ser vitamin K₂ ut til å bevare antallet osteoblaster, og dette kan være en av mekanismene bak den terapeutiske effekten av vitamin K₂ i osteoporose.

En har ytterligere bevis for at vitamin K₂ har betydning utover γ -karboksylasjonen av vitamin K-avhengige proteiner. Man har funnet tegn til at vitamin K regulerer transkripsjonen av ulike proteiner via kjernereseptoren SXR (Steroid and xenobiotic receptor) (224). SXR spiller bl.a. en sentral rolle i transkripsjonen av enzymer som uskadeliggjør xenobiotika, og induseres av flere preparater (bl.a. taxol, rifampicin og Johannesurt). SXR fungerer som en sensor som koordinerer clearance av medikamenter. Nå har man imidlertid funnet at vitamin K₂ bindes til SXR, hvilket induserer produksjon av SXR-målgenet CYP3A4. Vitamin K₂ gitt til osteosarkomceller ga økt mRNA for osteoblastmarkørene ALP, osteoprotegerin, osteopontin og MGP. Kjente aktivatorer av SXR (rifampicin mfl.) induserte dette panelet av benmarkører i samme grad som vitamin

K₂, slik at en kan slutte at vitamin K₂ regulerer transkripsjonen av benspesifikke gener via SXR, som medfører en økning i markører på osteoblast-aktivitet.

Dette indikerer at man i økende grad har evidens for at vitamin K påvirker benvevet også vha. andre mekanismer enn γ -karboksylasjon av vitamin K-avhengige benproteiner. Ytterligere kunnskap på dette feltet kan hjelpe til å belyse forhold en ennå ikke har klart å forklare vha. de observerte effektene av osteokalsin.

Warfarin og vitamin K-avhengige proteiner

Warfarin forhindrer posttranslasjonell γ -karboksylasjon av glutamat i peptidkjedene til koagulasjonsfaktorene II, VII, IX og X (se avsnittet om vitamin K-avhengig karboksylase), hvilket er basis for klinisk bruk av preparatet. På samme måte er det vist at bruk av warfarin medfører manglende γ -karboksylering også av andre vitamin K-avhengige protein, som osteokalsin. Hittil har mye av oppmerksomheten omkring vitamin K og benhelse dreid seg om nettopp osteokalsin. Man har observert korrelasjon mellom underkarboksylering av osteokalsin og redusert BMD, og økt risiko for brudd. Men hittil er funksjonen til osteokalsin kun stykkevis kjent. Hvis warfarin har en negativ effekt på benvevet, skulle man tro at denne medieres via underkarboksylering av osteokalsin. Så lenge osteokalsins funksjon ikke er klarlagt, er det vanskelig å si hvilke konsekvenser warfarin har for benvevet på mikronivå.

Interessen for rollen til vitamin K i benfysiologien oppsto etter at det såkalte "Føtalt warfarin syndrom" ble beskrevet (47). Barn, hvis mødre hadde fått warfarin i 1. trimester av svangerskapet, ble født med uttalt forkalkning i epifysene og irregulær vekst av ansiktsskjelettet og de lange knokler. Warfarin synes derfor å ha åpenbare konsekvenser for raskt voksende benvev. Grunnen til at man er relativt sikker på at disse forandringene skyldes warfarins antagonisme på vitamin K-syklus, og ikke en annen effekt av preparatet, er at et barn med kongenitt mangel på vitamin K epoksid reduktase, hadde klinikk som tilsvarte "Føtalt warfarin syndrom" (104,105). I tillegg manglet barnet de vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorene.

Warfarin og dyreforsøk

Studier som har undersøkt effekten av antikoagulasjon på skjelettet hos forsøksdyr, har så langt vært motstridende. Price et al. (225) utviklet en protokoll, hvor de induiserte vitamin K-mangel hos kaniner vha. å gi massive doser warfarin, for så å gi koagulasjonsfaktorer, slik at de ikke forblødde. Etter 8 uker var γ -karboksy-glutamatinnholdet og BGP (osteokalsin) i ben hos dyrene redusert til mellom 1-5% av normale nivå. Likevel, benvevet var normalt mineralisert, hadde normal styrke og morfologi, til tross for at man vet at underkarboksylert osteokalsin har redusert affinitet til hydroksyapatitt (64). Samme protokoll ble så benyttet hos rotter (225). BGP-mengden i ben ble også nå kraftig redusert (2% av normalverdier), mens BGP i serum var normalt eller lett forhøyet. Under disse forholdene var størrelsen av benene, morfologien og mineraliseringen normal, samt at radiusfrakturer tilhelt normalt, radiologisk vurdert. I en forlengelse av disse forsøkene, fant man derimot at kronisk warfarinbruk ga uttalt og overdreven mineralisering i form

av at vekstsonene i proksimale tibia ble forkalket (226). Dette har blitt tilskrevet reduserte nivå av MGP.

Andre har vist at osteokalsin virker kjemotaktisk på visse osteoklast-forløperceller (89), og det har da blitt foreslått at osteokalsin spiller en rolle for benresorpsjon vha. å fremme osteoklast-differensiering (83). Pastoureau et al. (61) benyttet en tilsvarende protokoll som Price et al., de ga lam warfarin og vitamin K, for å undersøke osteokalsins rolle i remodellering av ben. Man så raskt at osteokalsin ble redusert i knokler hos dyrene, og etter tre måneder hadde dyrene utviklet en markert osteopeni, da både benresorpsjon og bennydannelse var nedsatt, men sistnevnte i størst grad. Dataene tydet på at effekten var mest uttalt for trabekulært ben. Forfatterne kom til at osteokalsin kan være viktig for å opprettholde normal benmasse, og sikre normal remodellering av trabekulært ben. Det er kjent at redusert benresorpsjon er koplet med redusert nydannelse av ben (227). Hvis osteokalsin er viktig for å rekruttere osteoklaster, kan dette være mekanismen bak Pastoureaus observasjon.

Haffa et al. (228) induserte vitamin K-mangel hos unge, raskt voksende rotter vha. warfarin eller vitamin K-redusert kost. ucOC økte i serum hos dyrene, og totalt osteokalsin i femur ble redusert. Likevel så man ingen tegn til endring av benturnover, BMD eller styrken til knoklene. Forfatterne spør seg forøvrig om rotter er en egnet modell til å undersøke effektene til vitamin K på skjelettet, da osteokalsin ved warfarintilførsel reduseres i mye mindre grad i knoklene hos rotter enn hos mennesker. De foreslår også alternative mekanismer for osteokalsins, og andre vitamin K-avhengige proteiners, betydning for skjelettet, f. eks. kalsiumhomeostatsen. Dette fordi konsentrasjonen av osteokalsin i serum øker dramatisk kun minutter etter hypokalsemiske stimuli (229).

Hara et al. (90) observerte i rottestudier at BMD i ben med redusert osteokalsin ikke var signifikant forskjellig fra annet ben. Dette samsvarer med resultatet fra Price et al. (225) og Haffa et al. (228). Hara et al. fant også at γ -karboksylasjonen av vitamin K-avhengige proteiner i benvev affiseres ved lavere doser warfarin enn de vitamin K-avhengige proteinene i leveren, slik at leveren ser ut til å utnytte vitamin K mer effektivt enn benvevet. Tilsvarende fant Price et al. (231), som etter å ha gitt rotter warfarin ga dem vitamin K. De vitamin K-avhengige koagulasjonsproteinene var karboksylert ved vitamin K-tilskuddet, mens osteokalsin, som produseres i ben, var underkarboksylert. Denne vevsspesifikke forskjellen kan muligens skyldes tilstedeværelse av en warfarin-insensitiv kinon reduktase i leveren, men ikke finnes i benvev. Tilsvarende, at leveren utnytter vitamin K mer effektivt enn annet vev, er også sett hos mennesker (111,131).

Simon et al. (230) kom derimot fram til andre resultater. De gjorde rotteforsøk med warfarin i kliniske doser (målt ved INR), og fant vha. biomekanisk testing og histiomorfometriske analyser redusert styrke i femur, redusert mengde trabekulært benvev, og tegn til økt benresorpsjon, redusert bendannelse. Dette går i mot hva Price et al. (225) rapporterte tidlig på 80-tallet. Forfatterne forklarer forskjellen i resultatene ved at Price et al. ga sine rotter store doser vitamin K₁, som kan ha effekter på benvev uavhengig av osteokalsin. F.eks. gir vitamin K₁ redusert ekskresjon av kalsium i urin, i tillegg til at Notoya et al. (232) har vist at vitamin K₁ inhiberer osteoklast-funksjon og –aktivitet in vivo. Dette kan, iflg. Simon et al., ha motvirket warfarins virkning på benvevet i studien til Price et al.

Dodds et al. (233) ga rotter antikoagulanten dicumarol, og undersøkte hvilken effekt dette hadde på tilheling av metatarsalfrakturer hos dyrene. Etter 12 dager hadde dyrene som fikk dicumarol dannet signifikant mindre ben enn kontrollene, uten at den totale størrelsen av callus var forandret. Derimot fant, som nevnt, Price et al. (225) ingen effekt av warfarin på frakturtilheling, dog var dette radiologisk vurdert. Resultatene fra en studie på dette feltet ved Einhorn et al. (234), samsvarer med resultatene til Price.

Vitamin K-antagonister har i flere undersøkelser medført reduserte konsentrasjoner av totalt osteokalsin i serum hos mennesker, selv om ikke alle studier har kunnet rapportere dette. Det er dessuten variasjoner mellom ulike dyrearter her, da en slik effekt i mindre grad sees hos rotter, mens sauer ligger nærmere menneskene. Osteokalsin i serum er en markør på bendannelse, og siden warfarin ser ut til å gi reduksjon av denne, er det blitt foreslått at oral antikoagulasjon medfører redusert osteoblastaktivitet.

Så langt har ikke dyremodeller kunnet gi sikre svar mtp. vitamin K og osteokalsins, og dermed warfarins, betydning for benhelsen.

Warfarin, vitamin K og osteoporose

De siste 25 årene har det blitt gjort mange studier som undersøker ulike aspekter av sammenhengen mellom vitamin K og benhelsen, både basale og kliniske forsøk. Resultatene av disse er så langt forvirrende. Som et resultat av fokuset på rollen til vitamin K i benmetabolismen, har det kommet flere arbeider som tar for seg effekten av warfarin, en vitamin K-antagonist, på ben.

Warfarinbehandling og forandring i biokjemiske parametere

Pietschmann P., Woloszczuk W., Panzer S., Kyrle P., Smolen J.

Decreased serum osteocalcin levels in phenprocoumon-treated patients

J Clin Endocrinol Metab. 1988 May;66(5):1071-4.

Osteokalsin målt i serum hos 48 pasienter som fikk behandling med phenprocoumon, ble sammenlignet med tilsvarende hos 22 normale, ”matchede” kontroller (235). Osteokalsin var signifikant lavere i pasientgruppen enn kontrollgruppen ($p < 0.0001$). I 27 av pasientene og 21 av de friske, ble også ratio av nonkarboksylert osteokalsin til totalt osteokalsin bestemt. Andelen ucOC var betydelig høyere blant pasientene sammenlignet med kontrollene ($p < 0.0001$).

På grunnlag av dette fastslår forfatterne at karboksyleringen av osteokalsin er hemmet hos pasienter som mottar oral antikoagulasjon, denne antagelsen har blitt bekreftet i andre studier senere.

Menon RK, Gill DS, Thomas M, Kernoff PBA, Dandona P.

Impaired carboxylation of osteocalcin in warfarin-treated patients

J Clin Endo Met 1987,64;1:59-61.

Denne studien (236) undersøkte effekten av warfarin på Glu/Gla-ratio. 20 pasienter (13 menn, 7 kvinner) i alderen 28-75 år (gjennomsnitt 65 år), som alle hadde fått warfarin i minst 3 mnd. før studiens start, ble inkludert. Indikasjonene for antikoagulasjon var DVT (n = 6), ACB-operasjon (n = 6), klaffesykdom (n = 5), lungeemboli (n = 1), trombotisk kardiomyopati (n = 1) og ischemisk hjertesykdom (n = 1). Ingen av disse hadde metabolsk bensykdom, ingen fikk vitamin D-supplement, alle hadde normal nyre- og leverstatus (funksjonsprøver). 10 kontrollpersoner deltok, med gjennomsnittsalder 68 år (range 35-77 år). I tillegg fikk en gruppe av 7 friske menn (24-45 år, gjennomsnitt 30 år) en enkeltdose 30mg warfarin, og hos disse ble blodprøver tatt før og 72t. etter inntaket. Alle deltagerne i studien fikk så målt Glu- og Gla-fraksjoner av osteokalsin.

Resultater

Man fant ingen forskjeller i totalt osteokalsin i serum mellom gruppene. Totalt osteokalsin falt ikke-signifikant i gruppen av friske menn som fikk en dose warfarin. Riktignok var andelen Glu-osteokalsin større hos pasientene som fikk langtidsbehandling med warfarin enn hos kontrollene (median, 46% vs. 14%, $p < 0.002$). Samtidig så man en signifikant ($p < 0.01$) økning i andelen Glu-osteokalsin hos mennene som fikk 30 mg warfarin.

Studien ble publisert i 1987, og er derfor et relativt tidlig bidrag til kunnskapen om rollen til vitamin K i benfysiologien. Man observerte det som er velkjent nå, behandling med warfarin øker underkarboksyleringen av osteokalsin.

van Haarlem LJ, Knapen MH, Hamulyak K, Vermeer C.

Circulating osteocalcin during anticoagulant therapy.

Thromb Haemost. 1988 Aug 30;60(1):79-82.

Forfatterne (237) observerte at vitamin K-antagonister (phenprocoumon) induserte en reduksjon av osteokalsin i serum hos sauer, samt at osteokalsins affinitet for hydroksoapatitt ble redusert. Samtidig fant man at tilførsel av vitamin K til dyrene reverserte effekten phenprocoumon hadde hatt på koagulasjonssystemet, men ikke på osteokalsin-produksjonen.

Fra undersøkelser i mennesker fant forfatterne tilsvarende. Vitamin K-antagonister ga redusert nivå av osteokalsin i serum, og proteinets affinitet for hydroksoapatitt ble redusert. Disse to variablene nådde "steady-state" –nivå allerede innen et døgn etter start av behandlingen, og de forble lave, ved fortsatt behandling, i flere år.

Van der Linden T, Houvenagel E, Graux P, Leloire O, Forzy G, Cabaret P, Tison F, Marchandise X, Dutoit A, Vincent G, et al.

Effects on the bone metabolism of long-term treatment with antivitamins K₁

An Cardiol Angeiol (Paris) 1991 Sep; 40 (7):405-407

Studien (238) inkluderte 12 menn under 60 år, alle hadde brukt orale anticoagulantia i mer enn et år. Kontrollgruppen besto av 9 pasienter med samme kardiovaskulær patologi, men uten oral antikoagulasjon. Man målte så indikatorer på fosfor- og kalsium-metabolismen, osteokalsinnivå og BMC.

Osteokalsin var signifikant lavere i antikoagulasjongruppen enn hos kontrollene ($p=0.01$), ellers fant man ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

Man fant altså ikke tegn til osteopati hos pasientene som fikk oral antikoagulasjon. Reduksjonen man så i osteokalsin, kan iflg. forfatterne skyldes inhibisjon av sekresjonen eller karboksylasjonen av proteinet, eller pga. en eller annen endring i osteoblast-aktiviteten. Karboksylasjonsgraden av osteokalsin ble ikke målt.

Da kun abstract er tilgjengelig, foreligger det ingen forøvrig informasjon om hvordan pasientene ble inkludert i studien, om evt. eksklusjonskriterier, hvor BMC ble målt, om gruppene var sammenlignbare mtp. evt. confoundere osv. Uansett var populasjonen svært liten, slik at det er vanskelig å konkludere med noe på grunnlag av disse resultatene.

Knapen MHJ, Hellemons-Boode BSP, Mangenberg-Ledeboer M, Knottnerus JA, Hamulyak K, Price PA, Vermeer C.

Effect of oral anticoagulant treatment on markers for calcium and bone metabolism.

Haemostasis 2000;30:290-297.

Denne studien (239) hadde et prospektivt, randomisert, placebo-kontrollert longitudinelt design. 84 pasienter (42 kvinner, 42 menn) med nonvalvulær atrieflimmer mellom 60 og 78 år, ble inkludert. Eksklusjonskriterier var bruk av anticoagulantia før inklusjon i studien, samt sykdom eller medikasjon som påvirker ben- eller kalsiummetabolismen.

Pasientene ble randomisert til en av tre grupper. En gruppe fikk aspirin 150mg ($n=34$, 13 menn og 21 kvinner), og ble ansett som kontrollgruppe. De to andre gruppene fikk vitamin K-antagonister (enten acenocoumarol eller phenprocoumon) i forskjellige doser, den ene gruppen hadde mål-INR mellom 2,5 og 3,5 ($n=22$, 12 menn og 10 kvinner), den andre INR 1,1-1,6 ($n=28$, 17 menn og 11 kvinner) som mål. Ved start av behandlingen og etter et år tok man blod- og urinprøver, hvor man målte kreatinin, total ALP, benspesifikk ALP, immunoreaktivt osteokalsin, osteokalsins hydroksoapatitt-bindingskapasitet (mål på karboksylert osteokalsin), MGP, protrombin prokoagulant aktivitet, normalt og underkarboksylert protrombin. Kalsium og deoksypridinolin ble målt i urinen. BMI ble regnet ut.

Resultater og diskusjon

Allerede ved baseline var Gla-innholdet i sirkulerende osteokalsin redusert (56%) under normalen (70-80%), hvilket indikerer at vitamin K-status i benvevet var suboptimal

allerede før start av behandlingen. Alle andre markører som ble målt var forøvrig innen normalområdet for aldersgruppen ved baseline.

Etter 1 år fant man at sirkulerende vitamin K var økt i alle tre gruppene, men ikke signifikant. Ekskresjon av Gla i urinen var redusert i begge antikoagulasjons-gruppene, mest i gruppen med INR 2,5-3,5. Aspirinbehandling affiserte ikke konsentrasjonene av osteokalsin, MGP eller karboksyleringen av osteokalsin. Antikoagulasjon med lav intensitet ga signifikant reduksjon i sirkulerende protrombin og totalt osteokalsin (hhv. 13% og 19%), i den andre antikoagulasjons-gruppen (regulær intensitet) var tilsvarende tall 43% og 36% (også signifikant). MGP-relatert antigen var uendret, men man har ingen pålitelig test for påvisning av deskarboksy-MGP. Protrombin var fullt karboksylert ved baseline, Gla-innholdet ble i lavintensitetsgruppen redusert til 81%, i gruppen med regulær intensitet ble karboksyleringen redusert til 46%. Gla-innholdet i osteokalsin var lav allerede ved baseline, 56%, og ble ytterligere redusert, i lavintensitetsgruppen til 38%, til 33% i den andre antikoagulasjons-gruppen. Alle disse reduksjonene var signifikante ($p < 0.05$). Osteokalsin var forøvrig den eneste benmarkøren som ble signifikant affisert.

Forfatterne mener at den reduserte osteokalsinsyntesen som ble observert ikke kan anses som et resultat av hemmet osteblastaktivitet, da andre benmarkører ikke ble affisert av oral antikoagulasjon. Osteoklastfunksjonen synes heller ikke å bli påvirket. Samtidig sier de at deres data ikke utelukker at benkvaliteten er forringet, men da som en følge av økt produksjon av underkarboksylert osteokalsin (og MGP). Enn så lenge vet man ikke sikkert hvilken fysiologisk funksjon osteokalsin har, slik at man ikke kan si hva underkarboksylering av osteokalsin, og dermed nedsatt funksjon av proteinet, vil føre til. Samtidig så man også her tegn til at osteokalsin, som produseres i benvevet, er mye mer sensitiv ovenfor vitamin K-mangel enn hva tilfellet er for leverens vitamin K-avhengige proteiner, her vist ved protrombin.

Vitamin K, oral antikoagulasjon og effekt på kalsiumekskresjonen

Jie et al. (240) observerte reduksjon av kalsiumekskresjonen i urinen hos en gruppe postmenopausale kvinner, som fikk vitamin K-tilskudd. Effekten var signifikant hos såkalte "fast losers" av kalsium (kalsium/kreatinin-ratio > 0.5). Som en forlengelse av dette, ønsket forfatterne å se om det fantes en motsatt effekt blant pasienter som fikk oral antikoagulasjon. Man undersøkte derfor 141 pasienter under langtidsbehandling med warfarin, og sammenlignet disse med en kontrollgruppe, bestående av kjønns- og aldersmatchede personer, men uten warfarinbehandling (240). Man fant at særlig blant unge menn var fraksjonen av "fast losers" signifikant høyere i den behandlede gruppen sammenlignet med kontrollene. På denne måten fikk man en indikasjon på at oral antikoagulasjon medfører risiko for stort kalsiumtap i urinen.

Warfarinbehandling og effekt på BMD, frakturrisiko

Jamal SA, Browner WS, Bauer DC, Cummings SR
Warfarin Use and Risk for Osteoporosis in Elderly Women,
Annals of Internal Medicine 1998; 128:829-832

Jamal et al. (241) gjorde en prospektiv, multisenter observasjonsstudie, hvor de ønsket å undersøke hvorvidt bruk av warfarin medfører redusert BMD og økt risiko for fraktur. Populasjonen i studien besto av 6201 postmenopausale kvinner, 65 år eller eldre. Disse ble fordelt i to grupper, den ene utgjorde kvinnene som fikk warfarin (n=149, selvrapportert), de som ikke fikk slik behandling dannet kontrollgruppen (n=6052). Man målte BMD i hofta og hæl ved baseline, størsteparten av deltagerne fikk dessuten målt bentetthet i hofta også to år etter (n=5122), dvs. hos disse kunne man følge et evt. bentap. Hver 4. måned ble evt. frakturer registrert (radiologisk verifiserte, unntatt frakturer som følge av betydelig traume, samt selvrapporterte vertebrale frakturer), gjennomsnittlig observasjonstid mtp. frakturer hos kvinnene i studien var 3,5 år.

Ved baseline ble det registrert en rekke faktorer hos kvinnene. I analysene ble det korrigeret for alder, vekt, østrogenbruk, klinikk og de av de registrerte karakteristikkene som var signifikant forskjellige mellom warfarin-gruppen og kontrollene ($p \leq 0.1$). Disse var selvrapportert helsestatus, bruk av nonthiazid diuretika, ufrivillig vekttap over 2 kg siste 4 mnd. og status ved klinisk undersøkelse. Gruppene var sammenlignbare mtp. de andre registrerte faktorene. Analysene ble også gjentatt senere, da ble kun pasienter som hadde brukt warfarin i over to år inkludert i warfarin-gruppen (n = 102).

Resultater

Man fant ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i aldersjustert BMD målt i hofta eller hælen. Man så heller ikke betydelige forskjeller da man justerte for confoundere, eller begrenset analysen til de av pasientene som hadde brukt warfarin i mer enn 2 år (i løpet av oppfølgingsperioden, man kjente ikke til hvor lenge pasientene evt. hadde brukt warfarin før studien startet).

I løpet av en gjennomsnittlig observasjonstid på 3,5 år ble det registrert 576 nontraumatiske, nonvertebrale frakturer, hvorav 15 i warfarin-gruppen (10%) og 561 blant kontrollene (9,3%). Det var ingen signifikant forskjell i aldersjustert frakturrate mellom gruppene, heller ikke da man korrigerer for nevnte faktorer, eller da analysen kun omfattet pasienter med warfarinbruk i mer enn 2 år.

De to gruppene var også like mtp. aldersjustert reduksjon i BMD målt i hofta. Hos warfarinbrukerne fant man et årlig bentap på 1.1% (CI, 0.7%-1.4%), tilsvarende tall for kontrollene var 0.8% (CI, 0.7%-0.9%). Forskjellen mellom gruppene var i gjennomsnitt 0.3% (CI, -0.1% - 0.6%), altså ikke statistisk signifikant.

Diskusjon

Funnene i studien indikerer at vitamin K-mangelen som induseres av warfarin-bruk, ikke fører til større risiko for osteoporose. Forfatterne argumenterer for kvaliteten ved studien, de mener at deres store, prospektive studie burde ha statistisk kraft til å påvise selv små effekter av warfarin på frakturrisiko og BMD. Riktignok var kontrollgruppen stor med et betydelig antall brudd (n=6052, 561 brudd), men warfarin-gruppen derimot, utgjorde kun

149 kvinner med 15 observerte frakturer, slik at den statistiske kraften mtp. påvisning av forskjell i frakturrisiko likevel kan ha vært begrenset. Forsøkpersionene i begge grupper ble rekruttert fra "Study of Osteoporotic fractures", hvilket burde eliminere "referral bias", mens studiens prospektive design med lang oppfølgingstid begrenser muligheten for "recall bias".

Forfatterne viser til studiene som har påpekt en assosiasjon mellom vitamin K-mangel, økt underkarboksylert osteokalsin i serum og redusert BMD, samt økt risiko for osteoporotiske brudd. Warfarin øker som kjent ucOC i serum kraftig, og da man i denne studien ikke kunne finne noen sammenheng mellom warfarinbruk og utvikling av osteoporose / økt frakturrisiko, framsetter forfatterne andre forklaringer på de ovennevnte, observerte assosiasjonene. De mener, som andre, at vitamin K-mangel er en markør på generell underernæring, som på andre måter medfører redusert benhelse (60). De økte nivå av ucOC man har sett hos pasienter med økt risiko for brudd, foreslår forfatterne at kan reflektere de "indre" problemene i benmatrix, som ligger bak når brudd oppstår.

Forfatterne setter selv fingeren på noen svakheter ved studien, det kan nevnes at det ikke ble gjort målinger av vitamin K-status (f eks. måling av ucOC, iOC, s-vitamin K mfl.) i studien, samt at man ikke kjente til hvor lenge pasientene evt. hadde brukt warfarin før de ble inkludert. Samtidig er studien gjort i en bestemt populasjon, hvite kvinner over 65 år, hvilket begrenser overføringsverdien til andre grupper.

Caraballo PJ, Heit JA, Atkinson EA, Silverstein MD, O'Fallon M, Castro MR, Melton LJ
Long-term Use of Oral Anticoagulants and the Risk of Fracture
Arch Intern Med 1999;159:1750-1756.

Caraballo et al. (242) ønsket å sammenligne risiko for brudd blant kvinner eksponert for oral antikoagulasjon med frakturnrate i befolkningen forøvrig. De utførte en retrospektiv kohortstudie, som inkluderte 572 kvinner, som hadde vært 35 år eller eldre ved sin første episode av venøs tromboembolisme. Ved baseline ble det gjort en omfattende registrering av ulike kliniske karakteristikk, som ulike pasientdata, type tromboembolisk episode og påfølgende behandling, forøvrig medisinsk anamnese/tidligere sykdommer og bruk av andre medikamenter. Kvinnenes journaler ble så undersøkt mtp. frakturer (klinisk og radiologisk verifiserte), og det forelå minst 1 års oppfølging for hver pasient, i alt 6314 personår. Bruddene ble vurdert utfra lokalisasjon og bakenforliggende traume. Risiko ble vurdert vha. å sammenligne antall frakturer i populasjonen med kjønns- og alders-spesifikke insidensrater, "Standardized Incidence Ratios" (SIR), for befolkningen ellers.

Resultater

Ved baseline var kvinnenes alder mellom 35 og 95 år, gjennomsnittlig 63.9 år. Første tromboemboliske episode var DVT hos 55%, lungeemboli med eller uten DVT hos de resterende (45%). I analysen ble kliniske tilstander man antar har innvirkning på frakturrisiko delt i grupper, en gruppe tilstander assosiert med økt falltendens, en gruppe bestående av metabolske lidelser som disponerer for sekundær osteoporose, og en tredje gruppe med faktorer som beskytter mot sekundær osteoporose.

Man observerte i alt 480 frakturer, hvorav 18% skyldtes alvorlig traume og 4% en spesifikk patologisk prosess. De resterende 78% var forårsaket av minimalt eller moderat traume, og dette var tilfelle for majoriteten av brudd i columna (90%), proximale femur (91%) og distale underarm (75%). Alle observerte frakturer sett under ett, var det ingen økning i bruddrisiko i den undersøkte populasjonen i forhold til befolkningen ellers (SIR; 1.1, 95% CI, 0.98-1.3). Derimot så man en 30% økning (SIR, 1.3; 95% CI 1.1-1.5) i risiko for osteoporotiske brudd, og denne skyldtes hovedsakelig en 3-dobling i vertebrale brudd (3.3, 95% CI; 2.7-4.1). Videre ble det observert en dobling i risiko for ribbeinsbrudd (SIR, 1.9, 95% CI; 1.4-2.6), og en betydelig økning i bekkenbrudd (SIR, 2.9, 95% CI; 1.9-4.3). Det var ingen økt risiko for brudd i ekstremitetene (SIR 1.0, 95% CI; 0.8-1.2), man så 10% økning i alle nonosteoporotiske brudd samlet, økningen var dog ikke signifikant. Den kumulative insidensen av alle brudd i løpet av 20 år, var 66% i populasjonen, forventet 62% ($p = 0.1$), altså ikke-signifikant forskjell. Det var derimot en signifikant økning i osteoporotiske brudd ved 20 år (43% observert mot 37% forventet, $p < 0.001$), denne økningen var størst for vertebrale brudd (32% vs. 12%, $p < 0.001$), noe mindre for ribbeinsbrudd (16% mot 9%, $p < 0.001$).

Frakturer i ribbein og vertebrae var de eneste som viste økende risiko med økende varighet av oral antikoagulasjon. For vertebrale brudd økte risiko fra 2.4 (95% CI, 1.6-3.4) ved eksposisjon mindre enn tre mnd., til 3.6 (95% CI, 2.5-4.9) ved eksposisjon mellom 3-12 mnd., og til 5.3 (95% CI, 3.4-8) hvis behandlingen varte over et år. Tilsvarende tall for ribbeinsbrudd var 1.6 (95% CI, 0.9-2.7), 1.6 (95% CI, 0.9-2.6), og til slutt 3.4 (95% CI, 1.8-5.7) ved oral antikoagulasjon i 12 mnd. eller mer. Ved eksposisjon i over 12 måneder, var oral antikoagulasjon assosiert med økt risiko for vertebrale brudd ($p < 0.001$), ribbeinsbrudd ($p = 0.003$) og alle osteoporotiske frakturer sett under ett ($p < 0.001$). Etter å ha kontrollert for andre faktorer, var eksposisjon i 12 mnd. eller mer en uavhengig prediktor av vertebrale brudd ($p = 0.009$), ribbeinsbrudd ($p = 0.02$) og alle osteoporotiske brudd samlet ($p = 0.02$).

Diskusjon

Forfatterne konkluderer med at de fant en assosiasjon mellom bruk av orale anticoagulantia og økt risiko for ribbeinsbrudd og vertebrale brudd, men ingen andre typer brudd. Bruk av warfarin medfører økt underkarboksylering av osteokalsin, og da økt konsentrasjon av ucOC i andre studier har blitt korrelert med økt risiko for bl.a. hoftebrudd, forventet man å finne økt risiko for hoftebrudd også i denne populasjonen. Dette ble ikke sett, til tross for at studien skulle ha god statistisk kraft. Andre studier har vist nedsatt BMD i underarmen hos warfarin-pasienter, men heller ikke økt risiko for underarmsbrudd ble observert her.

Studien hadde, iflg. forfatterne, flere viktige styrker. Den omfattet et totalt spektrum av pasienter med tromboembolisk sykdom, og man hadde tilgang til omfattende informasjon om pasientene. Frakturere i populasjonen var godt dokumenterte, og man hadde god mulighet til å korrigere for viktige confoundere. Et poeng er også at diagnostikken av de vertebrale frakturere i gruppen var basert på klinikk alene, hvilket medførte en underestimering av den virkelige frekvensen. Dette er viktig; hvis kvinnene hadde blitt fulgt nøyer mtp. vertebrale brudd enn befolkningen forøvrig, hadde man overestimert frekvensen i forhold til "SIR".

Samtidig hadde studien svakheter. Et retrospektivt design medførte at vitamin K-status, BMD mm. ikke kunne måles. Risikofaktorer mtp. falltendens ble ikke vurdert, samt at populasjonen så å si kun besto av hvite. Forfatterne reiste til slutt spørsmål om ikke man bør se bort fra oral antikoagulasjon som en risikofaktor for generalisert osteoporose, men de understrekte at warfarins effekt på det aksiale skjelettet bør undersøkes nærmere.

Mamdani M, Upshur REG, Anderson G, Bartle BR, Laupacis A
Warfarin therapy and risk of hip fracture among elderly patients
Pharmacotherapy 2003; 23(1):1-4

Mamdani et al. (243) gjorde en retrospektiv kohortstudie i en stor populasjon, hvor målet var å kaste lys over assosiasjonen mellom warfarinbehandling og hoftebrudd. Deltagerne i studien var 65år eller eldre, og ble inkludert hvis de nylig (innen det siste året) hadde fått foreskrevet et av fire medikamenter. På grunnlag av det aktuelle medikamentet, ble personene fordelt i fire grupper: warfaringruppen (n=52701), thyroideasubstitusjonsgruppen (n=40555), orale kortikosteroider-gruppen (n=43915) og protonpumpe hemmergruppen (PPI, n=60383). Den siste gruppen utgjorde kontrollgruppe, da PPI ikke har kjent innvirkning på benmetabolismen. Thyreoidea-gruppen var tenkt å være nøytral "sammenligningsgruppe", da hypothyreote som får substitusjon ikke har økt risiko for hoftebrudd. Steroidgruppen derimot, har velkjent økt risiko for hoftebrudd. Pasientene ble ekskludert hvis de innen fem år før starten av studien hadde hatt hoftefraktur, patologisk fraktur, tilstander som predisponerer for fraktur (epilepsi, traume, malignitet: bryst, ben, colon, rectum, lunge, metastatisk cancer, multippelt myelom), eller hvis de hadde blitt behandlet innen flere enn en av de ovennevnte medikamentgruppene. Man tillot skifte av medikament innen samme gruppe.

Man undersøkte videre retrospektivt mtp. innleggelse i sykehus for hoftefraktur, observasjonstid maksimalt 5 år. Pasientene ble fulgt fra dagen de startet å ta medikamentet, inntil 30 dager etter siste dato medikamentet ble foreskrevet. Observasjonen ble stanset ved hoftefraktur. Man registrerte div. komorbide faktorer, samt eksposisjon for andre medikamenter av betydning for benmetabolismen.

Resultat

Totalt observerte man omkring 223300 pasientår. Insidensen av hoftebrudd pr. 10000 pasientår var 61.9 i warfaringruppen, 65.8 i thyroideasubstitusjons-gruppen, 92.2 hos de som fikk steroider, og 57.5 i kontrollgruppen (PPI). Etter å ha justert for potensielle confoundere, fant man ingen forskjell i risiko for hoftefraktur mellom warfaringruppen (risiko ratio 0.94, 95% CI 0.81-1.09), thyroideagruppen (risiko ratio 1.02, 95% CI 0.89-1.18) og PPI-gruppen. Derimot var det signifikant økt risiko for hoftebrudd i steroidgr. (risiko ratio 1.44, 95% CI 1.21-1.70), sammenlignet med forsøkspersonene som fikk PPI.

Diskusjon

Forfatterne konkluderer med at de fant det samme som andre har observert: bruk av warfarin er ikke forbundet med økt risiko for hoftebrudd. Denne studien hadde dog begrensninger man bør være oppmerksom på. Pasientene ble kun observert i inntil fem år

etter start av behandlingen, hvilket er en noe begrenset periode i denne sammenhengen. Det ble justert for noen potensielle confoundere, mens man ikke hadde mulighet til å vurdere andre faktorer som evt. supplement av vitamin D og kalsium, BMI, diett, røyking, aktivitetsnivå mm. Designet forhindret også målinger av biokjemiske parametre eller BMD. Likevel har man grunn til å feste lit til resultatene, iflg. forfatterne, bl.a. fordi man fant den effekten man forventet i steroidgruppen.

Philip WJU, Martin JC, Richardson JM, Reid DM, Webster J, Douglas AS

Decreased axial and peripheral bone density in patients taking long-term warfarin

Q J Med 1995; 88:635-640

Denne studien (244) omfattet 40 menn behandlet med warfarin (indikasjoner: atrieflimmer n = 13, hjerteklaffproteser n = 16, gjentatt venøs tromboembolisme n = 4, bypasskirurgi for perifer vaskulær sykdom n = 7). En pasient hadde fått behandling i kun 4 mnd., resten 12mnd. eller mer (median 40.5 mnd., range 4-302). Kontrollgruppen besto også av 40 personer, hver av dem individuelt matchet til en warfarinpasient mtp. alder, medisinske tilstander og andre medikamenter. Pasienter med metabolsk eller malign bensykdrom, samt pasienter behandlet med antikonvulsiva, glukokortikoider, vitamin D eller kalsium, ble ekskludert. Fysisk aktivitet, høyde/vekt og røyking/alkohol ble registrert.

BMD ble målt både i det aksiale og appendikulære skjelettet, i lumbalcolumna (L2-L4), collum femoris og trochanter femoris, Ward's triangle (DXA-teknikk) og ultra distale radius (QCT-teknikk). Med QCT målte man både absolutt, kortikal, subkortikal og "cancellous" (trabekulær) benteitet. INR ble målt før og etter bestemmelsen av BMD, for å kontrollere behandlingsintensiteten.

Resultater

Warfarin- og kontrollgruppen var sammenlignbare mtp. alder, høyde/vekt, fysisk aktivitet mm. INR i warfaringruppen strakte seg fra 1.3-3.9, median 2.65. Man fant en generell trend mot redusert BMD i warfaringruppen vs. kontrollene, men forskjellen var kun statistisk signifikant for cancellous (trabekulær) benteitet målt i ultradistale radius (forskjell 9%, p = 0.023) og benteitet i lumbalcolumna (forskjell 10.4%, p < 0.004). Det ble ikke funnet signifikante assosiasjoner mellom varigheten av behandlingen, warfarindose, INR og BMD-målinger.

Diskusjon

Forfatterne fant i sin studie en signifikant BMD-reduksjon i de lokalisasjoner i skjelettet hvor trabekulært ben utgjør betydelige deler av knokkelen. Målesteder hvor kortikalt ben dominerer, f. eks., collum femoris, fant man kun små, ikke-signifikante forskjeller mellom warfarin- og kontrollgruppen (2%, p = 0.557). Wards triangel avviker dog noe fra denne observasjonen. Dette målestedet består hovedsakelig av trabekulært ben (244), men man fant kun en ikke-signifikant reduksjon i warfaringruppen i forhold til kontrollene (2.9%, p = 0.504). Forfatterne forklarer dette med at området ofte er dårlig definert ved DXA-scan, og presisjonen derfor er lav. Man vet fra andre studier at trabekulært ben er mer metabolsk aktivt enn kortikalt ben. Medikamenter som påvirker

benvevet, har større effekt her enn i kortikalt ben, det samme sees postmenopausal, hvor endringer (reduert BMD) først inntreffer i trabekulært ben. Forfatterne mener derfor at de har vist en negativ effekt av coumarin på benvev, som hovedsakelig rammer trabekulært ben. Dette kan, iflg. forfatterne, forklare hvorfor Piro et al. (248) ikke fant forskjeller mellom gruppene sine, da man her kun målte kortikalt ben.

Forfatterne argumenterer videre for at deres utvelgelse av kontrollgruppen så å si var optimal. Ved å finne kontrollpersoner som var svært like pasientene i behandlingsgruppen, kunne man i stor grad isolere warfarins effekt på benvevet.

Man fant her ingen signifikant sammenheng mellom varighet av behandlingen, warfarindosen, antikoagulasjonsintensitet og BMD. Man skulle jo forvente at warfarins effekt på ben i større og større grad skulle åpenbares med tiden, men en slik assosiasjon ble ikke observert her, hvilket kan skyldes at studien var for liten, behandlingsvarigheten for kort osv. Likevel slutter resultatene fra denne studien seg inn i rekken av arbeider som indikerer en assosiasjon mellom vitamin K-status, karboksylasjon av osteokalsin og benstatus.

Rosen HN, Maitland, Suttie JW, Manning WJ, Glynn RJ, Greenspan SL et al.

Vitamin K and maintenance of skeletal integrity in adults.

Am J Med 1993;94:62-68

Denne studien (245) tok sikte på å belyse vitamin Ks rolle i opprettholdelsen av benhelsen hos voksne. Det ble utført to delstudier, den første vurderte effekten av warfarin på BMD, den andre så på sammenhengen mellom BMD og markører på vitamin K-status.

I den første substudien ble 50 pasienter (41-85år, 20menn, 30kvinner), som hadde fått warfarin i mer enn et år inkludert. Indikasjonen for behandlingen var kronisk atrieflimmer (n = 18), klaffeprotese (n = 18), valvulær hjertesykdom uten klaffeprotoser (n = 8), cerebralt insult pga emboli (n = 5), og residiverende venøs tromboembolisk sykdom (n = 1). Kontrollgruppen besto også av 50 personer, disse var sammenlignbare med pasientene i warfaringruppen i forhold til alder, kjønn og rase. Personer med tilstander eller medikasjon som på en eller annen måte affiserer BMD, ble ekskludert. Man vurderte fysisk aktivitet, kalsiuminntak, røykehistorie, bruk av østrogen, diuretika og thyroidea-hormoner. BMD ble målt lumbalt (L1-L4), samt at man målte "weighted total spine BMD". BMD i hoften ble målt i collum femoris, trochanter major, og intertrokanterisk. "Weighted total hip BMD" ble også vurdert.

Den andre substudien inkluderte 113 friske eldre personer over 65år (35 menn, 78 kvinner). Eksklusjonskriteriene var som over, samt at personer som hadde brukt warfarin i mer enn en måned, ikke ble inkludert. Man målte vitamin K₁ i serum (indikerer vitamin K-inntak siste tid) og deskarboksy-protrombin (PIVKA-II, reflekterer vitamin K-status over lengre tid).

Resultater

I den første substudien fant man at gjennomsnittlig behandlingstid i warfaringruppen var 7,7år. Det ble ikke sett signifikante forskjeller i BMD mellom gruppene for noen av målestedene. Faktorene alder, kjønn (kvinne) og røyking var alle signifikant assosiert med redusert BMD i hoften, men dette var ikke tilfellet for warfarin. Høy BMI var

assosiert med økt BMD i hoften. Warfarinbehandling i mer enn 10 år var heller ikke assosiert med signifikant reduksjon i BMD.

I den andre substudien observerte man ingen korrelasjon mellom vitamin K₁, PIVKA-II eller BMD.

Diskusjon

Studien demonstrerer at pasienter som får warfarin over lengre tid, ikke har redusert BMD i ryggraden eller hoften sammenlignet med andre. Samtidig ble det her sett negativ korrelasjon mellom alder, kjønn og BMD, samt positiv korrelasjon mellom BMI og BMD, hvilket er vanlige observasjoner, som styrker validiteten av denne undersøkelsen. Denne studien, med 50 pasienter og 50 kontroller, kunne påvise forandringer i BMD ned mot 0.06 g/cm² (95% CI). Andre styrker ved studien er at de vurderte mange potensielle confoundere. Et problem, vil man dog kunne si, er at pasientene og kontrollpersonene ble rekruttert fra to forskjellige populasjoner, hvor pasientene kom fra en kardiologpraksis, kontrollpersonene fra befolkningen forøvrig. En kan tenke seg at warfarinpasientene på en eller annen måte var mer helsebevisste, slik at en eller annen uidentifisert faktor ved warfarinbehandlingen skjulte en evt. negativ effekt av warfarin på ben.

I den andre substudien fant man heller ingen assosiasjon mellom vitamin K-status og BMD. Dette samsvarer jo forsåvidt med resultatene i warfarin-studien, hvor induert vitamin K-mangel, som behandlingen medfører, ikke hadde effekt på BMD. Riktignok målte man her kun vitamin K₁ og PIVKA-II, og ikke underkarboksylert og intakt osteokalsin, som har vært brukt i andre studier som har vist assosiasjon mellom vitamin K-status og BMD.

Forfatterne konkluderer til slutt med at vitamin K-mangel ikke er av vesentlig betydning for klinisk viktige områder i skjelettet.

Kiss J, Tihanyi L, Nagy E, Vegh Z, Tahy A, Koranyi L

The effect of prolonged acenocoumarol therapy on bone density

Orv Hetil. 1995 Sep 24; 136(39):2113-5

Studien (246) undersøkte 45 hjertepasienter (gjennomsnittlig alder 57 år, ± 6,3år), som hadde blitt behandlet med acenocoumarol i minst to år (75 ± 52 mnd.). Indikasjonene for antikoagulasjon var atrieflimmer (n = 8), klaffeprotese (n = 28), kardialt aneurisme (n = 8) og dilatert kardiomyopati (n = 6). Disse ble sammenlignet med en kontrollgruppe (n=45), som ikke fikk antikoagulasjonsbehandling, diagnosene her var ischemisk hjertesykdom (n = 39), kardial hypertrofi (n = 5) og paroksysrisk supraventrikulær takykardi (n = 1). Gruppene var sammenlignbare mtp. alder, BMI, alkohol/røyk og hjertestatus (NYHA-klasse II-III), samt bruk av visse medikamenter (nitrater, kalsiumkanal-blokkere, diuretika).

BMD ble målt lumbalt (L2-L4), og var her signifikant lavere i den behandlede gruppen (p < 0.05). Derimot fant man ingen forskjeller mellom gruppenes BMD målt i ultradistale ulnare eller radiale regioner. Forøvrig ble det ikke påvist noen sammenheng mellom BMD og lengde eller dosering av behandlingen.

Forfatterne mener at resultatene fra studien bør medføre jevnlig måling av BMD hos pasienter som antikoaguleres oralt.

Lafforgue P, Daver L, Monties JR, Changnaud C, de Boissezon MC, Acquaviva PC
Bone mineral density in patients given oral vitamin K antagonists.
Rev Rhum Engl Ed. 1997 Apr; 64(4):249-54.

Behandlingsgruppen i denne studien (247) besto av pasienter, som hadde fått minst et års behandling med vitamin K-antagonister etter implantasjon av mekanisk aortaklaff. I alt ble 49 pasienter inkludert i denne gruppen, 19 menn og 30 kvinner, med gjennomsnittsalder 55.3 år. Gjennomsnittlig behandlingstid var 5.6 år. Kontrollgruppen besto av 21 pasienter med implanterte biologiske aortaklaffer, uten antikoagulasjon, 11 menn og 10 kvinner, med gjennomsnittlig alder 51.8 år.

Man målte BMD i lumbalcolumna og collum femoris, det ble utført rgt. columna og bekken, målinger i serum av kalsium, fosfat, kreatinin, alkalisk fosfatase, osteokalsin, 25-OH-vitamin D₃ og PTH.

Man fant ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i BMD, heller ikke da man justerte for alder og kjønn. Man så en trend mot økt BMD ved begge målesteder med økende varighet av eksposisjonen for vitamin K-antagonisten. Man fant også signifikant ($p < 0,0001$) lavere nivå av osteokalsin i antikoagulasjonsgruppen, mens de andre markørene på benmetabolismen var uforandrede.

Her fant man altså ingen effekt på BMD av langvarig behandling med vitamin K-antagonister. Pasientene i de to gruppene var forøvrig ikke "matched", og man registrerte heller ikke mulige confoundere. Gruppene var dog sammenlignbare mtp. alder og kjønn.

Piro LD, Whyte MP, Murphy WA, Birge SJ.

Normal Cortical Bone Mass in Patients after Long Term Coumadin Therapy.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1982; 54:470-473.

Denne studien (248) inkluderte 17 pasienter behandlet med coumadin (sodium warfarin) etter hjertekirurgi (behandlingsvarighet 1-17år, gjennomsnittlig 8,9år). Pasienter med andre predisponerende faktorer for osteopeni (nyre-/leversykdom, cancer, immobilisering, gastrointestinal kirurgi, malabsorpsjon, bruk av visse medikamenter mm.) ble ekskludert. Det var ingen kontrollgruppe til sammenligning, da man brukte forventede verdier i befolkningen ellers.

Man målte så kortikal benmasse i pasientenes nondominante arm, i 2.metacarp (metacarpal cortical width, MCW) og radius (osteodensitometri av midtradiale cortex). 6 pasienter (fire kvinner, to menn), fikk foretatt målinger også fire år etter. Gjennomsnittlig protrobin tid (PT) over de siste 12 mnd. ble bruk som mål på intensiteten av antikoagulasjonen.

Resultater og diskusjon

Pasientenes benmasse var ikke signifikant forskjellig fra de forventede verdier basert på befolkningen ellers. Heller ikke hos de seks som fikk foretatt målinger fire år senere, så man signifikante forandringer. Man så heller ingen sammenheng mellom benmasse og varighet av coumadin-eksposisjonen, eller gjennomsnittlig PT.

Det ble ikke påvist noen påvirkning av warfarin på pasientenes benmasse. I studien undersøkte man kortikalt benvev i radius og 2.metacarp, slik at man ikke kan si noe om evt. effekter på trabekulært ben eller det aksiale skjelettet. Det ble heller ikke foretatt målinger av vitamin K-status. Dette var en liten studie, en av de første som satte søkelyset på assosiasjonen mellom warfarinbruk og benhelse.

Studien har flere svakheter. Populasjonen var svært liten (n = 17), og av ulik etnisk sammensetning (både afroamerikanere, kaukasiere). Det er kjent at personer av afrikansk opprinnelse har høyere benmasse enn hvite, hvilket kan ha bidratt til å redusere effekten av phenprocoumon i studien. Forøvrig sammenlignes behandlingsgruppen med data fra litteraturen, det foreligger ingen kontrollgruppe. Et annet spørsmål er om pasientene, som hadde gjennomgått hjertekirurgi, ble behandlet med thiazider i etterkant. Thiazider kan i teorien medføre redusert ekskresjon av kalsium i urinen, slik at bentapet reduseres, og warfarineffekten dermed maskeres.

Fiore CE, Tamburino C, Foti R, Grimaldi D

Reduced axial bone mineral content in patients taking an oral anticoagulant

Southern Medical Journal 1990; 83:538-542

I alt 117 kvinner ble inkludert i denne studien (249), utført av Fiore et al. Kvinnene ble fordelt i to grupper, den første besto av pasienter som fikk acenocumarol (n=56, gjennomsnittsalder 49.7 år), som minst et år tidligere hadde fått implantert en eller flere hjerteklaffproteser. Kvinnene hadde ved operasjonstidspunktet vært i NYHA-klasse II-III, men med varierende symptomatisk bedring postoperativt. Kontrollgruppen (n = 61, gjennomsnittsalder 48.2 år) var kvinner, sammenlignbare med behandlings-gruppen mtp. alder og NYHA-klasse, men disse fikk ingen antikoagulasjon. Gruppene var dessuten sammenlignbare mtp. fysisk aktivitet, diett, frakturer, tidspunkt for menopause, høyde/vekt, mm. Ingen hadde osteoporose eller forstyrrelse i parathyroidea-funksjonen, og ingen brukte medikamenter med dokumentert effekt på ben- og/eller kalsium-metabolismen.

Man målte kalsium, fosfat, kreatinin, ALP, iPTH, calcitonin og bone gla protein (BGP, osteokalsin). Målinger av BMD ble foretatt to steder i radius, a: 2/3 av radius' lengde fra proximale ende, her hovedsakelig kortikalt ben, b: 9/10 av radius' lengde fra proximale ende, med både kortikalt og trabekulært (>50%) ben (single photon absorptiometry).

Resultater og diskusjon

De målte parametrene i blodet befant seg innen normalområdet for begge gruppene. Man fant videre signifikant lavere bentetthet ved begge målestedene i antikoagulasjons-gruppen sammenlignet med kontrollene. Forøvrig var det ingen signifikant sammenheng mellom bentetthet og BGP eller tiden siden operasjonen (1 eller 5 år). Det ble ikke observert frakturer i noen av gruppene.

Det ble her funnet at oral antikoagulasjon kan medføre kortikal og trabekulær osteopeni i det appendikulære skjelettet. De fant normale verdier av osteokalsin i begge gruppene, men hadde ikke mulighet til å måle grad av karboksylasjon av proteinet.

Forøvrig kan man si at populasjonen var liten, men gruppene var sammenlignbare mtp. mange faktorer man antar kan ha betydning for turnover av ben.

Resch H, Pietschmann P, Krexner E, Willvonseder R

Decreased peripheral bone mineral content in patients under anticoagulant therapy with phenprocoumon

Eur Heart J. 1991 Mar; 12(3):439-41

I denne studien (251) deltok 78 pasienter (gjennomsnittsalder 65,2år, 43 kvinner, 35 menn), som alle ble behandlet med phenprocoumon (gjennomsnittlig varighet et år, range 1-9år). Behandlingsindikasjonene var lungeemboli (n=31), DVT (n=16), ischemisk hjertesykdom (n=13), valvulær hjertesykdom (n=10) og femoro-popliteal bypass (n=8). Pasientgruppen ble sammenlignet med en kontrollgruppe bestående av 30 friske personer, med gjennomsnittlig alder 65.5år (20 menn, 10 kvinner).

Ingen av pasientene mottok annen medikasjon med kjent effekt på benmetabolismen, ingen led av malignitet eller metabolsk skjelettsykdom, og ingen hadde kliniske tegn på osteopati. Alle bodde hjemme, levde "normale liv" inkludert normal fysisk aktivitet. Man målte bone mineral content (BMC) distalt i den ikke-dominante underarm (single photon absorptiometry). Videre målte man osteokalsin i serum (målt hos 18 pasienter, 20 kontroller), leverfunksjon, kalsium, fosfat og PTT (a.m. Quick).

Resultater og diskusjon

Man fant signifikant redusert BMC både for kvinner ($p < 0.03$) og menn ($p < 0.01$) i antikoagulasjonsgruppen versus kontrollene. BMC var sammenlignbar innen de individuelle pasientgruppene (lungeemboli sammenlignet med DVT osv). Osteokalsin var signifikant redusert hos subgruppen i behandlingsgruppen som fikk målt denne, sammenlignet med kontrollene.

16 pasienter (kvinner) fikk målt BMC et år etter, og hadde markert akselerert gjennomsnittlig bentap (11,8% pr. år). Man fant ingen korrelasjon mellom perifer BMC, osteokalsinnivå og varighet av phenprocoumon-behandlingen.

Forfatterne konkluderer med at resultatene tyder på forandret benmetabolisme og redusert perifer BMC ved bruk av oral antikoagulasjon, hvilket kan medføre økt risiko for osteoporose. Reduserte nivå av osteokalsin i serum i antikoagulasjonsgruppen kan indikere redusert nydannelse av ben.

Gage BF, Birman-Deych E, Radform MJ, Nilasena DS, Binder EF.

Risk of osteoporotic fracture in elderly patients taking warfarin

Arch Inter Med. 2006;166:241-246.

Forfatterne bak denne studien (251) ønsket å teste hypotesen om at pasienter med langtidsbruk av warfarin har økt risiko for osteoporotiske brudd. I tillegg ønsket de å kvantitere hvordan andre medikamenter og kliniske faktorer affiserer denne risikoen.

Studien hadde et retrospektivt kohortdesign. Pasientdata ble hentet fra "The National Registry of Atrial Fibrillation". Pasientene som ble rekruttert til studien, ble innlagt med

diagnosen atrieflimmer mellom 1.april 1998 og 31.mars 1999. Kun pasienter hvor man hadde god dokumentasjon av risikofaktorer før innleggelsen, ble inkludert. Pasientene ble inndelt i kohorter ut fra hvorvidt de var blitt behandlet med warfarin i mer enn et år før innleggelsen, warfarinbehandlet i 90-364 dager før innleggelsen, eller ikke fått warfarin tidligere i det hele tatt. Personer som hadde fått warfarin i 1-89 dager før innleggelsen, eller hvor behandlingen var dårlig dokumentert, ble ekskludert. Terminalt syke, eller pasienter som hadde hatt et brudd siste 3 år før innleggelsen, ble heller ikke inkludert. Derimot tok man med pasienter med diagnosen osteoporose i studien. Argumentasjonen for dette var at osteoporose er et ledd i utviklingen, fra bruk av warfarin til osteoporotiske brudd. Hvis disse pasientene ble utelatt, kunne man fått en underestimert av en evt. sammenheng.

Man registrerte så osteoporotiske brudd fra tidspunktet for innleggelsen og videre i observasjonstiden. Osteoporotiske brudd ble definert bl.a. som vertebrale brudd, håndledds- og hoftebrudd. I en sekundær analyse ble lukkede ribbeinsbrudd inkludert.

Resultater

I alt ble 14 564 personer inkludert i studien (83% hvite, omkring 55% kvinner). Gruppen med behandling i mer enn et år (n = 4652), besto av 46.4% menn, gjennomsnittsalderen var 79.4 år. Tilsvarende tall for gruppen med warfarinbehandling i under et år (n = 1905) var 47.2% menn, gjennomsnittlig alder 78.9 år, mens i gruppen uten warfarin (n = 8007) var disse tallene 43.1% menn, alder 80.8 år. Hypertensjon og hjertesvikt var de vanligste komorbide tilstandene, alle sett under ett. I gruppen uten warfarineksposisjon ved baseline, var det signifikant flere kvinner, ikke-hvite, økt falltendens, og signifikant større risiko for nevropsykiatriske lidelser. Loopdiuretika og beta-adrenerge antagonist var de vanligste medikamentene ved innleggelsen, men signifikant oftere foreskrevet i warfarin-gruppene.

Totalt fikk 1005 personer (6.9%) en osteoporotisk fraktur, 387 av disse var ved den første innleggelsen, 618 ble observert senere (median observasjonstid før fraktur, 6.3 mnd.). Hoftebrudd var vanligst (656, 65.3%), dernest vertebrale brudd (198, 19.7%), til sist håndleddsbrudd (105, 10.4%). 46 (4.6%) hadde mer enn ett brudd.

Pasientene med langtidsbehandling hadde signifikant høyere odds for osteoporotiske brudd enn gruppen uten warfarineksposisjon (OR 1.25; 95% CI, 1.06-1.48). Gruppen, som ved baseline hadde fått warfarin i 90-364 dager, hadde ingen økt odds sammenlignet med gruppen uten warfarin (OR, 1.03; 95% CI, 0.82-1.29). Følgende faktorer var uavhengige prediktorer for brudd: økende alder, økt falltendens, hyperthyroidisme, nevropsykiatrisk sykdom og alkoholisme. Beskyttende faktorer var afroamerikansk etnisitet, kjønn (mann) og bruk av beta-adrenerge antagonist.

Videre, da man justerte for kjønn, fant man at warfarinbehandling signifikant økte risikoen for brudd hos menn, men ikke kvinner. Blant mennene var langtidsbruk av warfarin signifikant assosiert med frakturer (OR, 1.63; 95% CI 1.26-2.10) sammenlignet med gruppen uten warfarin ved baseline. Hos kvinner var denne assosiasjonen ikke signifikant (OR, 1.05; 95% CI, 0.88-1.26).

Etter å ha ekskludert frakturere som forelå ved den opprinnelige innleggelsen, var insidensraten av osteoporotiske frakturer hos menn uten warfarin 2.6 (95% CI, 2.1-3.2) pr. 100 pasientår, hos menn med langtidsbruk av warfarin, 3.6 (95% CI, 3.0-4.3). Tilsvarende tall hos kvinner uten warfarin var 5.8 (95% CI, 5.1-6.6) og kvinner med

langtidsbruk av warfarin, 5.4 (95% CI 4.7-6.3) pr. 100 pasientår. Hos menn korrelerte brudd med langtidsbruk av warfarin ($p = 0.01$), hos kvinnene var det ingen slik korrelasjon ($p = 0.6$).

Ribbeinsbrudd ble i en sekundær analyse reklassifisert som osteoporotisk fraktur, det ga kun nonsignifikant sterkere assosiasjon mellom langtidsbruk av warfarin og osteoporotiske brudd. Analysene ble repetert for hvert bruddsted, og warfarin var da assosiert med vertebrale brudd og ribbeinsbrudd, men ikke hofte- og håndleddsbrudd. (Hoftebrudd var assosiert med warfarin hos menn, men ikke kvinner.)

Man justerte så for en rekke confoundere, og stratifiserte etter osteoporose-diagnose (prevalens 16.7%), og fant nå at warfarinbruk var signifikant ($p = 0.02$) korrelert med fraktur i hele kohorten. Sammenlignet med gruppen uten warfarineksposisjon, var risiko for brudd 1.32 (95% CI, 1.08-1.61) i langtidsgruppen, 1.10 (95% CI 0.83-1.42) i korttidsgruppen.

Diskusjon

I denne studien ble langtidsbruk av warfarin funnet å være assosiert med 25% økning i risiko for osteoporotiske brudd, og sterkest forbundet med vertebrale brudd. Da man korrigererte for kjønn, var assosiasjonen fortsatt signifikant hos menn, men ikke hos kvinnene. Forskjellene mellom kjønnene skyldes hovedsakelig hoftebruddene, som hos mennene var assosiert med warfarinbruk, men ikke hos kvinnene. Bruk av medikamentet i mindre enn et år, var ikke korrelert med økt risiko.

Man korrigererte for div. kliniske variabler, men man hadde ikke mulighet til å registrere flere faktorer blant pasientene som er assosiert med osteoporotiske frakturer (røyking, BMD, vitamin D-status, BMI). Hvis noen av disse var korrelert med warfarinbruk, ville man få en confounder-effekt på den observerte assosiasjonen mellom warfarinbruk og risiko for brudd. Videre hadde man ikke mulighet til å verifisere brudd-diagnosene hos pasientene, registreringene var basert på ICD-9-koder i databasen. Dessuten knyttet det seg visse usikkerheter til hvor lenge pasientene hadde vært behandlet med warfarin. Forfatterne kritiseres dessuten for å ikke vise størrelsen på effekten av warfarin på osteoporotiske brudd.

Til tross for begrensningene mener forfatterne at den observerte assosiasjonen mellom langtidsbruk av warfarin og økt risiko for brudd, kan være reell, i hvert fall hos menn med atrieflimmer.

Pilon D, Casilloux AM, Dorais M, Leloir J.

Oral anticoagulants and the risk of osteoporotic fractures among elderly.

Pharmacoepidemiology and drug safety 2004;13:289-294.

På grunnlag av de sprikende konklusjonene fra tidligere undersøkelser, ønsket forfatterne vha. en kasus-kontroll studie, å kaste lys over assosiasjonen mellom osteoporotiske brudd og bruk av oral antikoagulasjon blant eldre (252).

Kasus ble hentet fra Quebec-provinsens helseforsikringsdatabase, og var personer eldre enn 70 år, som i løpet av en toårsperiode (1992-94) pådro seg et osteoporotisk brudd (indeksdato). Databasen inneholdt demografisk, medisinsk og medikamentell informasjon om alle personene 5-7år før studieperioden. Osteoporotiske brudd ble

definert som håndledds- eller hoftebrudd forårsaket av lavenergitraumer, og registreringen av disse skjedde vha. ICD-9-koder eller koder for terapeutiske prosedyrer i databasen. Personer med osteoporotiske brudd 5-7 år tidligere, ble ikke inkludert. Vertebrale brudd ble ikke tatt med, da de ofte er asymptomatiske og oversees, eller ikke krever behandling, slik at databasen ville være upålitelig. Pasienter innlagt i institusjon over lengre tid, eller med cerebralt insult, ble ekskludert pga. risiko for confoundere (immobilitet, evt. paralyse, bruk av heparin, ufullstendig oversikt over medikasjon).

Kontrollene ble hentet fra samme database, var 70 år eller eldre, men uten osteoporotiske brudd. De samme eksklusjonskriteriene gjaldt for disse. For hvert kasus, matchet man 10 kontroller mtp. alder og indeksdato.

Eksposisjon for warfarin ble definert på to måter. Først, bruk av warfarin eller acencoumarol i minst 90 dager i løpet av de siste 5-7 årene før indeksdato, den andre definisjonen tok for seg kumulativ dose og varighet av eksposisjonen (0-90mg eller > 90mg, 0-3mnd eller > 3mnd). De ikke-eksponerte ble derfor de som hadde aldri fått behandling, evt. hadde fått behandling i mindre enn 90 dager eller en samlet dose mindre enn 90 mg.

Forøvrig registrerte man ulike faktorer som potensielt kunne ha confounder-effekt (kjønn, hyperthyreoidisme, bruk av div. medikamenter som tyroksin, benzodiazepiner, trisykliske antidepressiva, L-dopa, statiner, thiazider, kortikosteroider, østrogen-supplement).

Resultater

1523 osteoporotiske brudd (kasus) og 15205 kontroller ble registrert. Gjennomsnittsalderen i populasjonen var 83.2 år. Hoftebrudd var hyppigst (87.7%), distale radiusfrakturer sjeldnere (12.3%). 76.4% av kasus var kvinner, og disse var oftere enn kontrollene eksponert for østrogen tilskudd, medikamenter som kan påvirke BMD (kortikosteroider, tyroksin, thiazider, statiner) eller øke falltendensen (benzodiazepiner, L-dopa, antidepressiva).

Av de 1523 bruddene, hadde 36 fått oral antikoagulasjon i mer enn 90 dager. Andelen eksponerte viste seg å være tilsvarende i kontrollgruppen, 371 av 15205. Man fant ingen signifikant assosiasjon mellom eksposisjon for oral antikoagulasjon (> 90 dager) og osteoporotiske brudd (OR 1.2, 95% CI: 0.9-1.6). Da man inndelte eksposisjonen i enten dose (>90 mg) eller varighet (> 3mnd.), fant man heller ingen signifikant korrelasjon.

Diskusjon

Denne studien omfattet en relativt stor populasjon, og inkluderte 1523 osteoporotiske brudd. Riktignok viste det seg at kun 36 av disse tilfredsstilte kriteriene for eksposisjon, et beskjedent antall. Forfatterne framholder videre som en styrke at databasen ga svært god oversikt over medisinerbruk, både oral antikoagulasjon og andre. Compliance kunne man si lite om, man hadde ikke INR-målinger, men det var mulig å kontrollere at reseptene ble fornyet.

På den andre siden, som forfatterne selv påpeker, hadde de ikke mulighet til å vurdere immobilisering, som er en viktig faktor for BMD. Dette løste de ved å ekskludere pasienter med risiko for immobilisering, likevel kan det være at man ikke har kontrollert godt nok for dette. Man hadde heller ingen oversikt over fedme/BMI. Fedme beskytter mot osteoporotiske brudd, er assosiert med hjertesvikt og dermed atrieflimmer, med

påfølgende antikoagulasjons-behandling. Slik kan man se for seg at fedme confounder resultatene. Indikasjon for behandling, kan være en confounder i studien, på den måten at pasienter med økt falltendens i mindre grad blir foreskrevet orale anticoagulantia.

Forfatterne konkluderer med at man ikke fant noen assosiasjon mellom bruk av oral antikoagulasjon og økt forekomst av hofte- og underarmsbrudd hos eldre. Observasjonen er av betydning for den eldre befolkningen, som er de som rammes av osteoporose og samtidig i størst grad bruker warfarin. Man undersøkte dog ikke vertebrale brudd i denne studien.

Wawrzynska L, Tomkowski WZ, Przedlacki J, Hajduk B, Torbicki A.

Changes in bone density during long-term administration of LMWH or acenocoumarol for secondary prophylaxis of venous thromboembolism

Pathophysiol Haemost Thromb 2003;33:64-67.

Wawrzynska et al. (253) gjorde en nonrandomisert, open-label, prospektiv studie for å estimere påvirkningen av antikoagulasjonsbehandling på BMD hos pasienter med venøs tromboemboli. Studien omfattet bruk av både LMWH og acenocoumarol.

86 pasienter ble inkludert (50% menn, gjennomsnittsalder 48.1 år, range 22-74 år), hvorav 29 fikk acenocoumarol (mål-INR 2.0-3.0) pga. gjentatte episoder med venøs tromboemboli. Hver pasient fikk målt BMD i femur og lumbalcolumna (L2-L4) ved to anledninger (DEXA), først 7-10 dager etter at behandlingen var startet opp, og deretter etter 3, 6, 12 eller 24 mnd., avhengig av hvor lenge profylaksen vedvarte. Z-score ble så estimert for hver pasient (antall SD fra ideell BMD i forhold til alder og kjønn).

Resultater og diskusjon

24 pasienter fikk acenocoumarol i 12 mnd., hos disse ble det observert en gjennomsnittlig reduksjon i BMD målt i femur på 1.8% (Z-score -0.18), målt i lumbalcolumna var reduksjonen 1.72% (Z-score -0.19). Hos 5 pasienter varte profylaksen i 24 mnd., reduksjonen i femurs BMD var her 2.55% (Z-score -0.31), lumbalt 2.32% (Z-score -0.28). Pasientene som fikk ulike varianter av LMWH hadde også reduksjoner i BMD, hvis man sammenlignet disse med pasientene som fikk acenocoumarol, var gjennomsnittlig reduksjon i BMD signifikant større hos pasientene som fikk LMWH ($p < 0.005$).

Forfatterne konkluderer med at langtidseksposisjon for antikoagulasjon medfører konsistent, progressiv reduksjon i BMD, mer markert for LMWH enn for acenocoumarol. De anbefaler målinger av BMD hos pasientene før behandlingen startes opp, og deretter årlig.

Hvis en skal knytte noen kommentarer til denne studien, må det være at populasjonen var svært liten og heterogen (alder, kjønn). Man korrigerer ikke for evt. confoundere, den var nonrandomisert og ikke blindet mtp. det å tillate sammenligninger mellom LMWH og acenocoumarol. Man hadde heller ingen kontrollgruppe.

Sato Y, Honda Y, Kunoh H, Oizumi K.

Long-term Oral Anticoagulation Reduces Bone Mass in Patients with Previous Hemispheric Infarction and Nonrheumatic Atrial Fibrillation

Stroke. 1997;28:2390-2394.

Sato et al. (254) ønsket å evaluere relasjonen mellom vitamin K-status og BMD hos slagpasienter, og særlig hvorvidt en evt. reduksjon i BMD akselereres av langtidsbehandling med warfarin pga. nonreumatisk atrieflimmer etter gjennomgått ischemisk cerebralt insult.

64 hemiplegikere ble inkludert i studien, alle behandlet med warfarin i minst år etter kardioembolisk cerebralt insult, på bakgrunn av nonreumatisk atrieflimmer. Gjennomsnittlig behandlingstid var 5.1 år. Grunner til eksklusjon var bl.a. reumatisk atrieflimmer, behandling med medikamenter som endrer benmetabolismen (kortikosteroider, tyroksin, antikonvulsiva, vitamin D) mfl. Man inkluderte to grupper til i studien, en gruppe bestående av 63 pasienter med hemiplegi pga. atherotrombotiske eller lakunære cerebrale infarkt, som dermed ikke hadde warfarinbehandling. Den siste gruppen besto av 39 friske kontroller. Visse karakteristika ble registrert hos deltagerne, bl.a. sykdomsvarigheten, alder, kjønn, grad av hemiplegi mm.

Man målte vitamin K₁ og K₂ i serum, intakt bone Gla protein (karboksylert osteokalsin), INR og 25-hydroksyvitamin D. Bentetthet ble målt i 2.metacarp bilateralt (vha. computed X-ray densitometry).

Resultater

Pasientgruppene var sammenlignbare mtp. sykdomsvarighet mm. Vitamin K₁ var signifikant lavere i warfarin gr. enn hos kontrollene, pasientgruppen uten warfarin inntok en mellomstilling, men var ikke signifikant forskjellig fra warfarin gruppen. Bone Gla protein var lavere i behandlingsgruppen sammenlignet med pasientgruppen uten warfarin. Vitamin K₂ var ikke signifikant forskjellig mellom noen av gruppene, mens konsentrasjonen av 25-hydroksyvitamin D i serum var lavere i begge pasientgruppene sammenlignet med kontrollgruppen. BMD var signifikant lavere bilateralt i warfarin gr. enn hos de ubehandlede ($p < 0.0001$), men uten forskjell mellom sidene. Hos ubehandlede pasienter var BMD signifikant lavere på den hemiplegiske siden sammenlignet med den friske. I begge pasientgruppene var BMD bilateralt positivt korrelert med vitamin K₁, 25-OHD og grad av fingerparalyse (unntatt BMD på den friske siden og grad av paralyse). I warfarin gruppen var også BGP assosiert med BMD, hvilket ikke ble sett hos de ubehandlede pasientene. Nivå av vitamin K₂ var ikke korrelert med BMD.

Diskusjon

Pasientene som var inkludert i studien, hadde generell dårlig ernæringsstatus med lav konsentrasjon av 25-OHD og vitamin K₁ i serum, hvilket bidro til å forverre benstatus. Likevel synes det, ut fra denne studien, klart at warfarin har ugunstige effekter på helsen hos slagpasienter, og forfatterne argumenterer for at det er redusert karboksylering av osteokalsin, som vist i andre studier, som bidrar til redusert BMD.

Slagpasienter er på basis av flere mekanismer utsatte for frakturer. Warfarinbehandling er vist å redusere forekomst av nye tromboemboliske episoder, men bidrar sannsynligvis ytterligere til den ugunstige situasjonen for benvevet. Man bør derfor

fokusere på hvordan man kan forebygge redusert BMD og frakturer hos slagpasientene, men tilskudd av vitamin K er ikke optimalt, da det reduserer effekten av warfarin.

Caraballo PJ, Gabriel SE, Castro MR, Atkinson EJ, Melton LJ
Changes in Bone Density after Exposure to Oral Anticoagulants: A Meta-analysis
Osteoporos Int 1999;9:441-448

Caraballo et al. (255) lagde en systematisk oversikt over studier som tar for seg effekten av oral antikoagulasjon på BMD. Opprinnelig ble tolv publikasjoner tatt til nærmere undersøkelse, alle var observasjonelle studier, som sammenlignet målinger av BMD i en eksponert gruppe med målinger fra en kontrollgruppe. To av studiene rapporterte data fra samme populasjon, slik at de ble slått sammen. To andre ble ekskludert pga.

ufullstendighet (abstract, korrespondanse). I alt ble ni tverrsnittsstudier inkludert (Piro et al., Houvenagel et al., Fiore et al., Resch et al., Rosen et al., Kiss et al., Philip et al., Lafforgue et al. og Sato et al.). Man registrerte bl.a. karakteristika til de ulike gruppene som var inkludert i undersøkelsene, evt. kriterier for matching av eksponerte og kontroller, og hva slags medikament som var benyttet. Man registrerte også hvor på kroppen målinger av BMD ble foretatt, og med hvilken metodikk det var blitt gjort.

De inkluderte publikasjonene ble også vurdert kvalitetsmessig. Ulike aspekter ved studienes metode ble tildelt poeng utfra hvor stor risiko for bias hvert av disse momentene medførte (3p. – lav risiko, 2p. – moderat risiko, 1p. – informasjon ikke tilgjengelig, 0p. – høy risiko for bias). 8 forhold ble vurdert, (1) seleksjon av den eksponerte gruppen, (2) seleksjon av kontrollgruppen, (3) kriterier for matching, (4) kontroll av confoundere, (5) måling av BMD, (6) bruk av maskering i vurderingen av resultatene, (7) antall inkluderte personer i studien (sample size) og (8) hvilken statistisk metode som ble benyttet. Ut fra dette kunne hver publikasjon oppnå 0-24 poeng.

Man gjorde videre en meta-analyse av resultater fra bentetthetsmålinger fra lokalisasjoner rapportert i mer enn en studie.

Resultater meta-analysen

Fem av studiene konkluderer med at det foreligger redusert BMD i den eksponerte gruppen. Totalt 411 eksponerte (209 menn, 202 kvinner) og 358 kontroller (198 menn, 160 kvinner) var med i metaanalysen. Resultatene fra Sato et al. ble ikke inkludert i analysen, da de var de eneste som målte BMD i 2.metacarp, i tillegg til at populasjonen skilte seg betydelig fra de andre. Piro et al. (248) ble heller ikke inkludert i analysen da studien mangel kontrollgruppe, og populasjonen var heterogen.

Metaanalysen viste at BMD var signifikant redusert hos de eksponerte målt i ultradistale radius (-0.39 SD, 95% CI -0.67 til -0.10, p=0,007), sammenlignet med kontrollene. Derimot oppnådde man ikke signifikante forskjeller mellom gruppene ved collum femoris (SD 0.03, 95% CI .0.22 til 0.29, p = 0.803) eller trochanter femoris (SD - 0.18, 95% CI -0.48 til 0.11, p = 0.219). BMD målt i distale radius og lumbalcolumna viste trend mot redusert bentetthet i den eksponerte gruppen sammenlignet med kontrollgruppen, men reduksjonen var ikke statistisk signifikant noen av stedene (hhv - 0.47 SD, 95% CI -0.97 til 0.04, p = 0.07, og -0.27 SD, 95% CI -0.59 til 0.05, p = 0.092).

De ulike studiene ble, som nevnt, tildelt poeng etter kvalitet (0-24). Piro et al. fikk 7 poeng, Houvenagel et al. 9, Fiore et al. 10, Resch et al. 9, Rosen et al. 14, Kiss et al. 12, Philip et al. 15, Lafforgue et al. 11, mens Sato et al. ble vurdert til 13 poeng.

Diskusjon

Kun i ultradistale radius fant man signifikant reduksjon i BMD hos de eksponerte sammenlignet med kontrollgruppen. Reduksjonen i BMD var på 0,47 SD, og forfatterne argumenterer for at man må se en reduksjon i BMD på minst 1 SD før man kan forvente økt risiko for osteoporotiske frakturer. Legger man dette til grunn, er reduksjonen i BMD i ultradistale radius som ble observert samlet i den eksponerte gruppen, ikke klinisk relevant. Likevel tar forfatterne forbehold, da kun et begrenset antall studier ble inkludert i metaanalysen, samt at disse var relativt forskjellige mtp. metode. Samtidig bemerkes det at tverrsnittstudien er den svakeste varianten av observasjonsstudiene mtp. å evaluere en epidemiologisk sammenheng.

Barnes C, Newall F, Ignjatovic V, Wong P, Cameron F, Jones G, Monagle P

Reduced bone density in children on long-term warfarin

Pediatric Research vol 57(4) april 2005:578-581

En periode som strekker seg fra sen barndom til tidlig ungdom, er svært viktig mtp. å oppnå god maksimal BMD. Barnes et al. (256) ønsket derfor med denne studien å kaste lys over hvilke konsekvenser warfarinbehandling har for BMD hos barn. 17 barn (9 gutter, 8 jenter, gjennomsnittsalder 14.7 år, range 8.6-18.8 år) ble inkludert i en kasus kontroll-studie, disse hadde vært under langtidsbehandling med warfarin i minst et år (gjennomsnittlig varighet 8.2år, gjennomsnittlig alder ved start av behandling 6.8 år). Behandlingsindikasjonene var cyanotisk hjertesykdom (n = 14) og acyanotisk hjertesykdom (n = 1).

Kontrollgruppen (n=321, 215 gutter, 106 jenter) besto av friske barn fra området, i alderen 9-16 år. BMD ble målt lumbalt (L1-L4) hos deltagerne, BMI ble regnet ut.

Resultater og diskusjon

Gruppene var like mtp. BMI. Det var signifikant forskjell mellom gruppenes BMAD ("apparent BMD"), 0.101 g/cm³ i behandlingsgruppen mot 0.116g/cm³ i kontrollgruppen (p < 0.001). Den observerte forskjellen i BMAD økte da man justerte for alder, vekt og høyde.

Pasientgruppen i studien besto av barn med kongenitt hjertefeil. Etiologien bak redusert bentetthet i denne gruppen må kunne antas å være multifaktoriell, da man kan peke på flere forhold som potensielt har negative konsekvenser for benstatus. Likevel kan man ut fra denne studien anta at vitamin K kan være av betydning for benhelsen hos barna.

Forfatterne anbefaler at barn som behandles med warfarin over lengre tid, følges opp med bentetthetsmålinger for å påvise evt. redusert BMD.

Diskusjon

Flere epidemiologiske studier har så langt pekt på en assosiasjon mellom vitamin K-status og aldersrelatert bentap. Noen har brukt fyllokinon i serum som mål på vitamin K-status, men denne parameteren har vist seg å være avhengig av vitamin K-inntaket de siste 24 timene, hvilket begrenser dens betydning. Man har også funnet at graden av underkarboksylering av osteokalsin er assosiert med BMD og frakturrisiko, men så lenge kun bruddstykker av dette proteinets funksjon er kjent, er det vanskelig å tolke resultatene. Osteokalsin synes å regulere mineraliseringen av benvev (76), og kan være av betydning for benkvaliteten (88). Likevel er resultatene sprikende, f. eks. hadde ”knockout mus”, som manglet osteokalsin, økt bendannelse sammenlignet med normale dyr.

Epidemiologiske data som viser sammenheng mellom vitamin K-status og benhelse, kritiseres for å ikke skille vitamin K-mangel fra generell underernæring, som kan medføre confounding av resultatene. Et eksempel er ”Nurses health study” (72327 kvinner), hvor Feskanich et al. fant høyere risiko for hoftibrudd hos de 20% av populasjonen med lavest vitamin K-inntak. Den viktigste kilden til vitamin K i undersøkelsen var salat, hvilket kan gi inntrykk av at høyt vitamin K-inntak var en markør på en sunn livsstil, med kosthold som inneholder mye frukt og grønnsaker hos kvinnene.

I tillegg til dette kommer studier som har undersøkt effekten av vitamin K-tilskudd hos ulike grupper, og både vitamin K₁ og K₂ synes å ha gunstige effekter hos osteoporotikere. Den best karakteriserte fysiologiske funksjonen til vitamin K, er dets rolle ved γ -karboksyleringsreaksjonen av de vitamin K-avhengige proteinene. På grunnlag av dette har man sett for seg at betydningen vitamin K evt. har for benvevet, må være mediert av benproteiner, hvis biologiske funksjon er avhengig av γ -karboksylering av glutamat i aminosyrekjeden. Derfor blir det forvirrende når man ikke observerer tydeligere effekter av langvarig warfarinbehandling på BMD og frakturrisiko, da dette medikamentet nettopp hemmer γ -karboksyleringsreaksjonen. Dette har medført at man har begynt å lete etter alternative fysiologiske mekanismer for vitamin K, og flere in vitro studier har vist tegn til at vitaminet har effekter på benvevet uavhengig av γ -karboksylering. Man har f. eks. sett at vitamin K kan hemme produksjonen av cytokiner (PGE₂, IL-6) som induserer resorpsjon av ben (221,222).

Studier som har undersøkt effekten av warfarin på benstatus har så langt vist svært sprikende resultater. 11 studier publisert før 1999 ble vurdert i en oversiktsartikkel av Caraballo et al. (255), som også gjorde en metaanalyse basert på resultatene. 6 av disse undersøkelsene fant redusert BMD ved langtidsbehandling med warfarin. Metaanalysen viste at oral antikoagulasjon var assosiert med en moderat reduksjon av BMD i ultradistale radius, mens man ikke kunne se signifikante forandringer i hofta eller lumbalcolumna. Reduksjonen av BMD i ultradistale radius lå omkring -0.4 standardavvik, hvilket forfatterne mener ikke vil være klinisk relevant, da de anser at BMD må reduseres omtrent et standardavvik før frakturrisiko øker. I ettertid har flere undersøkelser kommet til, Mamdani et al. (243) og Pilon et al. (252), som ikke observerte noen korrelasjon mellom warfarinbruk og frakturrisiko, mens Gage et al. (251) fant sammenheng mellom oral antikoagulasjon og risiko, i hvert fall i den mannlige delen av populasjonen. Noen forfattere har foreslått at de motstridene resultatene av studiene

skyldes at warfarin hovedsakelig affiserer trabekulært ben, slik at man ikke observerer redusert BMD i målesteder hvor kortikalt ben dominerer. Metaanalysen viste riktignok signifikant reduksjon i BMD kun i ultradistale radius, et område med en betydelig andel trabekulært ben, men samtidig fant man ingen tilsvarende endringer i andre knokler med stor andel trabekulær oppbygning. Andre har hevdet at forandringene kun finnes i det aksiale skjelettet, mens det appendikulære skjelettet ikke påvirkes. Dette samsvarer heller ikke med metaanalysen. På grunnlag av dette er det ikke mulig å konkludere på det nåværende tidspunkt, ytterligere undersøkelser må til.

For å belyse relasjonen mellom bruk av warfarin og osteoporoseutvikling nærmere, vil prospektive longitudinelle studier vært best egnet. Bruddinsidens, målinger av BMD, biokjemiske markører på beturnover og vitamin K-status vil være aktuelle faktorer. Andre parametere og metodikker mtp. vurdering av benkvalitet kan være interessante, f. eks. ultralydundersøkelser eller histomorfometri i benvev.

En norsk forskningsgruppe (257) starter nå en prospektiv kasus-kontroll studie, hvor hovedmålet er å undersøke hvorvidt langtidsbehandling med warfarin fører til utvikling av osteoporose. Samtidig vil de finne ut om tilskudd av vitamin K kan bedre benkvalitet uten å forstyrre pasientenes INR-verdier. Inklusjonskriterier er warfarinbruk i mer enn to år, og alder mellom 50 og 75 år. Eksklusjonskriterier er tilstedeværelse av kliniske faktorer, medisinske tilstander eller medikamentbruk man vet påvirker behelsa. Man planlegger å måle BMD (DEXA), samt undersøke en rekke parametre hos pasientene, deriblant markører på vitamin K-status, benresorpsjon og –dannelse, mm. Ernæringsstatus skal registreres vha. spørreskjema. Det gjenstår å se om man på grunnlag av denne studien kan gi et klart svar på spørsmålet; har warfarin negativ effekt på benvevet.

Svært mange pasienter har warfarin som et viktig ledd i sin behandling, særlig gjelder dette eldre. Blødning har hittil vært den eneste alvorlige bivirkningen man har vært oppmerksom på i forbindelse med bruk av preparatet. Hvis økt frakturrisiko og redusert BMD skulle vise seg å være assosiert med denne behandlingen over tid, er det en viktig erkjennelse, særlig da mange av disse pasientene allerede er i risikozonen for utvikling av osteoporose. Ikke minst vil dette få betydning i framtiden, hvis nye anticoagulantia utvikles som alternativ til warfarin.

Referanser

1. Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995;345:229-234.
2. Drevon CA, Henriksen HB, Sanderud M, Gundersen TE, Blomhoff R. Biologiske effekter av vitamin K og forekomst i norsk kosthold. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2004;124:1650-4.
3. Dialameh GH, Yekundi KG, Olson RE. Enzymatic alkylation of menaquinone-o to menaquinones microsomes from chick liver. *Biochim Biophys Acta* 1970;223:332-8.
4. Weber P. Vitamin K and bone health. *Nutrition* 2001;17:880-7.
5. Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr* 1998; 128:785-8.
6. Conly JM, Stein K. Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. *Am J Gastroenterol* 1992;87:311-16.
7. Ramotar K, Conly JM, Chubb H et al. Production of menaquinones by intestinal anaerobes. *J Infect Dis* 1984;150:213-18.
8. Shearer MJ. Vitamin K metabolism and nutriture. *Blood Reviews* 1992;6:92-104.
9. Ichihashi T, Takagishi Y, Uchida K, Yamada H. Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. *J Nutr* 1992;122:506-12.
10. Barnes RH, Fiala H. Effects of the prevention of coprophagy in the rat. *Vitamin K. Journal of Nutrition* 1959;68:603-614.
11. Uchida K, Komeno T. Relationships between dietary and intestinal vitamin K, clotting factor levels, plasma vitamin K, and urinary Gla. I: Suttie JW (red.). *Current advances in vitamin K research*. Elsevier, New York 1998, 493-498.
12. Hollander D. Intestinal absorption of vitamins A, E, D and K. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1981;97:449-462.
13. Shearer MJ, McCarthy PT, Crampton OE, Mattock MB. The assessment of human vitamin K status from tissue measurements. I: Suttie JW (red.). *Current advances in vitamin K research*. Elsevier, New York 1988;437-452.
14. Vermeer C, Hamulyak K. Pathophysiology of vitamin K-deficiency and oral anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis* 1991;66:153-159.
15. Matschiner JT, Taggart WV. Bioassay of vitamin K by intracardial injection in deficient adult male rats. *Journal of Nutrition* 1968;94:57-59.
16. Suttie JW, Mummah-Schendel LL, Shah DV, Lyle BJ, Greger JL. Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 1988;47:475-480.
17. Usui Y, Tanimura H, Nishimura N, Kobayashi N, Okanoue T, Ozawa K. Vitamin K concentrations in the plasma and liver of surgical patients. *American Journal of clinical nutrition* 1990;51:846-852.
18. Savage D, Lindenbaum J. Clinical and experimental human vitamin K deficiency. I: Lindenbaum J (red.), *Nutrition in hematology*. Chrchill Livingstone, New York 1983, 271-230.
19. Shearer MJ, McBurney A, Barkhan P. Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man. *Vitamins and Hormones* 1974;32:513-542.
20. Booth SL, Lichtenstein AH, Dallal GE. Phylloquinone absorption from phylloquinone-fortified oil is greater than from a vegetable in younger and older men and women. *J Nutr* 2002;87:543-53.
21. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr* 1989;50:100-8.
22. Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinone transport and its influence on γ -carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1993;58:204-8.
23. Schurgers LJ, Vermeer C. Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 2002;1570:27-32.
24. Shearer MJ, Bach A, Kohlmeier M. Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J Nutr* 1996;126:1181S-6S.
25. Hodges SJ, Bach A, Leclercq M et al. Detection and measurement of vitamins K1 and K2 in human cortical and trabecular bone. *J Bone Miner Res* 1993;8:1005-8.
26. Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br J Nutr* 1994;72:415-425.
27. Olson Re, Chao J, Gramham D et al. Total body phylloquinone and its turnover in human subjects at two levels of vitamin K intake. *Br J Nutr* 2002;87:543-53.

28. Sandström B, Aro A, Becker W et al. Nordiska näringsrekommendationer 1996. København: Nordisk ministerråd, 1996:28.
29. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S et al. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 2001;101:294-301.
30. Johansson L, Solvoll K. NORKOST 1997. Landsomfattende kostholdsundersøkelse blant menn og kvinner i alderen 16-79 år. Oslo: Statens råd for ernæring og fysisk aktivitet, 1999.
31. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr* 2000;130:1877-1880.
32. Brosstad F. Hemostasemekanismene. I: Stokke O. (red.). *Klinisk biokjemi og fysiologi*. Gyldendal akademisk, Oslo; 2000: 23-37.
33. Vermeer C, Hamulyak K. Pathophysiology of vitamin K-deficiency and oral anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis* 1991;66:153-159.
34. Wallin R, Patrick SD, Ballard JO. Vitamin K antagonism of coumarin intoxication in the rat. *Thrombosis and Haemostasis* 1986;55:235-39.
35. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Haemostasis and thrombosis. I: Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1999:310-327.
36. Wallin R, Martin LF. Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver: effects of warfarin. *Journal of clinical investigation* 1985;76:1879-1884.
37. Wallin R. Vitamin K antagonism of coumarin anticoagulation: a dehydrogenase pathway in rat liver is responsible for the antagonistic effect. *Biochemical Journal* 1986;236:685-693.
38. Melien Ø, Johansen PW, Westergren T, Rugstad HE. Vitamin K i matvarer og effekt av warfarin. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2003;123:1862-3.
39. Dam H. The antihaemorrhagic vitamin of the chick. Occurrence and chemical nature. *Nature (Lond)* 1935;135:652-3.
40. Broze GJ Jr. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:8-13.
41. Esmon CT, Suttie JW, Jackson CM. The functional significance of vitamin K action. Difference in phospholipids binding between normal and abnormal prothrombin. *J. Biol. Chem.* 1975;250:4095-4099.
42. Pettifor JM, Benson R. Congenital malformations associated with the administration of oral anticoagulants during pregnancy. *Journal of pediatrics* 1975;86:459-462.
43. Hall JG, Pauli RM, Wilson KM. Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy. *Am J Med* 1980;68:122.
44. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982;79:7734-7738.
45. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1975;72:3925-3929.
46. Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1976;73:1447-1451.
47. Pauli RM, Lian JB, Mosher DF, Suttie JW. Association of congenital deficiency of multiple vitamin K-dependent coagulation factors and the phenotype of the warfarin embryopathy: clues to the mechanism of teratogenicity of coumarin derivatives. *Am J Hum Gen* 1981;41:566-583.
48. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla-protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:765-71.
49. Ferland G. The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev* 1998;56:223-30.
50. Tsaïou N. Vitamin K-dependent protein in the developing and aging nervous system. *Nutr. Rev.* 1999;57:231-40.
51. Prieto AL, Weber JL, Tracy S et al. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 1999;816:646-61.
52. Tabb MM, Sun A, Zhou C et al. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003;278:43919-27.
53. Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:2118-32.
54. Kulman JD, Harris JE, Haldeman BA, Davie EW. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich γ -carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;94:9058-62.

55. Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW. Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1370-5.
56. Nakagawa Y, Abram V, Parks JH, Laus HSH, Kawooya JH, Coe FL. Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin Invest* 1985;76:1455-1462.
57. Nakagawa Y, Achmed M, Hall SL, Deganello S, Coe FL. Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. *J Clin Invest* 1987;79:1782-1787.
58. Nakagawa Y, Abram V, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL. Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium monohydrate crystal growth in human urines. *J Biol Chem* 1983;258:12594-12600.
59. Knapen MHJ, Hamulyak K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla-protein) and urinary calcium excretion. *Ann Int Med* 1989;111:1001-1005.
60. Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* 1995;125:1812-1821.
61. Pastoreau P, Vergnaud P, Meunier PJ, Delmas PD. Osteopenia and bone-remodeling abnormalities in warfarin-treated lambs. *J Bone Miner Res* 1993;12:1417-1426.
62. Nishimoto SK, Price PA. Secretion of the vitamin K-dependent protein of bone rat osteosarcoma cells. Evidence for an intracellular precursor. *J Biol Chem* 1980;255:6579-6583.
63. Looker AC, Bauer DC, Chesnut CH, Gundberg CM, Hochberg MC, Klee G et al. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions. *Osteoporos Int* 2000;11:467-480.
64. Poser JW, Price PA. A method for decarboxylation of γ -carboxy glutamic acid in proteins. *J Biol Chem* 1979;254:431-436.
65. Boskey AL, Wians FH Jr, Hauschka PV. The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue* 1985;37:75.
66. Hauschka PV, Frenkel J, DeMuth R, Gundberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem* 1983;258:176-182.
67. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;317:59-64.
68. Romberg RW, Werness PG, Biggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986;25:1176-1180.
69. Hauschka PV, Reid ML. Times appearance of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in developing chick bone. *Dev Biol* 1978;65:426-434.
70. Lian JB, Roufosse AH, Reit B, Glimcher MJ. Concentrations of osteocalcin and phosphoprotein as a function of mineral content and age in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 1982;34:S82-S87.
71. Price PA, Baukol SA. 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1980;255:11660-63.
72. Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Increase in serum bone γ -carboxyglutamic acid protein with aging in women. *J Clin Invest* 1983;71:1316-1321.
73. Johansen JS, Thomsen K, Christiansen C. Plasma bone Gla protein concentrations in healthy adults. Dependence on sex, age, and glomerular filtration. *Scand J Clin Lab Invest* 1987;47:345-350.
74. Orwoll ES, Deftos LJ. Serum osteocalcin (BGP) levels in normal men: a longitudinal evaluation reveals an age-associated increase. *J Bone Miner Res* 1990;5:259-262.
75. Vanderschueren D, Gevers G, Raymaekers G, Devos P, Dequeker J. Sex- and age-related changes in bone and serum osteocalcin. *Calcif Tiss Int* 1990;46:179-182.
76. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448-452.
77. Heersche JN, Reimers SM, Wrana JL, Waye MM, Gupta AK. Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. *Proc Finn Den Soc* 1992;88(Suppl 1):173-182.
78. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpas PH. Transglutaminase-catalyzed cross-linking of osteopontin is inhibited by osteocalcin. *J Biol Chem* 1997;272:22736-22741.
79. Price PA, Lothringer JW, Baukol SA, Reddi AH. Developmental appearance of the vitamin K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr* 1988;8:865.

80. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zamboni G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intra-cellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994;127:1149-1158.
81. DeFranco DJ, Glowacki J, Cox KA, Lian JB. Normal bone particles are preferentially resorbed in the presence of osteocalcin-deficient bone particles in vitro. *Calcif Tissue Int* 1991;49:43-50.
82. Glowacki J, Cox KA, Wilcon S. Impaired osteoclast differentiation in subcutaneous implants of bone particles in osteopetrotic mutants. *Bone Miner* 1989;5:271-278.
83. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 1991;45:292-302.
84. Ingram RT, Park YK, Clarke BL, Fitzpatrick LA. Age- and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone. Possible involvement of osteocalcin in bone remodeling. *J Clin Invest* 1994;93:989-997.
85. Liggett WH, Lian JB, Greenberger JS, Glowacki J. Osteocalcin promotes differentiation of osteoclast progenitors from murine long-term bone marrow cultures. *J Cell Biochem* 1994;55:190-99.
86. Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GL, Senior RM, Kahn AJ. Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* 1982;92:227.
87. Price PA, Williamson MK. Effects of warfarin on bone. *J Biol Chem* 1981;256: 12754-12759.
88. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998;23:187-196.
89. Glowacki J, Lian JB. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ* 1987;21:247-254.
90. Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y. Comparison of inhibitory effects of warfarin on γ -carboxylation between bone and in rats. *J Bone Miner Metab* 2005; 23:366-372.
91. Khosla S, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. I: Favus MJ (red.). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1999:128.
92. Severson AR, Ingram RT, Schwartz RS, Fitzpatrick LA. Matrix proteins associated with bone calcification are present in human aortic vascular smooth muscle cell. *Circulation* 1994;88(1):367.
93. Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, Grasser WA, Nishimoto SK, Thompson DD. Production of osteocalcin by platelets: a potentially important link of platelet action in bone turnover. *J Bone Miner Res* 1993; (suppl 1)8: S147 (abs).
94. Furie BC, Furie B. Structure and mechanism of the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase: recent advances from mutagenesis studies. *Thromb Haemost* 1997;78:595-598.
95. Suttie JW. Vitamin K and human nutrition. *J Am Diet Assoc* 1992;92:585-590.
96. Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr* 1996;63:566-73.
97. Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone Gla protein) in elderly women. *J Bone Miner Res* 1991;6:1211-1216.
98. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new (gamma)-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:765-771.
99. Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985;260:14971-14975.
100. Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8:357-375.
101. Fraser JD, Price PA. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. *J Biol Chem* 1988;263:11033-36.
102. Price PA. Gla-containing proteins of bone. *Connect Tiss Res* 1989;21:51-60.
103. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:76-81.
104. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature Genetics* 1999;21:142-44.

105. Menger H, Lin AE, Toriello HV et al. Vitamin K deficiency embryopathy: a phenocopy of the warfarin embryopathy due a disorder of embryonic vitamin K metabolism. *Am J Med Genet* 1997;72:129-134.
106. Meier M, Weng LP, Alexandrakis E, Ruschoff J, Goeckenjan G. Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J* 2001;17:566-9.
107. Shanahan CM, Cary NRB, Salisbury JR et al. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-2176.
108. Shearer MJ. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:433-438.
109. Vermeer C, Shearer MJ, Zittermann A, Bolton-Smith C, Szulc P, Hodges S, Walter P, Rambeck W, Stöcklin E, Weber P. Beyond deficiency: potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health. *Eur J Nutr* 2004;43: 325-335.
110. Price PA, Faus SA, Williamson MK: Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1400-1407.
111. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells: a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999;82:1764-1767.
112. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:317-327.
113. Boström KI. Cell differentiation in vascular calcification. *Z Kardiol* 2000;89(Suppl 2):69-74.
114. Frye MA, Melton LJ III, Bryant SC et al. Osteoporosis and calcification of the aorta. *Bone Min* 1992;19:185-194.
115. Jie K-SG, Bots ML, Vermeer C, Wittemann JCM, Grobbee DE. Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis* 1995;116:117-23.
116. Geleijnse JM, Vermeer C, Schurgers LJ, Grobbee DE, Pols HAP, Witteman JCM. Inverse association of dietary vitamin K-2 intake with cardiac events and aortic atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Thromb Haemost* (Suppl July):P473.
117. Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Dechavanne M, Delmas PD. Protein-S, a vitamin K dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblast. *Endocrinology* 1994;130:1599-1604.
118. Pan EY, Comperts ED, Millen R, Gilsanz V. Bone mineral density and its association with inherited protein S deficiency. *Thromb Res* 1990;58:221-231.
119. Halse J, Nilsen KH (red). Osteoporose for helsepersonell. Medisinsk informasjonsgruppe for osteoporose, Oslo 2003.
120. Thane CW, Bates CJ, Shearer MJ, Unadkat N, Harrington DJ, Paul AAm Prentice A, Bolton-Smith C. Plasma phylloquinone (vitamin K1) concentration and its relationship to intake in a national sample of British elderly people. *Brit J Nutr* 2002; 87:615-622.
121. Bolton-Smith C, Price RJG, Fenton ST, Harrington DJ, Shearer MJ. The relationship between plasma and dietary phylloquinone (vitamin K1) in Scottish adults. *Proc Nutr Soc* 1998;57:148A.
122. Bolton-Smith C, Price RJG, Shearer MJ. Decreasing phylloquinone (vitamin K1) and total fat intake in a 10-year longitudinal study of Scottish adults. *Proc Nutr Soc* 2000;59:24A.
123. Fenton ST, Bolton-Smith C, HarringtonD, Shearer MJ. Intra- and inter-individual variability and lack of seasonal variation of plasma phylloquinone (vitamin K1) for Scottish men and women. *Proc Nutr Soc* 2000;59:32A.
124. Schurgers LJ, Geleijnse JM, Grobbee DE, Pols HAP, Hofman A, Witteman JCM, Vermeer C. Nutritional intake of vitamins K-1 (phylloquinone) and K-2 (menaquinone) in The Netherlands- *J Nutr Environ Med* 1999;9:115-122.
125. Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr* 1998;128:785-788.
126. McKeown NM, Jaques PF, Gundberg CM, Peterson JW, Tucker KL, Kiel DP, Wilson PWF, Booth SL. Dietary and nondietary determinants of vitamin K biochemical measures in men and women. *J Nutr* 2002;132:1329-1334.
127. Schurgers LJ. Studies on the role of vitamin K1 and K2 in bone metabolism and cardiovascular disease. Thesis, Maastricht, ISBN 90.5681-138-X.

128. Mattock M, Shearer MJ, Rahim S, Redmond S, El-Gohari R, Barkhan P. The plasma transport of vitamin K1 (phylloquinone) in hyperlipoproteinaemia. *Clinical science* 1983;64:63p.
129. Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T et al. 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* 2001;17:315-21.
130. Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaion KI, Sadowski J. Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary γ -carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1997;65:779-784.
131. Booth SL, Martini L, Peterson JW, Saltzman E, Dallal GE, Wood RJ. Dietary phylloquinone depletion and repletion in older women. *J Nutr* 2003;133:2565-2569.
132. Jie KS, Hamulyak K, Gijsbers BL, Roumen FJ, Vermeer C. Serum osteocalcin as a marker for vitamin K-status in pregnant women and their newborn babies. *Thromb Haemost* 1992;68:388-91.
133. Widdershoven J, van Munster P, De Abreu R, Bosman H, van Lith T, van der Putten-van Meyel M, Motohara K, Matsuda I. Four methods compared for measuring des-carboxy-prothrombin (PIVKA-II). *Clin Chem* 1987;33:2074-8.
134. Binkley NC, Kreuger DC, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under- γ -carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1523-8.
135. Binkley NC, Krueger DC, Kawahara TH, Engelke JA, Chapell RJ, Suttie JW. A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin γ -carboxylation. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1055-60.
136. Sokoll LJ, O'Brien ME, Camilo ME, Sadowski JA. Undercarboxylated osteocalcin and development of a method to determine vitamin K status. *Clin Chem* 1995;41:1121-1128.
137. Gundberg CM, Nieman SD, Abrams S, Rosen H. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3258-3266.
138. Ferland G, Sadowski JA, O'Brien ME. Dietary induced subclinical vitamin K-deficiency in normal human subjects. *J Clin Invest* 1993;91:1761-8.
139. Paiva SAR, Sepe TE, Booth SL et al. Interaction between vitamin K nutriture and bacterial overgrowth in hypochlorhydria induced by omeprazole. *Am J Clin Nutr* 1998;68:699-704.
140. Bach AU, Anderson SA, Foley AL, Williams EC, Suttie JW. Assessment of vitamin K status in human subjects administered "minidose" warfarin. *Am J Clin Nutr* 1996;64:894-902.
141. Camilo ME, Jatoi A, O'Brien ME et al. Bioavailability of phylloquinone from an intravenous lipid emulsion. *Am J Clin Nutr* 1998;67:716-21.
142. Kindberg CG, Suttie JW. Effect of various intakes of phylloquinone on signs of vitamin K deficiency and serum and liver phylloquinone concentrations in the rat. *J. Nutr.* 1989;119:175-180.
143. Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T. Vitamin K status in healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for γ -carboxylation of osteocalcin. *Am J Clin Nutr* 2006;83:380-6.
144. Booth SL, Gundberg CM, McKeown NM, Morse MO, Wood RJ. Vitamin K depletion increases bone turnover. *J Bone Miner Res* 1999;14:S393(abstr).
145. Knapen MH, Jie KS, Hamulyak K, Vermeer C. Vitamin K-induced changes in markers for osteoblast activity and urinary calcium loss. *Calcif Tissue Int* 1993;53:81-5.
146. Douglas AS, Robins SP, Hutchinson JD, Poter RW, Stewart A, Reid DM. Carboxylation of osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women following vitamin K and D supplementation. *Bone* 1995;17:15-20.
147. Hart JP, Shearer MJ, Klenerman L et al. Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K1 in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:128.
148. Hodges SJ, Pilkington MJ, Stamp TCB et al. Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck. *Bone* 1991;12:387.
149. Kanai T, Takagi T, Masuhiro K, et al. Serum vitamin K level and bone mineral density in post-menopausal women. *Gynecol Obstet* 1997;56:25.
150. Hodges SJ, Akesson K, Vergnaud P, Obrant K, Delmas PD. Circulating levels of vitamins K1 and K2 decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 1993;8:1241.
151. Tamatani M, Morimoto S, Nakajima M, et al. Participation of decreased circulating levels of vitamin K in bone mineral loss of elderly men. *J Bone Miner Res* 1995;10:S248.

152. Tamatani M, Morimoto S, Nakajima M., et al. Decreased circulating levels of vitamin K and 25-hydroxyvitamin D in osteoporotic elderly men. *Metabolism* 1998;47:195.
153. Compston JE, Judd D, Crawley EO, et al. Osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1987;28:410-15.
154. Schoon EJ, Müller MCA, Vermeer C, Schurgers LJ, Brummer R-JM, Stockbrügger RW: Low serum and bone vitamin K status in patients with longstanding Crohn's disease: another pathogenetic factor of osteoporosis in Crohn's disease? *Gut* 2001;48:473-77.
155. Compston JE. Boning up on vitamin K. *Gut* 2001;48:448-450.
156. Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993;91:1769.
157. Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow-up study. *Bone* 1996;18:487.
158. Szulc P, Arlot M, Chapuy MC, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res* 1994;9:1591.
159. Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 1998; 62:286-289.
160. Jie KSG, Bots ML, Vermeer C, Witteman JCM, Grobbee DE. Vitamin K status and bone mass in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Calcif Tissue* 1996;59:352-356.
161. Sugiyama T, Kawai S. Carboxylation of osteocalcin may be related to bone quality: a possible mechanism of bone fracture prevention by vitamin K. *J Bone Miner Metab* 2001;19:146.
162. Kawana K, Takahashi M, Hoshino H, Kushida K. 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. *Endocr Res* 2001 Aug; 27(3):337-43.
163. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G, Kamihagi K, Delmas PD: Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 719-724.
164. Knapen MHJ, Nieuwenhuijzen Kruseman AC, Wouters RSME, Vermeer C. Correlation of serum osteocalcin fractions with bone mineral density in women during the first 10 years after menopause. *Calcif Tissue Int* 1998;63:375-379.
165. Luukinen H, Käkönen S-M, Petterson K, Koski K, Laippala P, Lövgren T, Kivela S-L, Väänänen HK. Strong prediction of fractures among older adults by the ratio of carboxylated to total serum osteocalcin. *J Bone Miner Res* 2000;15: 2473-2478.
166. Horiuchi T, Kazama H, Araki A, et al. Impaired gamma carboxylation of osteocalcin in elderly women with type II diabetes mellitus: relationship between increase in undercarboxylated osteocalcin levels and low bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 2004;22:236-240.
167. Sato Y, Kaji M, Tsuru T, Satoh K, Kondo I. Vitamin K deficiency and osteopenia in vitamin D-deficient elderly women with parkinson's disease. *Ach Phys Med Rehabil* 2002;83:86-91.
168. Chantraine A, Nussgens B, Lapiere CM. Bone remodeling during the development of osteoporosis in paraplegia. *Calcif Tissue Int* 1986;38:323-7.
169. Sato Y, Honda Y, Hayashida N, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Vitamin K deficiency and osteopenia in elderly women with Alzheimer's disease. *Arch Phys Med Rehabil* 2005;86:576-81.
170. Conway SP, Wolfe SP, Bronwlee KG, et al. Vitamin K status among children with cystic fibrosis and its relationship to bone mineral density and bone turnover. *Pediatrics* 2005;115:1325-1331.
171. Vermeer C, Knapen MHJ, Jie KSG, Grobbee DE. Physiological importance of extra-hepatic vitamin K-dependent carboxylation reactions. *Ann NY Acad Sci* 1992;669:21.
172. Feskanich D, Weber P, Willett WC, et al. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999;69:74.
173. Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1201-8.
174. Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, et al. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 2003;77:512-6.
175. Booth SL, Broe KE, Peterson JW, Cheng DM, et al. Associations between vitamin K biochemical measures and bone mineral density in men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4904-9.

176. Braam LAJLM, Knapen MHJ, Geusens P, Brouns F, Hamulyak K, Gerichhausen MJW, Vermeer C. Vitamin K1 supplementation retards bone loss in postmenopausal women between 50 and 60 years of age. *Calcif Tissue Int* 2003;73:21-26.
177. Melton LJ III, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Relationships of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 1997;12:1083-1091.
178. Cauley JA, Gutai JP, Sandler RB, LaPorte Re, Kuller LH, Sashin D. The relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1986;124:752-761.
179. Ensrud KE, Palermo L, Black DM, Cauley J, jergas M, Orwoll ES, Nevitt MC, Fox KM, Cummings SR. Hip and calcaneal bone loss increase with advancing age: longitudinal results from the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1778-1787.
180. Tse SLS, Chan TYK, WU DMY, Cheung AYK, Kwok TCY. Deficient dietary vitamin K intake among elderly nursing home residents in Hong Kong. *Asia Pacific J Clin Nutr* 2002;11:62-65.
181. Simonen O, Mikkola T. Senile osteoporosis and femoral neck fractures in long-stay institutions. *Calcif Tissue Int* 1991;149:S78-S79.
182. Rejnmark L, Vestergaard P, Charles P, Hermann AP, Brot C, Eiken P, Mosekilde L. No effect of vitamin K1 intake on bone mineral density and fracture risk in perimenopausal women. *Osteoporos Int* 2006;17:1122-1132.
183. Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T, et al. 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* 2001;17:315-21.
184. Kalkwarf HJ, Khoury JC, Bean J, Elliot JG. Vitamin K, bone turnover, and bone mass in girls. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1075-80.
185. Plantalech LC, Chapuy MC, Guillaumont M, et al. Impaired carboxylation of serum osteocalcin in elderly women: effect of vitamin K1 treatment. I: Christiansen C, Overgaard K (red.). *Osteoporose 1990*. København: osteopress Aps 1990;345.
186. Sokoll LJ, Booth SL, Davidson KW, Dallal GE, Sadowski JA. Diurnal variation in total and undercarboxylated osteocalcin: influence of increased dietary phylloquinone. *Calcif Tissue Int* 1998;62:447-52.
187. Booth SL, O'Brien-Morse ME, Dallal GE, Davidson KW, Gundberg CM. Response of vitamin K status to different intakes and sources of phylloquinon-rich foods: comparison of younger and older adults. *Am J Clin Nutr* 1999;70:368-77.
188. Delmas PD, Demiaux B, Malaval L, et al. Serum bone gamma-carboxylated acid-containing protein in primary hyperparathyroidism and in malignant hypercalcemia, Comparison with bone histomorphometry. *J Clin Invest* 1986;77:985-91.
189. Caillot-Augusseau A, Vico L, Heer M, et al. Spca flight is associated with rapid decreases of undercarboxylated osteocalcin and increases of markers of bone resorption without changes in their circadian variation: observations in two cosmonauts. *Clin Chem* 2000;46:1136-43.
190. Craciun AM, Wolf J, Knapen MHJ, Brouns F, Vermeer C. Improved bone metabolism in female elite athletes after vitamin K supplementation. *Int J Sports Med* 199;19:479-84.
191. Schaafsma A, Muskiet FAJ, Storm H, et al. Vitamin D3 and vitamin K1 supplementation of Dutch postmenopausal women with normal and low bone mineral densities: effects on serum 25-hydroxyvitamin D and carboxylated osteocalcin. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:626.
192. Shearer MJ. The roles of vitamin s D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc Nutr Soc* 1997;56:915-37.
193. Meunier PJ. Calcium, vitamin D and vitamin K in the prevention of fractures due to osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1999;9:48-51.
194. Takahashi M, Naitou K, Ohishi T, Kushida K, Miura M. Effect of vitamin K and/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. *Clin Endocrinol* 2001;54:219.
195. Orimo H, Shiraki M, Tomita A, et al. Effects of menatetrenone on the bone and calcium in osteoporosis: a double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Metab* 1998;16:106.
196. Miki T, Nakatsuka K, Naka H, et al. Vitamin K₂ (menaquinone 4) reduces serum undercarboxylated osteocalcin level as early as 2 weeks in elderly women with established osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2003;21:161-165.

197. Bolton-Smith C, Mole PA, McMurdo MET et al. Two-year intervention study with phylloquinone (vitamin K1), vitamin D and calcium: effect on bone mineral content. *Ann Nutr Metab* 2001;45:346.
198. Akjba T, Kurihara S, Tachibana K, et al. Vitamin K (K2) increased bone mass in hemo-dialysis patients with low-turnover bone disease. *J Am Soc Nephrol* 1991;608:42P.
199. Orimo H, Shiraki M, Fujita T, et al. Clinical evaluation of Menatetrenone in the treatment of involutinal osteoporosis – a double-blind multicenter comparative study with 1 α -hydroxyvitamin D3. *J Bone Miner Res* 1992;7(Suppl 1):S122.
200. Iwamoto J, Kosh S, Noguchi S, et al. A longitudinal study of the effect of vitamin K2 on bone mineral density in postmenopausal women: a comparative study with vitamin D3 and estrogen-progestin therapy. *Maturitas* 1999;31:161-64.
201. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effect of combined administration of vitamin D3 and vitamin K2 on bone mineral density of the lumbar spine in postmenopausal women with osteoporosis. *J Orthop Sci* 2000;5:546.
202. Ishida Y, Soh H, Ogawa S, Kawahara, Murahata H. A one-year randomized controlled trial of hormone replacement therapy, bisphosphonate, calcitonin, vitamin D and vitamin K in women with postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15(suppl 1):S310.
203. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15:515.
204. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Combined treatment with vitamin K2 and bisphosphonate in postmenopausal women with osteoporosis. *Yonsei Med J* 2003;44:751-56.
205. Ushiroyama T, Ikeda A, Ueki M. Effect of continous combined therapy with vitamin K2 and vitamin D3 on bone mineral density and coagulofibrinolysis function in postenopausal women. *Maturitas* 41:2002:211-221.
206. Ozuru R, Sugimoto T, Yamaguchi T, Chihara K. Time-dependent effects of vitamin K2 (menatetrenone) on bone metabolism in postmenopausal women. *Endocr J.* 2002;49:363-70.
207. Sato Y, Honda Y, Kuno H, Oizumi K. Menatetrenone ameliorates osteopenia in disuse-affected limbs of vitamin D- and K-deficient stroke patients. *Bone* 1998;23:291-296.
208. Plaza SM, Lamson DW. Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Alternative Medicine Review* 2005;10:24-35.
209. Sato Y, Honda Y, Kaji M, et al. Amelioration of osteoporosis by menatetrenone in elderly female Parkinson's disease patients with vitamin D deficiency. *Bone* 2002; 31:114-118.
210. Yonemura K, Kimura M, Miyaji T, Hishida A. Short-term effect of vitamin K administration on prednisolone-induced loss of bone mineral densitu in patients with chronic glomerulonephritis. *Calcif Tissue Int* 2000;66:123-128.
211. Yonemura K, Fukasawa H, Fujigaki Y, Hishida A. Protective effect of vitamins K2 and D3 on prednisolone-induved loss of bone mineral density in the lumbar spine. *Am J Kidney Dis* 2004;43:53-60.
212. Inoue T, Sugiyama T, Matsubara T., et al. Inverse correlation between the changes of lumbar bone mineral density and serum undercarboxylated osteocalcin after vitamin K2 (menatetrenone) treatment in children treated with glucocorticoid and alfacalcidol. *Endocr J* 2001;48:11-18.
213. Somekawa Y, Chicuchi M, Harada M, Ishibashi T. Use of vitamin K2 (menatetrenone) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the prevention of bone loss induced by leuprolide. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2700-2704.
214. Nishiguchi S, Shimoi S, Kurooka H, et al. Randomized pilot trial of vitamin K2 for bone loss in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001;35:543-535.
215. Iketani T, Kiriike N, Murray, et al. Effect of menatetrenone (vitamin K2) treatment on bone loss in patients with anorexia nervosa. *Pasychiatry Res* 2003;117:259-269.
216. Malt UF, Retterstøl N, Dahl AA. Spiseforstyrrelser. I: Lærebok i psykiatri. Gyldendal Akademisk, Oslo 2003, s 526
217. Koshihara Y, Hoshi K. Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997;12:431-438.
218. Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi H, et al. Vitamin K2 promotes 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃-induced mineralization in human periosteal osteoblasts. *Calcified Tissue International* 1996;59:466-473.
219. Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Fujita T. Vitamin K₂ inhibits adipogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures. *Bone* 2000;27:769-776.

220. Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, et al. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteocalstogenesis in human bone marrow cell culture. *J Endocrinol* 2003;176:339-348.
221. Reddi K, Henderson B, Meghji S, et al. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds. *Cytokine* 1995;7:287-290.
222. Koshihara Y, Hoshi K, Shiraki M. Vitamin K₂ (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity. *Biochemical Pharmacology* 1993;46:1355-1362.
223. Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, et al. Effect of vitamin K₂ on osteoblast apoptosis: vitamin K₂ inhibits apoptotic cell death of human osteoblast induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine. *J Lab Clin Med* 2000;136:181-93.
224. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grün F, et al. Vitamin K₂ regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003;278:43919-43927.
225. Price PA, Williamson MK. Effects of warfarin on bone. *J Biol chem.* 1981;12754-12759.
226. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7734-38.
227. Parfitt AM. The coupling of bone resorption to bone formation: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis & Relat Res* 1981;4:1-6.
228. Haffa A, Krueger D, Bruner J, et al. Diet- or warfarin-induced vitamin K insufficiency elevates circulating undercarboxylated osteocalcin without altering skeletal status in growing female rats. *J Bone Miner Res* 2000;15:872-878.
229. Gundberg CM, Grant FD, Conlin PR, et al. Acute changes in serum osteocalcin during induced hypocalcemia in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:438-443.
230. Simon RR, Beaudin SM, Johnston M, Walton KJ, Shaughnessy SG. Long-term treatment with sodium warfarin results in decreased femoral bone strength and cancellous bone volume in rats. *Thrombosis Research* 2002;105:353-358.
231. Price PA, Kaneda Y. Vitamin K counteracts the effect of warfarin in liver but not in bone. *Thromb Res* 1987;46:121-131.
232. Notoya K, Yoshida K, et al. Similarities and differences between the effects of ipriflavone and vitamin K on bone resorption and formation in vitro. *Bone* 1995; 16:349S-53S.
233. Dodds RA, Catterall A, Bitensky L, Chayen J. Effects on fracture healing of an antagonist of the vitamin K cycle. *Calcif Tissue Int* 1984;36:233-238.
234. Einhorn TA, Gundberg CM, Devlin VJ, Warman J. Fracture healing and osteocalcin metabolism in vitamin K deficiency. *Clin Orthop Relat Res* 1988;237:219-25.
235. Pietschmann P., Woloszczuk W., Panzer S., Kyrle P., Smolen J. Decreased serum osteocalcin levels in phenprocoumon-treated patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 May;66 (5):1071-4.
236. Menon RK, Gill DS, Thomas M, Kernoff PBA, Dandona P. Impaired carboxylation of osteocalcin in warfarin-treated patients. *J Clin Endo Met* 1987;64;1:59-61.
237. van Haarlem LJ, Knapen MH, Hamulyak K, Vermeer C. Circulating osteocalcin during anticoagulant therapy (abstr). *Thromb Haemost.* 1988 Aug 30;60(1):79-82.
238. Van der Linden T, Houvenagel E, Graux P, Leloire O, Forzy G, Cabaret P, Tison F, Marchandise X, Dutoit A, Vincent G, et al. Effects on the bone metabolism of long-term treatment with antivitamins K1. *An Cardiol Angeiol (Paris)* 1991 Sep; 40 (7):405-407.
239. Knapen MHJ, Hellemons-Boode BSP, Mangenberg-Ledeboer M, Knottnerus JA, Hamulyak K, Price PA, Vermeer C. Effect of oral anticoagulant treatment on markers for calcium and bone metabolism. *Haemostasis* 2000;30:290-297.
240. Jie KS, Gijssbers BL, Knapen MH; Hamulyak K, Frank HL, Vermeer C. Effects of vitamin K and oral anticoagulants on urinary calcium excretion. *Br J Haematol.* 1993; 83: 100-4.
241. Jamal SA, Browner WS, Bauer DC, Cummings SR. Warfarin Use and Risk for Osteoporosis in Elderly Women. *Annals of Internal Medicine* 1998; 128:829-832.
242. Caraballo PJ, Heit JA, Atkinson EA, Silverstein MD, O'Fallon M, Castro MR, Melton LJ. Long-term Use of Oral Anticoagulants and the Risk of Fracture. *Arch Intern Med* 1999;159:1750-1756.
243. Mamdani M, Upshur REG, Anderson G, Bartle BR, Laupacis A. Warfarin therapy and risk of hip fracture among elderly patients. *Pharmacotherapy* 2003; 23(1):1-4.
244. Philip WJU, Martin JC, Richardson JM, Reid DM, Webster J, Douglas AS. Decreased axial and peripheral bone density in patients taking long-term warfarin. *Q J Med* 1995; 88:635-640

245. Rosen HN, Maitland, Suttie JW, Manning WJ, Glynn RJ, Greenspan SL et al. Vitamin K and maintenance of skeletal integrity in adults. *Am J Med* 1993;94:62-68.
246. Kiss J, Tihanyi L, Nagy E, Vegh Z, Tahy A, Koranyi L. The effect of prolonged acenocoumarol therapy on bone density (abstr). *Orv Hetil.* 1995 Sep 24; 136(39):2113-5.
247. Lafforgue P, Daver L, Monties JR, Changnaud C, de Boissezon MC, Acquaviva PC. Bone mineral density in patients given oral vitamin K antagonists. *Rev Rhum Engl Ed.* 1997 Apr; 64(4):249-54.
248. Piro LD, Whyte MP, Murphy WA, Birge SJ. Normal Cortical Bone Mass in Patients after Long Term Coumadin Therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1982; 54:470-473.
249. Fiore CE, Tamburino C, Foti R, Grimaldi D. Reduced axial bone mineral content in patients taking an oral anticoagulant. *Southern Medical Journal* 1990; 83:538-542.
250. Resch H, Pietschmann P, Krexner E, Willvonseder R. Decreased peripheral bone mineral content in patients under anticoagulant therapy with phenprocoumon. *Eur Heart J.* 1991 Mar; 12(3):439-41.
251. Gage BF, Birman-Deych E, Radform MJ, Nilasena DS, Binder EF. Risk of osteoporotic fracture in elderly patients taking warfarin. *Arch Inter Med.* 2006; 166:241-246.
252. Pilon D, Casilloux AM, Dorais M, Lelorier J. Oral anticoagulants and the risk of osteoporotic fractures among elderly. *Pharmacoepidemiology and drug safety* 2004;13:289-294.
253. Wawrzynska L, Tomkowski WZ, Przedlacki J, Hajduk B, Torbicki A. Changes in bone density during long-term administration of LMWH or acenocoumarol for secondary prophylaxis of venous thromboembolism. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:64-67.
254. Sato Y, Honda Y, Kunoh H, Oizumi K. Long-term oral anticoagulation reduces bone mass in patients with previous hemispheric infarction and nonrheumatic Atrial fibrillation. *Stroke.* 1997;28:2390-2394.
255. Caraballo PJ, Gabriel SE, Castro MR, Atkinson EJ, Melton LJ. Changes in Bone Density after Exposure to Oral Anticoagulants: A Meta-analysis. *Osteoporos Int* 1999;9:441-448.
256. Barnes C, Newall F, Ignjatovic V, Wong P, Cameron F, Jones G, Monagle P. Reduced bone density in children on long-term warfarin. *Pediatric Research* vol 57(4) april 2005:578-581.
257. Bergrem A, Sandset PM, et al. Research protocol: The warfarin and osteoporosis study (WAROST). Protocol draft – version 1.0.