

Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych
I Katedra Pediatrii
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Jarosław Walkowiak

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. n. med. Aldona Siwińska

MGR PATRYCJA KRZYŻANOWSKA

**NIEDOBÓR WITAMINY K W MUKOWISCYDOZIE
- EGZOGENNE I ENDOGENNE UWARUNKOWANIA DAWKI
SUPLEMENTACYJNEJ**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jarosław Walkowiak

Poznań 2012

Promotorowi

Panu Prof. dr hab. n. med. Jarosławowi Walkowiakowi

*bardzo serdecznie dziękuję
za wskazanie tematu i życzliwość,
cierpliwość i wyrozumiałość,
zaangażowanie i poświęcony czas
oraz nieocenioną pomoc w realizacji pracy*

Panu Prof. dr hab. n. med. Wojciechowi Cichemu
wyrażam serdeczne podziękowania
za umożliwienie realizacji pracy w Klinice

Pragnę podziękować

Koleżankom

z Pracowni Analityki Klinicznej

i Badań Czynnościowych Przewodu Pokarmowego

za zaangażowanie

oraz życzliwość i okazane wsparcie

Pragnę podziękować

Koleżankom i Kolegom

z Ośrodków leczenia mukowiscydozy

za życzliwość, pomoc

i owocną współpracę

*Pracę dedykuję ukochanym Rodzicom
i mojej najbliższej rodzinie*

WYKAZ SKRÓTÓW:

AlAT	aminotransferaza alaninowa (ang.: alanine transaminase)
AspAT	aminotransferaza asparaginianowa (ang.: aspartate aminotransferase)
BMD	gęstość mineralna kości (ang.: bone mineral density)
BMP-2	białko morfogenetyczne kości-2 (ang.: bone morphogenic protein 2)
BSALP	kostna fosfataza zasadowa (ang.: bone-specific alkaline phosphatase)
CF	mukowiscydoza (ang.: cystic fibrosis)
CFLD	choroby związane z CF (ang.: cystic fibrosis - related liver disease)
CFTR	mukowiscydozowy przezłonowy regulator przewodnictwa - białko (ang.: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
CFTR	mukowiscydozowy przezłonowy regulator przewodnictwa - gen (ang.: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
CKD	przewlekła niewydolność nerek (ang.: chronic kidney disease)
FEV1	natężona objętość wydechowa jednosekundowa (ang.: Forced Expiratory Volume in 1 Second)
Gas6	specyficzne białko zatrzymania wzrostu 6 (ang.: growth arrest specific 6 protein)
GGCX	γ -glutamylkarboksylaza (ang.: gamma-glutamylcarboxylase)
GGTP	γ -glutamylotransferaza (ang.: gamma-glutamyltransferase)
Gla	kwasy γ -karboksylglutaminowe (ang.: gamma-carboxyglutamic acid)
Gla-OC	karboksylowana osteokalcyna (ang.: gamma-carboxyglutamic acid-containing osteocalcin)
Glu-OC	niekarboksylowana osteokalcyna (ang.: glutamic acid-containing osteocalcin)
GRP	białko bogate w reszty kwasu γ -karboksylglutaminowego (ang.: gamma-carboxyglutamic acid rich protein)
HDL	lipoproteiny o dużej gęstości (ang.: high density lipoproteins)
IDL	lipoproteiny o pośredniej gęstości (ang.: intermediate density lipoproteins)
INR	międzynarodowy znormalizowany wskaźnik aktywności protrombiny (ang.: international normalized ratio)
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości (ang.: low density lipoproteins)

LDLR	receptor lipoprotein o niskiej gęstości (ang.: low density lipoprotein receptor)
LRP	białko związane z receptorem o niskiej gęstości (ang.: low density lipoprotein receptor-related protein)
MGP	białka Gla macierzy (ang.: matrix Gla protein)
MK-n	menachinony (ang.: menaquinones)
NFκB	czynnik jądrowy kappa B (ang.: nuclear factor kappa B)
NTX	N-końcowy telopeptyd kolagenu typu I (ang.: cross-linked N-telopeptide of type I collagen)
PGE₂	prostaglandyna E ₂ (ang.: prostaglandin E ₂)
PIPN	N-końcowy propeptyd kolagenu typu I (ang.: N-terminal propeptide of type I collagen)
PIVKA	proteiny indukowane niedoborem witaminy K (ang.: proteins induced by vitamin K absence)
PIVKA-II	niekarboksylowana protrombina (ang.: prothrombin induced by vitamin K absence)
PK	filochinon (ang.: phyloquinone)
PT	czas protrombinowy (ang.: prothrombin time)
SD	odczylenie standardowe (ang.: standard deviation)
SXR	receptor steroidów i ksenobiotyków (ang.: steroid and xenobiotic receptor)
TF	czynnik tkankowy (ang.: tissue factor)
TRACP	winianooporna kwaśna fosfataza (ang.: tartrate-resistant acid phosphatase)
VKDB	krwawienia z niedoboru witaminy K (ang.: vitamin K deficiency bleeding)
VKDPs	białka zależne od witaminy K (ang.: vitamin K-dependent proteins)
VKOR	reduktaza epoksydowa witaminy K (ang.: vitamin K epoxide reductase enzyme)
VLDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang.: very low density lipoproteins)
VSMC	komórki mięśni gładkich naczyń (ang.: vascular smooth muscle cells)
X_{śr}	wartość średnia

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	12
1.1. Witamina K	12
1.1.1. Historia odkrycia witaminy K	12
1.1.2. Struktura chemiczna witaminy K	13
1.1.3. Źródła witaminy K	14
1.1.4. Transport oraz uwarunkowania ustrojowych zasobów witaminy K	15
1.1.5. Tkankowe magazyny witaminy K	16
1.1.6. Proces γ -karboksylacji białek z udziałem witaminy K	17
1.1.7. Znaczenie biologiczne witaminy K	19
1.2. Mukowiscydoza a witamina K	24
1.2.1. Mukowiscydoza	24
1.2.2. Niedobór witaminy K w mukowiscydozie	26
1.2.3. Suplementacja witaminy K w mukowiscydozie	29
2. Cele pracy	31
3. Materiał i metody badań	32
3.1. Miejsca prowadzenia badań	32
3.2. Grupa badana	33
3.2.1. Model przekrojowy pierwszy	33
3.2.2. Model przekrojowy drugi	35
3.2.3. Model długofalowy	37
3.3. Metody badań	39
3.3.1. Metody stosowane w poszczególnych modelach	39
3.3.2. Opis metod	40
3.3.2.1. Stan odżywienia	40
3.3.2.2. Ekspresja kliniczna choroby	41
3.3.2.3. Stosowane leczenie	42
3.3.2.4. Zasoby ustrojowe witaminy K	42
3.3.2.5. Parametry koagulologiczne	43
3.3.2.6. Analiza statystyczna	43
3.3.3. Zagadnienia etyczne	44
3.4. Charakterystyka grup	45

3.4.1. Model przekrojowy pierwszy	45
3.4.1.1. Stan odżywienia. Pomiary antropometryczne	45
3.4.1.2. Ekspresja kliniczna choroby	45
3.4.1.2.1. Funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki	45
3.4.1.2.2. Kolonizacja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
3.4.1.3. Suplementacja witaminy K	46
3.4.2. Model przekrojowy drugi	47
3.4.2.1. Stan odżywienia	47
3.4.2.1.1. Pomiary antropometryczne	47
3.4.2.1.2. Gospodarka białkowa	47
3.4.2.2. Ekspresja kliniczna choroby	47
3.4.2.2.1. Funkcja płuc	47
3.4.2.2.2. Funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki	48
3.4.2.2.3. Funkcja wątroby	48
3.4.2.2.4. Kolonizacja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
3.4.2.2.5. Współwystępowanie cukrzycy	49
3.4.2.3. Zastosowane leczenie	49
3.4.2.3.1. Suplementacja witaminy K	49
3.4.2.3.2. Suplementacja enzymów trzustkowych	49
3.4.2.3.3. Podaż antybiotyków pobieranych na stałe	49
3.4.2.3.4. Podaż antybiotyków w ostatnich trzech miesiącach	50
3.4.2.3.5. Wziewna glikokortykosteroidoterapia	50
3.4.3. Model długofalowy	51
3.4.3.1. Stan odżywienia. Pomiary antropometryczne	51
3.4.3.2. Ekspresja kliniczna choroby	51
3.4.3.2.1. Funkcja płuc	51
3.4.3.2.2. Funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki	51
3.4.3.2.3. Funkcja wątroby	52
3.4.3.2.4. Kolonizacja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
4. Wyniki	53
4.1. Model przekrojowy pierwszy	53
4.1.1. Zasoby ustrojowe witaminy K	53

4.1.2. Wpływ stanu odżywienia na częstość występowania niedoboru witaminy K	55
4.1.3. Wpływ genotypu i ekspresji klinicznej choroby na częstość występowania niedoboru witaminy K	56
4.1.4. Wpływ stosowanego leczenia na częstość występowania niedoboru witaminy K	57
4.1.5. Analiza korelacji liniowej i regresji wielorakiej	58
4.2. Model przekrojowy drugi	59
4.2.1. Zasoby ustrojowe witaminy K	59
4.2.2. Wpływ stanu odżywienia na częstość występowania niedoboru witaminy K	63
4.2.3. Wpływ genotypu i ekspresji klinicznej choroby na częstość występowania niedoboru witaminy K	64
4.2.4. Wpływ stosowanego leczenia na częstość występowania niedoboru witaminy K	65
4.2.5. Analiza korelacji liniowej i regresji wielorakiej	66
4.3. Model długofalowy	68
4.3.1. Zasoby ustrojowe witaminy K	68
4.3.2. Wpływ stanu odżywienia na częstość występowania niedoboru witaminy K	70
4.3.3. Wpływ genotypu i ekspresji klinicznej choroby na częstość występowania niedoboru witaminy K	70
4.3.4. Analiza korelacji liniowej i regresji wielorakiej	71
4.3.5. Długofalowa obserwacja suplementacji witaminy K	72
4.4. Porównanie przydatności oznaczania PIVKA-II i parametrów koagulologicznych w ocenie występowania niedoboru witaminy K ...	76
5. Dyskusja	77
6. Wnioski	90
7. Streszczenie	91
8. Piśmiennictwo	97

1. WSTĘP

1.1. WITAMINA K

1.1.1. HISTORIA ODKRYCIA WITAMINY K

Witamina K została odkryta na początku 1930 r. przez duńskiego biochemika Dama, który zaobserwował podskórne i śródmięśniowe wybroczyny u kurcząt hodowanych na diecie ubogotłuszczowej oraz wolnej od steroli [32]. W 1933 r. Holst i Halbrook opisali występowanie podobnych objawów u kurcząt, z towarzyszącymi anemią, hemofilią i nadżerkami żołądka. Powyższe zaburzenia charakteryzowały się wysoką śmiertelnością [51].

Próby znalezienia czynnika zapobiegającego krwotokom zaowocowały powstaniem koncepcji według której witamina C miała chronić przed powstawaniem niepożądanych objawów. Powyższa teoria została jednak podważona przez Dama, który udowodnił nieskuteczność iniekcji z kwasu askorbinowego. Kolejne eksperymenty wykazały, że chorobie krwotocznej piskląt zapobiegają zboża oraz nasiona [31]. Od tego momentu rozpoczęto intensywne poszukiwania produktów, które mogłyby zawierać nieznaną czynnik chroniący przed krwawieniami. Udowodniono, że najsilniejsze właściwości przeciwkrwotoczne posiadają wątroba wieprzowa, nasiona konopi, zboża oraz warzywa. Z kolei kukurydza, matowy ryż oraz ziarna słonecznika uznano za ubogie źródła nowego czynnika [30]. W 1935 r. nieznaną substancję, będącą nową witaminą rozpuszczalną w tłuszczach, została nazwana witaminą K. Powyższa nazwa pochodziła od pierwszej litery w słowie „koagulation” według pisowni niemieckiej i skandynawskiej. W 1937 r. grupa badawcza Dama po raz pierwszy wyizolowała z zielonych liści czystą formę witaminy K w postaci żółtego oleju, dającą widmo absorpcji w ultrafiolecie. Dzięki pracy zespołów naukowych pod kierunkiem Doisy’ego oraz Fiesera, udało się określić jej budowę chemiczną [31]. Równolegle, kilka grup badawczych odniosło sukcesy w izolacji witaminy w postaci żółtego oleju z liści lucerny [2, 3, 14]. Z kolei na Uniwersytecie St. Louis, pod kierunkiem Doisy’ego, wyodrębniono jej krystaliczny produkt z rozkładającego się mięsa sardynek [76].

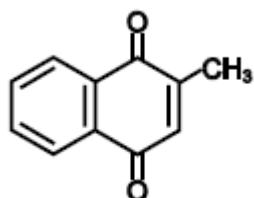
W 1939 r. znane były już dwie różne formy witaminy K - K1 i K2 oraz metody ich izolacji [76]. Istotny wkład w prace nad witaminą K miał również Almquist, który badał jej właściwości fizyczne oraz chemiczne [2-5]. Ponadto, wraz ze współpracownikami określił również wpływ stosowanej w diecie kurcząt witaminy K na czas krzepnięcia oraz czas protrombinowy (ang.: prothrombin time - PT) [6, 7]. W 1937 r. Quick, jako

pierwszy, zaproponował wykorzystanie witaminy K w leczeniu krwawień występujących u pacjentów z żółtaczką zaporową [101]. Z kolei w 1939 r. Andrus i wsp. udowodnili, że działanie witaminy K jest uzależnione od prawidłowego funkcjonowania wątroby. U psów z wyciętą wątrobą wykazano, że zarówno w przypadku suplementacji powyższej witaminy, jak i jej braku, dochodzi do obniżenia stężenia protrombiny. Jakkolwiek, mechanizm działania witaminy K nie był wówczas dokładnie poznany [9].

Dostępne dane piśmiennicze potwierdzają udział wielu badaczy w prace nad witaminą K, jednakże Nagrodę Nobla za osiągnięcia naukowe w tej dziedzinie otrzymali w 1944 r. Henrik Dam oraz Edward Doisy [140].

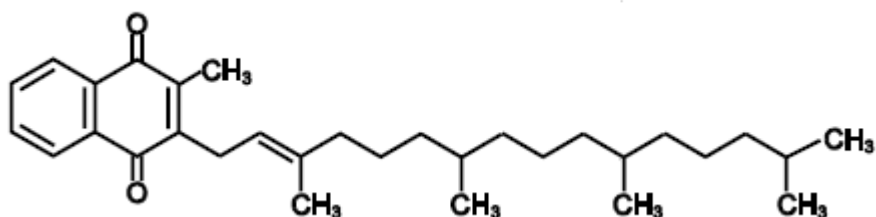
1.1.2. STRUKTURA CHEMICZNA WITAMINY K

Witamina K należy do witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [19, 59]. Naturalnie występuje w dwóch formach, jako witamina K1 - filochinon (ang.: phyloquinone - PK) oraz witamina K2 - menachinon (ang.: menachinone, MK-n) [118]. Wszystkie witaminy K mają wspólną strukturę 2-metylo-1,4-naftochinonu zwaną menadionem, ale różnią się długością oraz stopniem nasycenia izoprenoidowego łańcucha bocznego, przyłączonego w pozycji 3 pierścienia naftochinonu (Ryc. 1) [92].



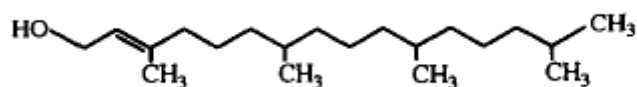
Ryc.1 2-metylo-1,4-naftochinon (menadion, witamina K3) [114].

PK posiada cztery jednostki izoprenoidowe, z których w jednej występuje wiązanie nienasycone (Ryc. 2) [92].



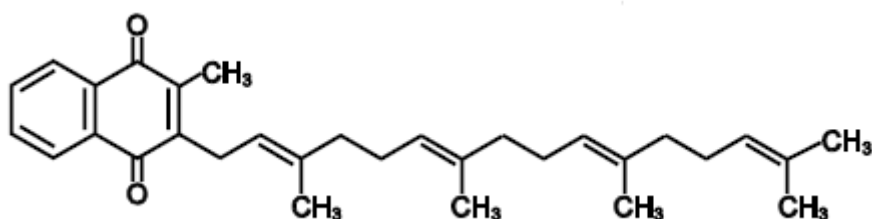
Ryc.2 2-metylo-3-fityl-1,4-naftochinon (filochinon, witamina K1) [114].

Boczny łańcuch witaminy K1, nazywany fitylowym, obecny jest również w chlorofilu (Ryc. 3) [114].

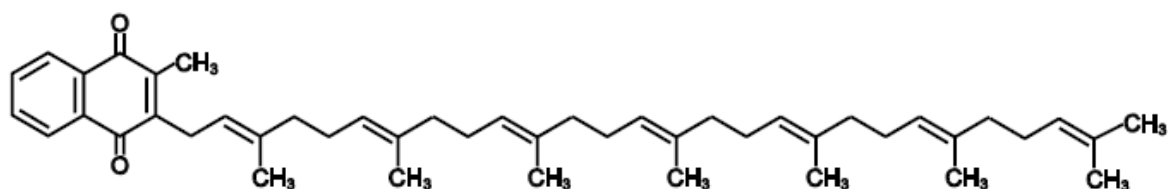


Ryc.3 Łańcuch fitylowy [48].

W przypadku menachinonu czyli MK-n, gdzie n oznacza liczbę jednostek izoprenoidowych, wiązania nienasycone występują w każdej z nich (Ryc. 4, Ryc. 5) [109].



Ryc.4 2-metyl-3-geranyl-geranyl-1,4-naftochinon (menachinon-4, menatetranon, MK-4) [48, 114].



Ryc.5 2-metyl-3-farnesylgeranyl-geranyl-1,4-naftochinon (menachinon-7, MK-7) [114].

Syntetyczną formą witaminy K jest menadion (witamina K3) używany jako karma dla zwierząt. Inne nienaturalne formy to K4 oraz K5 [56, 63].

1.1.3. ŹRÓDŁA WITAMINY K

Witamina K1 występuje w dużych ilościach w zielonych warzywach liściastych, w brokułach, kiszonej kapuście oraz margarynach opartych na olejach roślinnych. Mięso, ryby, produkty nabiałowe i jajka zawierają zarówno witaminę K1, jak i K2

(MK-4). W mięsie gęsi, wątrobie, maśle oraz w żółtku jaja kurzego, MK-4 występuje w znacząco większych stężeniach. Głównym źródłem długołańcuchowych menachinonów (MK-8, MK-9) jest sfermentowana żywność (sery) [109, 114]. Bardzo bogata w MK-7 jest żywność japońska (*natto*), która zawiera sfermentowaną soję [74, 109]. Stąd też w przypadku regularnego spożywania *natto* MK-7 jest prawdopodobnie najważniejszym źródłem witaminy K w kulturze azjatyckiej [74].

MK-n są syntetyzowane w organizmie człowieka przez bakterie jelitowe. Najważniejszą florą bakteryjną człowieka są *Bacteroides* oraz *Bifidobacterium*, jednakże tylko te pierwsze mają zdolność syntezy długołańcuchowych form witaminy K₂, MK-10 oraz MK-11. W mniejszej ilości powstają również MK-7, MK-8, MK-9 oraz MK-12 [114]. Jednakże, dyskusyjna jest kwestia biodostępności witaminy K₂ syntetyzowanej w jelicie. Okazuje się, że kwasy żółciowe są niezbędne w procesie jej absorpcji, a w okrężnicy nie występują. Należy zwrócić uwagę również na fakt, iż ogromna większość MK-n obecnych w jelicie grubym jest niedostępna ze względu na ich „blokowanie” w błonie komórkowej bakterii. Tylko niewielka ilość MK może zostać wchłonięta w jelicie krętym w obecności soli żółciowych [69, 113]

Chociaż jednym z czynników ryzyka wystąpienia niedoboru witaminy K jest podaż antybiotyków, nie zostało udowodnione, aby przyczyną powyższego stanu było obniżenie syntezy MK przez bakterie jelitowe. W związku z powyższym znaczenie witaminy K₂ syntetyzowanej przez bakterie jelitowe wydaje się być mniej istotne niż wcześniej zakładano [113].

1.1.4. TRANSPORT ORAZ UWARUNKOWANIA USTROJOWYCH ZASOBÓW WITAMINY K

Witamina K₁ wchłaniana jest w jelicie cienkim i łączy się z chylomikronami, które powstają w ścianie jelita cienkiego w odpowiedzi na spożycie tłuszczów. Chylomikrony posiadające apolipoproteinę A (apoA) oraz B-48 (apoB-48), wydzielane są do krążenia limfatycznego, a następnie poprzez przewód piersiowy do krwi. Tam nabywają, pochodzące od frakcji cholesterolu o dużej gęstości (ang.: high density lipoproteins - HDL), apolipoproteinę C (apoC) oraz E (apoE). Krążące chylomikrony, na skutek działania lipazy lipoproteinowej, przechodzą w chylomikrony resztkowe (pozbawione apoA i apoC), które wychwytywane są przez wątrobę, a także przez inne tkanki, w tym kości. Wiadomo, że chylomikrony resztkowe zawierają witaminę K zamkniętą

w lipofilnym rdzeniu. W wątrobie wnikają one do hepatocytów po uprzednim połączeniu się z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości (ang.: low density lipoprotein receptor - LDLR) oraz białkiem związanym z receptorem wiążącym lipoproteiny o niskiej gęstości (ang.: low density lipoprotein receptor-related protein - LRP). Po przetransportowaniu witaminy K1 do wątroby, część z niej trafia z powrotem do krążenia w połączeniu z lipoproteinami o bardzo małej gęstości (ang.: very low density lipoproteins - VLDL), a następnie do tkanek pozawątrobowych. W krążeniu VLDL z jednej strony nabywają apoC i apoE, a z drugiej pozbawione zostają trójglicerydów, co w konsekwencji doprowadza do powstania lipoprotein o pośredniej gęstości (ang.: intermediate density lipoproteins - IDL), a w kolejnym etapie o niskiej gęstości (ang.: low density lipoproteins - LDL), które odgrywają istotną rolę w transporcie witaminy K1 do kości. Istnieją zatem dwie drogi transportu powyższej witaminy do osteoblastów. Jedna związana z chylomikronami resztkowymi, a druga z frakcją LDL [74, 114].

Godny podkreślenia jest również fakt, że chylomikrony oraz chylomikrony resztkowe zawierają apolipoproteinę E (apoE), a ich klirens zależy od wiązania apoE przez receptory wątroby. Wysokie wartości klirensu występują u ludzi, którzy posiadają jedną lub dwie kopie genu kodującego wariant E4, natomiast niskie, gdy obecny jest wariant E2 [1]. W konsekwencji polimorfizm apoE jest czynnikiem determinującym stężenie witaminy K1 w surowicy [62]. Największe jej poziomy obserwuje się zatem u osób z wariantem E2, pośrednie z E3, a najmniejsze z E4 [1, 82].

Chociaż wiadomo, że transport witaminy K odbywa się z udziałem lipoprotein, to jednak różne jej formy wykazują w ustroju pewne odrębne cechy. Schurgers i Vermeer przeprowadzili badanie w grupie 6 zdrowych mężczyzn, którzy otrzymali mieszankę zawierającą po 2 μmol witaminy K1, MK-4 oraz MK-9. Wykazali, że w pierwszych 8 godzinach po spożyciu największe stężenie w surowicy osiągnęła witamina K1. Z kolei najdłuższy czas połowicznego rozpadu odnotowano dla MK-9 co świadczy, iż ta forma witaminy K2 może być najbardziej stabilna w krążeniu. Ponadto, witamina K1 wiąże się głównie z lipoproteinami bogatymi w trójglicerydy, natomiast MK-n łączą się także z frakcją LDL, a MK-4 również z HDL [110].

1.1.5. TKANKOWE ZASOBY WITAMINY K

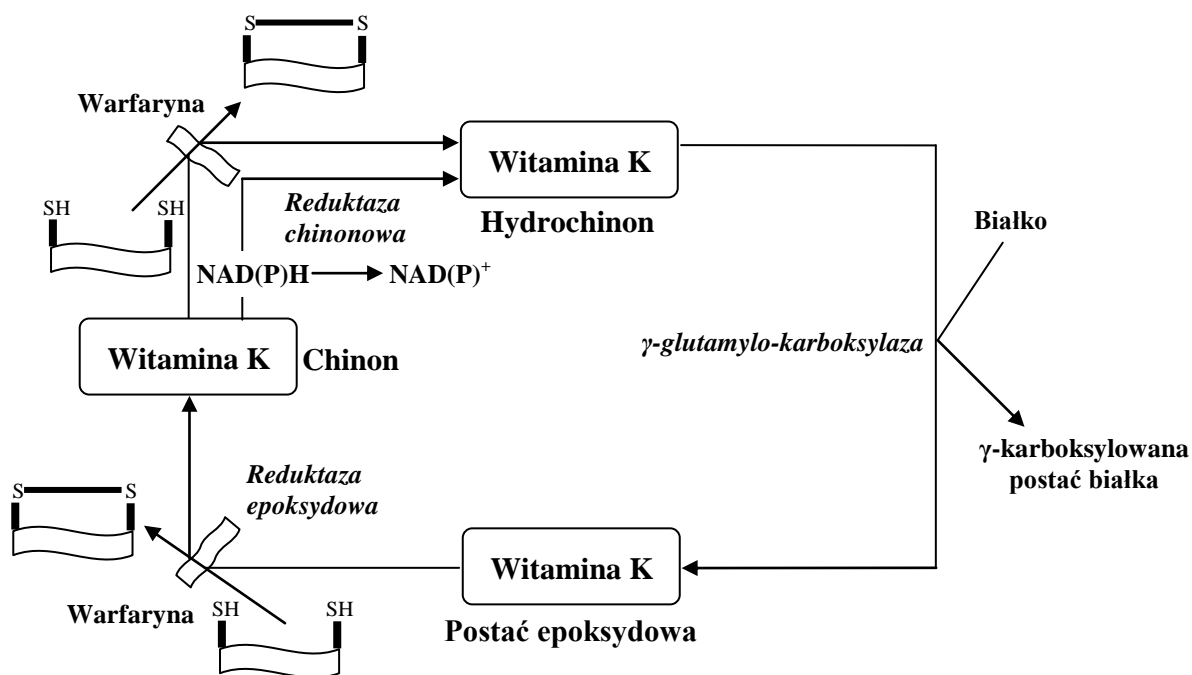
Wątroba wydaje się być głównym miejscem, w którym magazynowana jest witamina K. Jej zawartość w wątrobie mieści się w szerokim zakresie stężeń, np.

u dorosłych mieszkańców Wielkiej Brytanii, Japonii oraz Holandii wynosi 2-47 pmol/g tkanki. Uważa się, że w wątrobie zmagazynowane jest ok. 90% MK-n oraz ok. 10% PK [114]. Witamina K1 w ilości ok. 10 pmol/g występuje w wątrobie, sercu oraz trzustce, natomiast w małych stężeniach (< 2 pmol/g) obecna jest w mózgu, nerkach oraz płucach. Z kolei MK-4 w dużych ilościach magazynowana jest w tkankach pozawątrobowych (mózg, nerki, trzustka), przekraczając zawartość PK. W niskich stężeniach MK-4 (≤ 1 pmol/g) obecna jest w sercu oraz płucach, a także w wątrobie. Formy MK-7, MK-8, MK-9, MK-10, MK-11, MK-12, MK-13 występują w wątrobie, natomiast w sercu oraz trzustce obecne są MK-6, MK-7, MK-8, MK-9 [125].

1.1.6. PROCES γ -KARBOKSYLACJI BIAŁEK Z UDZIAŁEM WITAMINY K

Witamina K jest kofaktorem dla γ -glutamylkarboksylazy (ang.: gamma-glutamyl carboxylase - GGCX), enzymu odpowiadającego za konwersję obecnych w białkach reszt kwasu glutaminowego do reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego (ang.: gamma-carboxylglutamic acid - Gla) [118]. Gla obecne w proteinach odpowiadają za wiązanie wapnia, co jest niezbędne dla ich aktywności biologicznej. Białka zawierające Gla zaangażowane są w procesy krzepnięcia krwi i metabolizm kości, przeciwdziałają wapnieniu naczyń oraz regulują proliferację komórkową i transdukcję sygnału [92]. Konwersja kwasu glutaminowego do Gla wymaga oprócz GGCX, zredukowanej formy witaminy K (hydrochinonu), a także dwutlenku węgla oraz tlenu cząsteczkowego. Hydrochinon ulega z kolei konwersji do epoksydowej formy witaminy K. Ta ostatnia systematycznie zredukowana jest do formy chinonu przez reduktazę epoksydową wrażliwą na warfarynę (ang.: epoxide reductase enzyme - VKOR). W kolejnym etapie następuje odtworzenie aktywnej formy koenzymu czyli hydrochinonu pod wpływem działania reduktazy chininowej (Ryc. 6) [44].

Do białek zależnych od witaminy K zalicza się czynniki krzepnięcia krwi II, VII, IX, X, białka S, C, Z, osteokalcynę, białka Gla macierzy (ang.: matrix Gla-protein - MGP), nerkowe białka Gla (ang.: kidney Gla protein) oraz niedawno opisane specyficzne białko zatrzymania wzrostu (ang.: growth-arrest-specific-6 protein - Gas6), które posiada właściwości mitogenne, antyapoptotyczne oraz utrzymuje komórkę w fazie G_0 [27, 44, 69, 120].



Ryc.6 Cykl witaminy K

[<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminK/kcycle.html>].

W przypadku niedoboru witaminy K powstają tzw. proteiny indukowane niedoborem witaminy K (ang.: proteins induced by vitamin K absence - PIVKA), które występują w formie niekarboksylowanej i nie spełniają swojej biologicznej roli [71]. Do grupy tych białek należą: PIVKA II, PIVKA VII, PIVKA IX, PIVKA X, PIVKA C, PIVKA S oraz PIVKA Z [134]. Niekarboksylowana protrombina (ang.: prothrombin induced by vitamin K absence - PIVKA-II) jest nieaktywnym prekursorem aktywnego czynnika II, mającego szerokie zastosowanie nie tylko jako marker nowotworowy u pacjentów z rakiem wątroby czy parametr monitorujący leczenie warfaryną [68], ale także jako złoty standard w diagnostyce subklinicznego niedoboru witaminy K [82]. PIVKA-II jest uważana za zdecydowanie bardziej wrażliwy parametr niedoboru witaminy K niż PT. Uważa się, że 50% prawidłowego stężenia protrombiny wystarcza do zachowania PT w granicach wartości referencyjnych [25]. PT jest zatem późnym markerem niedoboru witaminy K [121]. Wrażliwość wartości PIVKA-II oraz PT na podaż witaminy K jest odmienna, a do stwierdzenia zmiany potrzebne są odpowiednio różnice kilku ng/ml i ok.100 µg/ml [17].

Jak już wspomniano wcześniej, innym białkiem zależnym od witaminy K jest osteokalcyna. W obrębie polipeptydowego łańcucha karboksylowanej formy

osteokalcyny (ang.: gamma-carboxyglutamic acid-containing osteocalcin - Gla-OC) znajdują się miejsca umożliwiające przyłączenie i zakotwiczenie wapnia w obrębie hydroksyapatytu [135]. W przypadku niedoboru witaminy K proces γ -karboksylacji jest niewydajny, a produkowane białko nie może przyłączyć wapnia [137]. Stężenie powstającej wówczas niekarboksylowanej osteokalcyny (ang.: glutamic acid-containing osteocalcin - Glu-OC) jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia witaminy K [135]. Powyższy parametr zalicza się do najbardziej czułych wskaźników niedoboru witaminy K [25].

1.1.7. ZNACZENIE BIOLOGICZNE WITAMINY K

Powszechnie wiadomo, że witamina K bierze udział w procesie krzepnięcia krwi [115]. Czynniki krzepnięcia II, VII, IX oraz X, które produkowane są w wątrobie, należą do najlepiej poznanych białek zależnych od witaminy K (ang.: vitamin K-dependent proteins - VKDPs). Dzięki procesowi karboksylacji, którego kofaktorem jest witamina K, ulegają transformacji do biologicznie czynnych form. Proces ten hamuje warfaryna, która stosowana jest w terapii przeciwzakrzepowej [33].

Na ryzyko wystąpienia krwawień szczególnie narażone są noworodki kilka tygodni po urodzeniu, ze względu na występujący niedobór witaminy K. W związku z powyższym w wielu krajach w ramach profilaktyki wprowadzono rutynową podaż tej witaminy drogą domięśniową lub doustną [62]. Ryzyko wystąpienia klasycznej postaci krwawienia z niedoboru witaminy K (ang.: vitamin K deficiency bleeding - VKDB) u noworodków i niemowląt, które nie otrzymały witaminy K, wynosi 0,1-15 przypadków na 1000 urodzeń [37]. We wczesnej postaci VKDB (1 doba życia) najczęściej stwierdza się krwiaki podokostnowe, krwawienie wewnątrzczaszkowe oraz krwawienie z pępka. W postaci klasycznej (2-7 doba życia) krwawienie dotyczy głównie przewodu pokarmowego, pępka, skóry i błon śluzowych. Krwawienie do ośrodkowego układu nerwowego występuje w postaci późnej choroby (>7 doby życia) i wiąże się dużym ryzykiem śmiertelności [37, 69]. W Polsce, noworodki i niemowlęta karmione piersią, oprócz jednorazowej dawki witaminy K - 2 mg *p.o.* lub 0,5 mg *i.m.* - podanej po urodzeniu, otrzymują od 2 tygodnia do końca 3 miesiąca życia jej profilaktyczną dawkę doustną - 25 μ g/dzień [37].

Witamina K odgrywa również istotną rolę w metabolizmie kości spełniając rolę kofaktora γ -karboksylazy, odpowiadającej za γ -karboksylację osteokalcyny [65, 115].

Osteokalcyna, produkowana przez osteoblasty podczas tworzenia kości, jest głównym niekolagenowym białkiem kości. Chociaż podaje się, że γ -karboksylacja osteokalcyny jest podstawowym mechanizmem poprzez który witamina K wpływa protekcyjnie na kości, w ostatnim czasie odkryto dwa nowe białka zależne od powyższej witaminy, białko GRP (ang.: γ -carboxyglutamic acid residue Gla-rich protein) oraz periostynę. Proteina GRP, występująca w komórkach chrząstek oraz kości, reguluje stężenie pozakomórkowego wapnia. Z kolei periostyna, obecna głównie w bogatych w kolagen tkankach, spełnia istotną rolę w zewnątrzkomórkowej mineralizacji macierzy [15].

Z dostępnych danych wynika, że MK-4 może wpływać na metabolizm kości także poprzez mechanizmy odmienne od γ -karboksylacji [48]. Hara i wsp. w badaniach przeprowadzonych na fragmentach kości czaszki pochodzących od myszy wykazali, że MK-4 hamuje *in vitro* wzrost stężenia wapnia w podłożu hodowlanym, co wiąże się z zahamowaniem resorpcji kostnej indukowanej przez witaminę $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ oraz prostaglandynę E_2 (ang.: prostaglandin E_2 - PGE_2). Dodatkowo, MK-4 obniża *in vitro* aktywność winianoopornej kwaśnej fosfatazy (ang.: tartrate-resistant acid phosphatase - TRACP) w medium wzrostowym komórek podścieliska szpiku kostnego, co oznacza zablokowanie transformacji komórkowej w kierunku osteoklastów [48]. Powyższa witamina w obecności $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ stymuluje *in vitro* mineralizację ludzkich osteoblastów wyizolowanych z kości łokciowej oraz odkładanie osteokalcyny w macierzy pozakomórkowej. MK-4 może także zwiększać ekspresję genu osteokalcyny przy udziale $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ [66]. Bierze się również pod uwagę fakt, że czynnikiem determinującym istotne znaczenie MK-4 w zapobieganiu osteoporozie u ludzi jest obecna w pierścieniu bocznym naftochinonu jednostka geranylogeranylowa [22, 48]. Dodatkowo, MK-4 zwiększa ekspresję osteoblastycznych markerów kości w pierwotnych mysich osteocytach, na drodze zależnej od receptora steroidów i ksenobiotyków (ang.: steroid and xenobiotic receptor - SXR). Wysoką ekspresją receptora SXR charakteryzują się wątroba oraz jelito. SXR odgrywa istotną rolę w indukcji enzymów cytochromu P-450 takich, jak CYP3A4 i CYP2C8 oraz rodziny kasetowych transporterów wiążących ATP, do których zaliczamy między innymi MDR1 i MRP2. SXR pełni nie tylko funkcję regulatora klirensu i metabolizmu ksenobiotyków, ale także utrzymuje homeostazę kości [123]. Z badań przeprowadzonych na króliczych osteoklastach wynika, że MK-4 - w przeciwieństwie do witaminy K1 - powoduje apoptozę osteoklastów, co w konsekwencji przyczynia się do hamowania osteoklastycznej resorpcji kości [58]. W związku z faktem, że MK-4 nie

jest prostym składnikiem diety, a jest transkrypcyjnym regulatorem zależnego od SXR sygnału oraz kofaktorem GGCX, powinna być raczej rozpatrywana jako aktywna forma witaminy K, mająca istotne znaczenie w tworzeniu kości [84].

Nie wszystkie dane piśmiennicze potwierdzają skuteczność działania witaminy K na metabolizm kości. Rejnmark i wsp. opisali brak zależności pomiędzy podażą witaminy K1 w dawce 60 µg/dobę a gęstością mineralną kości (ang.: bone mineral density - BMD) i ryzykiem złamań u kobiet w okresie okołomenopauzalnym i we wczesnym okresie pomenopauzalnym [103]. Hara i wsp. nie wykazali efektu działania witaminy K1 na proces resorpcji kości [48]. Według Binkleya i wsp. witaminy K1 i MK-4 obniżają stężenie Glu-OC w surowicy, ale nie wpływają na kostną fosfatazę zasadową (ang.: bone-specific alkaline phosphatase - BSALP), N-końcowy telopeptyd kolagenu typu I (ang.: cross-linked N-telopeptide of type 1 collagen - NTX), gęstość mineralną kręgosłupa w odcinku lędźwiowym oraz proksymalnego odcinka kości udowej. Na podstawie uzyskanych wyników, autorzy podważyli skuteczność podaży witaminy K w zapobieganiu osteoporozie u kobiet w okresie pomenopauzalnym, otrzymujących wapń oraz witaminę D₃ [13].

Witamina K odgrywa również istotną rolę w regulacji procesu wapnienia naczyń [15], które występuje u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (ang.: chronic kidney disease - CKD), cukrzycą oraz miażdżycą. Znane są dwa typy kalcyfikacji naczyń, zależne od miejsca odkładania wapnia. Magazynowanie wapnia w wewnętrznej warstwie ściany naczyń krwionośnych dotyczy miażdżycy i może prowadzić do zawału mięśnia sercowego oraz śmierci wieńcowej. Z kolei kalcyfikacja środkowej warstwy naczyń występuje najczęściej u pacjentów z CKD. Proces ten skutkuje wzrostem sztywności naczyń oraz redukcją ich zdolności do odkształcania się, a w konsekwencji do wzrostu ciśnienia skurczowego, ciśnienia tętna oraz prędkości fali tętna. Wiadomo również, że w proces wapnienia zaangażowane są komórki mięśni gładkich naczyń (ang.: vascular smooth muscle cell - VSMC) [96]. VSMC syntetyzują zależne od witaminy K białko MGP, które hamuje powyższy proces [15]. Dla funkcji MGP niezbędny jest proces γ -karboksylacji tej proteiny zależny od obecności witaminy K. Warfaryna, będąca antagonistą witaminy K, hamuje karboksylację MGP, co prowadzi do kalcyfikacji tętnic u szczurów [99]. Z dostępnych danych piśmienniczych wynika, że proces wapnienia naczyń poprzedza transformacja VSMCs do komórek osteoblastycznych. Udowodniono, iż region Gla białka MGP hamuje białko morfogenetyczne kości-2 (ang.: bone morphogenic protein 2 - BMP-2), które

odpowiada za powyższą transformację. Dodatkowo wykazano, że MK-4 w największym stopniu zapobiega kalcyfikacji naczyń, co może wynikać z faktu, iż powyższa forma witaminy K2 powstaje z witaminy K1 w tkankach pozawątrobowych, w tym między innymi w aorcie [132].

Witamina K1, a także MK-3, MK-4 oraz MK-7 hamują reakcję zapalną indukowaną przez lipopolisacharydy w mysich komórkach RAW264.7 oraz ludzkich monocytach THP1. Działanie przeciwzapalne związane jest z obecnością wspólnego pierścienia 2-metylo-1,4-naftochinonu we wszystkich formach witaminy K, nie zależy natomiast od procesu γ -karboksylacji. Dodatkowo, MK-4 hamuje aktywność czynnika jądrowego (ang.: nuclear factor kappa B - NF κ B), biorącego udział w odpowiedzi immunologicznej, proliferacji i różnicowaniu komórek, a także wykazującego działanie antyapoptotyczne [91].

Wielokierunkowe działanie witaminy K przejawia się również w jej udziale w funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego. W mózgowiu występują PK oraz MK-4, jakkolwiek MK-4 stanowi > 98% całkowitej zawartości witaminy K. Podaż witaminy K1 szczerom przyczynia się do kumulowania MK-4 w największym stężeniu w zmielinizowanych regionach mózgowia takich jak rdzeń przedłużony, most oraz śródmózgowie. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem MK-4 a stężeniem siarczanu cerebrozydu i sfingomieliny, natomiast ujemną dla stężenia gangliozydów [20].

Nieliczne dane piśmiennicze wskazują na możliwy udział witaminy K w patogenezie choroby Alzheimera. Powyższa witamina wpływa nie tylko na metabolizm sfingolipidów, ale również na aktywność mózgowej proteiny Gas6. Powszechnie wiadomo, że istotną rolę w patogenezie choroby Alzheimera odgrywa apoptoza komórek nerwowych. Interakcja aktywnego białka Gas6 zależnego od witaminy K z receptorem kinazy tyrozynowej chroni neurony przed apoptotyczną śmiercią komórki [1]. W badaniach przeprowadzonych w grupie 31 pacjentów we wczesnym stadium choroby Alzheimera wykazano statystycznie mniejsze spożycie witaminy K w porównaniu z grupą kontrolną (mediana: 39,9 vs. 71,0 μ g/dzień). Jednakże, ten aspekt działania witaminy K wymaga dalszych badań [100].

Biologiczna rola witaminy K rozpatrywana jest również w odniesieniu do jej potencjalnego działania antynowotworowego. Z dostępnych danych piśmienniczych wynika, że witamina K2 wykazuje takie działanie w odniesieniu do komórek nowotworowych wątroby, jelita grubego, płuc, żołądka, nosogardzieli, piersi oraz

komórek białaczkowych [138]. W badaniach przeprowadzonych w grupie 25540 pacjentów obydwu płci, na podstawie kwestionariusza (ang.: food-frequency questionnaire - FFQ) oraz dodatkowo zebranych informacji dotyczących między innymi stylu życia, palenia papierosów, aktywności fizycznej, sprawdzono wpływ spożycia witaminy K1 oraz K2 w diecie na częstość występowania nowotworów oraz śmiertelność wynikającą z procesu nowotworowego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono ujemną korelację pomiędzy spożyciem MK-n a częstością występowania nowotworów i śmiertelnością. Obserwowana zależność była silniejsza dla mężczyzn niż dla kobiet. Nie wykazano natomiast żadnego efektu dla PK. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy sugerują, że szczególnie korzystny wpływ w odniesieniu do raka prostaty i płuc u mężczyzn może mieć konsumpcja sera [87].

Jednym z czynników ryzyka występowania nie tylko nowotworów, ale także osteoporozy i miażdżycy u mężczyzn w podeszłym wieku jest obniżenie stężenia testosteronu. Udowodniono, że MK-4 powoduje wzrost produkcji tego hormonu u szczurów oraz *in vitro* w komórkach nowotworowych pochodzących z jąder. W związku z powyższym stosowanie diety zawierającej duże ilości MK-4 może zmniejszać ryzyko występowania tych chorób, szczególnie u mężczyzn [55].

1.2. MUKOWISCYDOZA A WITAMINA K

1.2.1. MUKOWISCYDOZA

Mukowiscydoza (ang.: cystic fibrosis - CF) jest jedną z najczęściej występujących w populacji kaukaskiej genetycznie uwarunkowanych chorób o autosomalnym recesywnym typie dziedziczenia [23, 75]. W Europie i Stanach Zjednoczonych żyje około 80000 dzieci i dorosłych z CF [57]. Przyczyną choroby są mutacje genu *CFTR* (ang.: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) zlokalizowanego na chromosomie 7 [53, 75, 93]. Produktem genu *CFTR* jest białko CFTR obecne na powierzchni apikalnej komórek nabłonkowych układu oddechowego, trzustki, jelita oraz gruczołów potowych, które pełni rolę kanału chlorkowego [57, 93, 112]. Białko CFTR odpowiada za uwodnienie wydzieliny śluzowej komórek nabłonkowych układu oddechowego oraz jelit. Do innych funkcji kanału chlorkowego zalicza się regulację kanału sodowego (ENaC) [28], pH, transportu glutationu, a także kontrolę syntezy wolnych rodników w mitochondrium, zakwaszania organelli wewnątrzkomórkowych oraz organizację domen lipidowych w błonie komórkowej. Dodatkowo, białko CFTR zaangażowane jest w proces błonowej endocytozy w komórkach nabłonkowych nerek oraz układu oddechowego, a także w odpowiedź zapalną [57].

Najczęstszą mutacją genu *CFTR* powodującą CF w populacji kaukaskiej jest F508del [85, 111]. Mutacja w obrębie genu *CFTR* prowadzi do dysfunkcji białka CFTR [79, 112]. Wadliwa budowa/funkcja lub brak kanału chlorkowego przyczynia się do produkcji i deponowania gęstego, lepkiego śluzu w w.w. narządach, co w konsekwencji może prowadzić m.in. do nawracających zapaleń oskrzeli i płuc, niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki, cholestazy wewnątrzwątrobowej, stłuszczenia i marskości wątroby, niedrożności smółkowej w okresie noworodkowym lub jej ekwiwalentów w wieku późniejszym oraz zespołu jelitowego przerostu bakteryjnego [38, 53, 70]. Rozpoznanie CF opiera się na stwierdzeniu:

- przynajmniej jednego objawu klinicznego występującego w chorobie - tabela 1,
- występowania CF u rodzeństwa i/lub rodziców,
- dodatniego wyniku badania przesiewowego noworodków w kierunku CF, łącznie z nieprawidłowym wynikiem jednego z poniższych badań:
- próby potowej - wykazanie znamienne wysokich stężeń anionów chlorkowych w pocie uzyskanym za pomocą jonoforezy pilokarpinowej,
- badania molekularnego - wykrycie mutacji w obu allelach genu *CFTR*,

- pomiaru potencjałów elektrycznych błony śluzowej nosa - typowe dla chorych na CF są bardziej ujemne wartości przynabłonkowej różnicy potencjałów oraz istotna zmiana po podaniu amiloridu (stają się mniej ujemne) w przeciwieństwie do osób zdrowych [131].

Tabela 1. Objawy kliniczne występujące w mukowiscydozie [131].

Okres płodowy i noworodkowy	Okres niemowlęcy i poniemowlęcy	Okres dzieciństwa i dorosłości
- zwapnienia w jamie otrzewnowej płodu - poszerzenie jelita cienkiego płodu w badaniu USG - niedrożność smółkowa - przedłużająca się cholestaza wewnątrzwątrobową	- niedobór masy ciała - przewlekły kaszel - nawracające zapalenie płuc, oskrzelików - przewlekłe zakażenie dróg oddechowych <i>P. aeruginosa</i> i/lub <i>S. aureus</i> - zmiany w RTG płuc - bardzo słony pot - odwodnienie z hipokaliemią hiponatremią i zasadowicą hipochloremiczną - zapaść podczas upałów - cuchnące, tłuszczowe i obfite stolce - objawy zespołu złego wchłaniania - wypadanie błony śluzowej odbytu - objawy niedoboru witamin rozpuszczalnych w tłuszczach - hipoprotrombinemia	- przewlekły kaszel - nawracające zapalenia płuc - polipy nosa - przewlekłe zapalenie zatok przynosowych - rozstrzenie oskrzeli - palce pałeczkowate - krwioplucie - marskość żółciowa wątroby - kamica żółciowa u dzieci - nadciśnienie wrotne, żylaki przełyku - splenomegalia - nawracające zapalenie trzustki - cukrzyca - niedobór wysokości i masy ciała - nawracające obrzęki ślinianek przyusznych - opóźnione dojrzewanie płciowe - niepłodność mężczyzn

	- hipoproteinemia i obrzęki	(azoospermia obturacyjna)
--	--------------------------------	---------------------------

1.2.2. NIEDOBÓR WITAMINY K W MUKOWISCYDOZIE

U chorych na CF z ciężką niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki (ok. 85-90% pacjentów) [16, 93], w wyniku niedoborów enzymatycznych, dochodzi do zaburzeń trawienia i wchłaniania tłuszczów pokarmowych, czego konsekwencją są niedobór wysokości i masy ciała, zaburzenia surowiczego profilu kwasów tłuszczowych (w tym wielonienasyconych kwasów tłuszczowych) oraz niedobory witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, między innymi witaminy K. Do czynników wpływających na obniżenie stężenia witaminy K, oprócz zaburzeń wchłaniania tłuszczów spowodowanych niedoborem lipazy trzustkowej i kolipazy, zalicza się również upośledzone krążenie wątrobowo-jelitowe oraz obniżenie puli kwasów żółciowych w wyniku chorób wątroby, częste antybiotykoterapie choroby oskrzelowo-płucnej oraz źle zbilansowaną dietę. Stan po resekcji fragmentu jelita cienkiego w przebiegu niedrożności smółkowej jest dodatkowym czynnikiem zmniejszającym absorpcję witaminy K [41, 130].

Niedobór witaminy K manifestuje się zaburzeniami krzepnięcia, w tym krwawieniami z błon śluzowych nosa i przewodu pokarmowego oraz podskórnymi krwotokami z miejsca wkłucia żylnego lub siniakami. Dodatkowo, niedobór powyższej witaminy doprowadza do zaburzonej mineralizacji kości, a w konsekwencji do osteoporozy [56]. U pacjentów z CF bez współistniejących chorób wątroby otrzymujących odpowiednią dawkę suplementacyjną witaminy K oraz enzymów trzustkowych rzadko obserwuje się zaburzenia koagulologiczne [82]. Jakkolwiek, dostępne dane piśmiennicze wskazują na występowanie tych zaburzeń, szczególnie u niemowląt z CF [47, 77, 98, 128, 133].

W 1970 r. Komp i wsp. przeprowadzili prospektywne badanie oceniające występowanie zaburzeń koagulologicznych w grupie 59 pacjentów z CF. Do najczęstszych zaburzeń krzepnięcia zaliczyli trombocytopenię, wydłużony PT i czas trombolastynowy, co związane było z obniżeniem stężenia czynnika II oraz kompleksu VII-X. Czynniki V i VII oraz fibrynogen mieściły się w granicach wartości referencyjnych. U dwóch pacjentów krwawienie ustąpiło po suplementacji witaminą K. Uzyskano także normalizację PT oraz czasu trombolastynowego [64]. W 1970 r.

Torstenson i wsp. opisali trzech pacjentów z CF, u których zaobserwowali zaburzenia krzepnięcia. Wydłużony PT spowodowany był niedoborem witaminy K [126]. W 1972 r. Walters i Koch u czterech niemowląt z CF między 1 a 4 miesiącem życia zaobserwowali krwawienia będące wynikiem niedoboru witaminy K oraz hipoprotrombinemii. Do czynników obniżających aktywność protrombiny zaliczyli niedobory żywieniowe, zaburzenia wchłaniania wynikające z chorób trzustki oraz antybiotykoterapię [133]. Niedobór powyższej witaminy stwierdzony został również u dziewczynki z CF, u której zaburzenia koagulacyjne wystąpiły pomimo dwukrotnej doustnej podaży 1mg witaminy K [128]. Opisany został również przypadek niemowlęcia płci męskiej, u którego tomografia komputerowa ujawniła masywne krwawienie do mózgu. Badania laboratoryjne wykazały nieprawidłowy czas krzepnięcia oraz obniżoną aktywność wszystkich czynników zależnych od witaminy K. Za główną przyczynę niedoboru witaminy K uznano zaburzenia wchłaniania, a po wykonaniu testu potowego oraz badaniu genetycznym u niemowlęcia zdiagnozowano CF [47]. Popova i wsp. opisali przypadek chłopca ze świeżo rozpoznaną CF, u którego rozwinęła się skaza krwotoczna. U niemowlęcia występowały krwawe wymioty oraz pojawiła się krew w stolcu. W badaniach laboratoryjnych stwierdzono istotne wydłużenie PT. Po doustnym podaniu 1mg witaminy K zaobserwowano całkowitą poprawę stanu zdrowia [98]. W przypadku 3-miesięcznego chłopca z CF z anemią, hipoalbuminemią oraz wydłużonym PT, u którego występowały sińce na twarzy i nogach, jako główną przyczynę zaburzeń koagulacyjnych wskazano również niedobór witaminy K. Normalizację PT oraz znormalizowanego wskaźnika aktywności protrombiny (ang.: international normalized ratio - INR) uzyskano po domięśniowej podaży 1 mg powyższej witaminy [77].

U pacjentów z CF przewlekły niedobór witaminy K objawia się znacznie częściej osteopenią niż koagulopatią. Wynika to z faktu, że wątroba posiada bardzo efektywny mechanizm dzięki któremu szybko wyłapuje witaminę K z krwi, co pozwala utrzymywać prawidłowe jej stężenie w tkankach, nawet jeśli poziom w surowicy krwi jest niski. Metabolizm kostny zależy natomiast od utrzymującego się wysokiego stężenia witaminy K we krwi i dlatego też kości są bardziej podatne na występowanie jej niedoboru [82].

Zaburzenia mineralizacji kośćca są często rozpoznawanym problemem w CF, nie tylko u dorosłych, ale również u dzieci i młodzieży w okresie dojrzewania [112]. Osteopenia i osteoporoza występuje odpowiednio u 28-48% i 17-31% dorosłych

pacjentów oraz u 28-47% i 20-34% dzieci [94, 112]. Pierwsze doniesienie dotyczące stanu mineralnego kości w tej jednostce chorobowej pojawiło się w 1979 r. Badanie przeprowadzono u 27 chorych na CF, u których przy wykorzystaniu techniki absorpcjometrii jednofotonowej dokonano oceny stosunku gęstości mineralnej do szerokości kości. Demineralizację stwierdzono u 37% chłopców oraz u 63% dziewczynek. Proces demineralizacji korelował ze stopniem redukcji masy ciała. Grupą najbardziej predysponowaną do wystąpienia zaburzeń mineralizacji kości okazały się dziewczęta z CF w okresie dojrzewania. W powyższym badaniu wykazano również, że u sporej liczby chorych proces demineralizacji kości przebiega bez obecności jawnej krzywicy [78].

Do czynników ryzyka chorób kości u pacjentów z CF zalicza się między innymi: zły stan odżywienia, zaburzenia wchłaniania witaminy D, glikokortykosteroidoterapię, która obniża resorbcję wapnia z przewodu pokarmowego, a zwiększa jego wydalanie z moczem, opóźnione dojrzewanie płciowe, wczesny hipogonadyzm, cukrzycę typu 2, a także ograniczoną aktywność fizyczną [10, 50, 83]. Dodatkowo, wzrost poziomu cytokin w osoczu krwi, będący wynikiem przewlekłego stanu zapalnego płuc, prawdopodobnie nasila resorbcję, a obniża proces tworzenia kości [10].

Choroby kości są między innymi jednym z czynników wykluczających chorych z kwalifikacji do przeszczepu płuc [10]. Stosowana po przeszczepie immunosupresja może w istotny sposób nasilać objawy wynikające z zaburzonej mineralizacji kości, co w konsekwencji prowadzi do patologicznych złamań oraz kifozy [50, 112]. Pomimo występowania wielu czynników ryzyka demineralizacji kości patogeneza tego procesu u chorych na CF nadal pozostaje niewyjaśniona [112]. Dlatego też w ostatnim czasie szczególną uwagę zwraca się na występujące w tej grupie pacjentów niedobory witaminy K. Conway i wsp. przebadali 93 pacjentów z CF w wieku powyżej 5 lat. Niskie stężenie powyższej witaminy, wzrost stężenia PIVKA-II lub jednocześnie występowanie nieprawidłowych wartości obydwu parametrów wykazali aż u 65 (70%) dzieci, które otrzymywały witaminę K w dawce 10 mg/tydz. Jednakże, nie wykazali żadnej korelacji pomiędzy Gla-OC i Glu-OC a gęstością kości [26]. Grey i wsp. wykazali niską gęstość mineralną kości u 38% dzieci z CF w odniesieniu do całego ciała, natomiast w 28% przypadkach dla lędźwiowego odcinka kręgosłupa. Aż 65% pacjentów miało obniżone stężenie witaminy K w surowicy, a u 82% chorych stwierdzono patologiczne stężenia PIVKA-II oraz Glu-OC [45]. Z kolei Fewtrell i wsp. w grupie 28 dzieci z CF w wieku 8-12 lat wykazali obniżone stężenia N-końcowego

propeptydu kolagenu typu 1 (ang.: N-terminal propeptide of type 1 collagen - PIPN), markera świadczącego o tworzeniu kości, z większym niż zakładali odsetkiem Glu-OC (22-62%). Co ciekawe, w tej grupie badanej występowała prawidłowa masa kostna [43]. Nie ulega wątpliwości, iż suplementacja witaminy K odgrywa istotną rolę w prewencji zaburzeń kostnych w tej grupie pacjentów. Podaż powyższej witaminy zwiększa stężenie Gla-OC, C-końcowego i N-końcowego propeptydu prokolagenu I oraz obniża poziom Glu-OC [86].

1.2.3. SUPLEMENTACJA WITAMINY K W MUKOWISCYDOZIE

Biorąc pod uwagę znaczenie biologiczne witaminy K, jej suplementacja u pacjentów z CF wydaje się być niezwykle istotna. Pozwala na zachowanie prawidłowych zasobów ustrojowych powyższej witaminy oraz zapobiega konsekwencjom wynikającym z jej niedoboru [52]. Jednakże, jak wynika z dostępnych danych piśmienniczych wielkość dawki suplementacyjnej nie jest jednoznacznie określona [82]. Dougherty i wsp. porównali skuteczność podaży witaminy K < 150 µg/dzień, 150-999 µg/dzień oraz ≥ 1000 µg/dzień. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, że tylko wysoka dawka powyższej witaminy (≥ 1000 µg/dzień), pozwala na uzyskanie podobnego odsetka Glu-OC w grupie chorych na CF jak u osób zdrowych [39]. Drury i wsp. stosowali witaminę K w dawce 1 mg/dobę (n=7) oraz 5 mg/dobę (n=6, jeden pacjent został wykluczony) przez okres jednego miesiąca u pacjentów z CF w wieku 8-18 lat. Powyższa suplementacja doprowadziła do normalizacji odsetka Glu-OC <21% u 1 oraz 2 pacjentów otrzymujących odpowiednio większą i mniejszą dawkę. Nie wykazano różnicy w skuteczności obu dawek. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy uznali, że normalizacja zasobów ustrojowych witaminy K jest możliwa tylko przy długotrwałej suplementacji [40]. Według Beker i wsp. stosowanie u chorych na CF dawki 5 mg/tydz zmniejsza odsetek Glu-OC oraz obniża poziomy PIVKA-II lecz nie doprowadza do całkowitej normalizacji tych parametrów [12]. Z kolei z badań przeprowadzonych w grupie 20 dzieci i młodzieży z CF wynika, że podaż 10 mg/tydz witaminy K przez okres jednego roku powoduje zmniejszenie stężenia Glu-OC oraz wzrost stężenia C-końcowego propeptydu prokolagenu typu I (ang.: C-terminal propeptide of type I procollagen - PICP) i PINP, jednakże nie poprawia gęstości mineralnej kości [86]. Mosler i wsp. wykazali zdecydowanie większe stężenia witaminy K w surowicy pacjentów z CF (n=7) otrzymujących powyższą witaminę w dawce 6-20

mg/tydz (mediana: 789 pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną (n=18) (mediana: 574 pg/ml) oraz z chorymi na CF (n=25), którzy nie otrzymywali witaminy K (mediana: 363 pg/ml). Dodatkowo, w grupie pacjentów suplementowanych stężenie PIVKA-II było niewykrywalne, co wskazuje na normalizację zasobów ustrojowych witaminy K [82].

Warto podkreślić, że w Stanach Zjednoczonych rekomendowana jest podaż witaminy K w dawce 0,3-0,5 mg/dzień niezależnie od wieku pacjentów z CF [17]. Najnowsze zalecenia europejskie sugerują natomiast zróżnicowanie dawki suplementacyjnej od 0,3 mg/dzień do 10 mg/tydzień [29, 116]. Biorąc pod uwagę, że wszyscy pacjenci z CF są narażeni na ryzyko występowania niedoboru witaminy K, a dawka suplementacyjna nie jest jasno określona, konieczne jest prowadzenie dalszych badań, mających na celu określenie właściwej dawki terapeutycznej.

2. CELE PRACY

Cel poznawczy:

- ocena częstości występowania niedoboru witaminy K u pacjentów z mukowiscydozą,
- ocena egzo- i endogennych uwarunkowań ustrojowych zasobów witaminy K w tej grupie chorych.

Cel praktyczny:

- określenie wielkości dawki suplementacyjnej witaminy K u pacjentów z mukowiscydozą,
- porównanie przydatności oceny parametrów koagulologicznych z pomiarem stężeń niekarboksylowanej protrombiny w ocenie ustrojowych zasobów witaminy K.

3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

3.1. MIEJSCA PROWADZENIA BADAŃ

Badania zostały przeprowadzone w latach 2009-2012 u chorych na CF w trakcie wizyt w poradniach oraz hospitalizacji w następujących ośrodkach leczenia mukowiscydozy:

- Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Wojciech Cichy
- Klinika Pneumonologii i Mukowiscydozy Oddziału Terenowego Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc im. Jana i Ireny Rudników w Rabce-Zdrój, Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Henryk Mazurek
- I Klinika Chorób Płuc Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Jan Kuś
- Klinika Pediatrii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka i Matki w Katowicach, Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Halina Woś
- Poradnia Leczenia Mukowiscydozy, Specjalistyczny Zespół Opieki Zdrowotnej nad Matką i Dzieckiem w Gdańsku, Kierownik: Dr n. med. Maria Trawińska-Bartnicka
- Poradnia Mukowiscydozy Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. Świętej Jadwigi Królowej w Rzeszowie, Kierownik: Dr n. med. Marta Rachel
- Lviv Regional Council Public Institution „Western Ukrainian Specialized Children’s Medical Center”, Lwów, Ukraina Kierownik: Dr n. med. Lyudmyla Bober

U wszystkich badanych rozpoznanie CF postawiono na podstawie wywiadu, objawów klinicznych oraz podwyższonego stężenia chlorków w pocie [104, 131]. Potwierdzenie rozpoznania uzyskano w badaniu molekularnym genu *CFTR* wykonanym w ośrodkach diagnostyki molekularnej CF (Zakład Genetyki Medycznej w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie, Kierownik: Prof. zw. dr hab. Ewa Bocian; Genomed S.A. w Warszawie, Kierownik: dr. n. med. Katarzyna Borg)

3.2. GRUPA BADANA

Badaniami objęto pacjentów z CF w trzech modelach eksperymentalnych: dwóch przekrojowych oraz długofalowym.

3.2.1. MODEL PRZEKROJOWY PIERWSZY

Do modelu przekrojowego pierwszego zakwalifikowano 38 niemowląt z CF rozpoznanych w skriningu noworodkowym otrzymujących i nieotrzymujących witaminy K. Podstawowe dane epidemiologiczne przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka epidemiologiczna badanej grupy w modelu przekrojowym pierwszym.

Płeć	Liczebność		Wiek (miesiące)		
	n	%	$\bar{X}_{sr} \pm SD$	mediana	1-3 kwartył
K¹	14	36,8	7,3±2,7	7,0	5,0-9,8
M²	24	63,2	7,2±3,3	8,0	4,0-9,8
K+M³	38	100	7,3±2,7	7,0	5,0-9,8

¹ Płeć żeńska

² Płeć męska

³ Łącznie płeć żeńska i męska

U wszystkich pacjentów zidentyfikowano mutacje w jednym lub obu allelach genu *CFTR*. Najczęstszą mutacją była F508del, która występowała na 42 (55,3%) allelach. Mutacje CFTRdele2,3(21kb/) oraz 2184insA obecne były odpowiednio na 5 (6,8%) i 3 (3,9%) allelach. Mutację F508del w postaci homozygotycznej zidentyfikowano u 9 (23,7%) niemowląt. Z kolei jej obecność na jednym allelu dotyczyła 24 (63,2%) pacjentów. Poszczególne genotypy w badanej grupie zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Częstość występowania genotypów w modelu przekrojowym pierwszym.

Mutacja	n	%
F508del/F508del	9	23,7
F508del/-	9	23,7
F508del/CFTRdele2,3(21kb)	3	8,0
F508del/2184insA	3	8,0
F508del/1717-1G>A	2	5,4
F508del/2143delT	1	2,6
F508del/1898+1G>A	1	2,6
F508del/2183AA>G	1	2,6
F508del/F1286C	1	2,6
F508del/L467F	1	2,6
F508del/N1303K	1	2,6
F508del/R347P	1	2,6
CFTRdele2,3(21kb)/Y1092X	1	2,6
F1052V/CFTRdele2,3(21kb)	1	2,6
G542X/N1303K	1	2,6
2183AA>G/-	1	2,6
p.Q207X/-	1	2,6

3.2.2. MODEL PRZEKROJOWY DRUGI

Do modelu przekrojowego drugiego zakwalifikowano 168 chorych na CF w wieku 1,2-41,4 lat otrzymujących i nieotrzymujących witaminy K. Podstawowe dane epidemiologiczne przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka epidemiologiczna badanej grupy w modelu przekrojowym drugim.

Płeć	Liczebność		Wiek (lata)		
	n	%	$X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$	Mediana	1-3 kwartył
K¹	78	46,4	12,3±8,7	11,3	5,2-17,8
M²	90	53,6	14,7±8,1	14,5	8,4-19,8
K+M³	168	100	13,6±8,4	13,1	7,2-19,1

¹ Płeć żeńska

² Płeć męska

³ Łącznie płeć żeńska i męska

Mutacje w jednym lub obu allelach genu *CFTR* zidentyfikowano u 152 (90,5%) pacjentów, u pozostałych 16 (9,5%) chorych nie udało się określić genotypu. Mutacja F508del występowała na 207 (61,6%) allelach. W badanej grupie mutacje CFTRdele2,3(21kb) oraz 3849+10kbC>T obecne były na 8 (2,4%) allelach. Na 7 (2,1%) allelach zidentyfikowano mutację 2143delT, a na 5 (1,5%) 1717-1A>G. Homozygotami F508del było 74 (44%) pacjentów. Z kolei u 59 (35,1%) chorych wykazano obecność powyższej mutacji w jednym allelu. Częstość występowania poszczególnych genotypów zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Częstość występowania genotypów w modelu przekrojowym drugim.

Mutacja	n	%
F508del/F508del	74	44,0
F508del/-	23	13,7
F508del/3849+10kbC>T	6	3,5
F508del/2143delT	6	3,5
F508del/R553X	4	2,4

F508del/2183AA>G	3	1,8
F508del/1717-1G>A	3	1,8
F508del/CFTRdele2,3(21kb)	3	1,8
F508del/3272-26A>G	2	1,2
F508del/N1303K	2	1,2
F508del/4374+1G>T	1	0,6
F508del/621+1G>T	1	0,6
F508del/3659delC	1	0,6
F508del/G1244R	1	0,6
F508del/G542X	1	0,6
F508del/R117H	1	0,6
F508del/R334W	1	0,6
G542X/-	2	1,2
CFTRdele2,3(21kb)/-	2	1,2
CFTRdele2,3(21kb)/CFTRdele2,3(21kb)	1	0,6
1717-1-G>A/CFTRdele2,3(21kb)	1	0,6
3849+10kbC>T/-	1	0,6
3849+10kbC>T/1717-1A>G	1	0,6
N1303K/-	1	0,6
N1303K/3272-26A>G	1	0,6
G542X/R553X	1	0,6
1524+1G>A/E585X	1	0,6
2183AA>G/-	1	0,6
2184insA/622-1G>A	1	0,6
2143delT/R1102X	1	0,6
3272-26A>G/-	1	0,6
3659delC/-	1	0,6
R347P/R347P	1	0,6
S1196X/Q1382X	1	0,6
-/- *	16	9,5

* nie znaleziono mutacji

3.2.3. MODEL DŁUGOFALOWY

Do modelu długofalowego zakwalifikowano 47 chorych na CF w wieku 1,0-23,5 lat, którzy nigdy nie otrzymywali witaminy K. U pacjentów, u których stwierdzone zostały niedobory powyższej witaminy, wdrożona została suplementacja. Dawki zwiększano raz na 2 miesiące, rozpoczynając od 2,5 mg/tydz odpowiednio do 5 i 10 mg/tydz. Podstawowe dane epidemiologiczne grupy przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka epidemiologiczna badanej grupy w modelu długofalowym.

Płeć	Liczebność		Wiek (lata)		
	n	%	$X_{sr} \pm SD$	Mediana	1-3 kwartył
K¹	21	44,7	9,6±5,4	8,2	6,2-11,6
M²	26	55,3	9,7±5,4	10,2	5,4-13,9
K+M³	47	100	9,7±5,4	8,6	5,9-13,9

¹ Płeć żeńska

² Płeć męska

³ Łącznie płeć żeńska i męska

U wszystkich pacjentów zidentyfikowano mutacje w jednym lub obu allelach genu *CFTR*. Najczęstszą mutacją była F508del, która występowała na 58 (61,7%) allelach. Mutacje 2184insA oraz N1303K obecne były odpowiednio na 9 (9,6%) oraz 4 (4,2%) allelach. Mutację F508del w postaci homozygotycznej zidentyfikowano u 14 (29,8%) pacjentów. Z kolei jej obecność na jednym allelu dotyczyła 30 (63,8%) pacjentów. Poszczególne genotypy w badanej grupie zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Częstość występowania genotypów w modelu długofalowym.

Mutacja	n	%
F508del/F508del	14	29,8
F508del/2184insA	7	14,9
F508del/-	6	12,8
F508del/N1303K	4	8,5
F508del/G542X	3	6,5
F508del/1898+1G>A	3	6,5

F508del/3849+10kbC>T	2	4,2
F508del/CFTRdele2,3(21kb)	1	2,1
F508del/621-1G>T	1	2,1
F508del/185+1G>T	1	2,1
F508del/R347H	1	2,1
F508del/W1282X	1	2,1
621-1G>T/3849+10kbC>T	1	2,1
N1303K/2183AA>G	1	2,1
2184insA/2184insA	1	2,1

3.3. METODY BADAŃ

3.3.1. METODY STOSOWANE W POSZCZEGÓLNYCH MODELACH

W modelu przekrojowym pierwszym dokonano oceny:

1. stanu odżywienia:
 - a. standaryzowane wartości masy oraz wysokości ciała,
2. ekspresji klinicznej choroby:
 - a. funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki (elastaza-1 w stolcu),
 - b. kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*,
3. stosowanego leczenia:
 - a. suplementacja witaminy K,
4. zasobów ustrojowych witaminy K poprzez ocenę stężenia PIVKA-II.

W modelu przekrojowym drugim dokonano oceny:

1. stanu odżywienia:
 - a. standaryzowane wartości masy oraz wysokości ciała,
 - b. biochemiczne wykładniki gospodarki białkowej - albuminy,
2. ekspresji klinicznej choroby:
 - a. funkcja płuc - spirometria,
 - b. funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki - elastaza-1 w stolcu,
 - c. wykładniki biochemiczne oceniające funkcję wątroby - aminotransferaza alaninowa (ang.: alanine aminotransaminase - AlAT), aminotransferaza asparaginowa (ang.: aspartate aminotransferase - AspAT), gamma -glutamylotransferaza (ang.: gamma-glutamyltransferase - GGTP),
 - d. kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*,
 - e. choroby współistniejące (cukrzyca, marskość wątroby).
3. stosowanego leczenia:
 - a. suplementacja witaminy K,
 - b. suplementacja enzymów trzustkowych,
 - c. podaż antybiotyków pobieranych na stałe wziewnie i doustnie,
 - d. antybiotykoterapia dożylna oraz doustna w ostatnich trzech miesiącach,
 - e. glikokortykosteroidoterapia,
4. zasobów ustrojowych witaminy K poprzez ocenę stężenia PIVKA-II,

5. parametrów koagulologicznych: procentowy wskaźnik czasu protrombinowego (PT%) oraz INR, które posłużą porównaniu dotychczasowego modelu oceny zasobów ustrojowych witaminy K.

W modelu długofalowym dokonano oceny:

1. stanu odżywienia:
 - a. standaryzowane wartości masy oraz wysokości ciała,
2. ekspresji klinicznej choroby:
 - a. funkcja płuc - spirometria,
 - b. funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki - elastaza-1 w stolcu,
 - c. wykładniki biochemiczne oceniające funkcję wątroby - AlAT, AspAT, GGTP,
 - d. kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*,
3. zasobów ustrojowych witaminy K poprzez ocenę stężenia PIVKA-II, a dla porównania skuteczności stosowanych dawek w modelu długofalowym, dodatkowo odsetek Glu-OC.

3.3.2. OPIS METOD

3.3.2.1. Stan odżywienia

Pomiarów antropometrycznych: masy i wysokości ciała dokonano z zastosowaniem techniki pomiarowej opisaną przez Martina i Sellera [72] oceniając:

- całkowitą wysokość ciała mierzoną od podstawy do wierzchołka głowy, w pozycji stojącej, przy pomocy antropometru z dokładnością do 0,5 cm,
- masę ciała mierzoną przy pomocy wagi lekarskiej lub elektronicznej z dokładnością do 0,1 kg.

U niemowląt dokonano natomiast pomiaru długości ciała od szczytu głowy do płaszczyzny podeszwowej stóp ustawionych prostopadle do podudzia w pozycji leżącej na plecach, przy wykorzystaniu infantometru.

W analizie stanu odżywienia posłużono się wartościami standaryzowanymi, po odniesieniu uzyskanych wyników do norm populacyjnych [95] wg następującego wzoru:

$$W_s = (x_b - x_n) / SD_n$$

gdzie:

W_s - wynik standaryzowany,

x_b - pomiar uzyskany u badanego dziecka,

x_n - średnia normy (odpowiadająca pod względem wieku i płci badanemu dziecku),

SD_n - odchylenie standardowe normy.

Oceny gospodarki białkowej dokonano posługując się wynikami stężenia albumin. W tym celu w poszczególnych ośrodkach oznaczono stężenia białka całkowitego przy użyciu metody kolorymetrycznej [136] oraz dokonano rozdziału poszczególnych frakcji białka na żelu agarozowym za pomocą elektroforezy [35].

3.3.2.2. Ekspresja kliniczna choroby

Badania spirometryczne przeprowadzono w Pracowniach Diagnostyki Czynnościowej Płuc w poszczególnych ośrodkach. Ograniczenia dotyczące przeprowadzenia badania wynikały z wieku pacjentów (< 6 r.ż) oraz możliwości i chęci ich współpracy z wykonującym badanie. W przeprowadzonych badaniach uwzględniano wartość procentową: maksymalnej objętości powietrza wydychanego w czasie 1 sekundy po maksymalnym wdechu (ang.: Forced Expiratory Volume in 1 Second - FEV1).

Na podstawie stężenia elastazy-1 w stolcu oceniano funkcję zewnątrzwydzielniczą trzustki. Próbki przechowywane były w temp. -20 stopni C w poszczególnych Ośrodkach, a następnie transportowane w suchym lodzie do Pracowni Analityki Klinicznej i Badań Czynnościowych Przewodu Pokarmowego Kliniki Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych w Poznaniu. Stężenia elastazy-1 w stolcu oceniano metodą immunoenzymatyczną (ELISA, firmy ScheBo Biotech, Giessen, Niemcy) [11, 129].

Oceny funkcji biochemicznej wątroby dokonano poprzez analizę wyników rutynowych badań (jak parametry koagulologiczne) aktywności AlAT [106], AspAT [107] oraz GGTP [108] ocenionych przy wykorzystaniu metody kinetycznej.

Dane na temat kolonizacji *Pseudomonas aeruginosa* (dodatni wynik posiewu plwociny) uzyskano w ramach przeprowadzonego wcześniej postępowania diagnostycznego. Informacje o chorobach współistniejących pochodziły z dokumentacji medycznej.

3.3.2.3. Stosowane leczenie

Informacje dotyczące stosowanego leczenia zebrano na podstawie kart wypisowych pacjentów oraz kartotek poradni specjalistycznych.

3.3.2.4. Zasoby ustrojowe witaminy K

Materiał do badań pobierano w Ośrodkach, a następnie oznaczenia wykonano w Pracowni Analityki Klinicznej i Badań Czynnościowych Przewodu Pokarmowego Kliniki Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Od każdego chorego pobrano krew żylną na 0,109 M cytrynian trójsodowy oraz na skrzep w celu oznaczenia odpowiednio stężenia PIVKA-II oraz Glu-OC i Gla-OC. Próbkę krwi natychmiast wirowano, a oddzielone osocza i surowice mrożono w temperaturze -70°C . Próbkę z pozostałych ośrodków transportowane były do Pracowni w suchym lodzie.

Oceny stężenia PIVKA-II dokonano przy użyciu immunoenzymatycznego testu Asserachrom PIVKA-II (DeCarboxy Prothrombin, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Francja). Studzienki reakcyjne opłaszczono fragmentem $\text{F(ab}')_2$ monoklonalnych mysich przeciwciał specyficznych dla PIVKA-II (P1-2B9) w pierwszym etapie inkubowano z próbkami osocza pacjentów. Obecna w osoczu chorych niekarboksylowana protrombina łączy się z przeciwciałami zawartymi w studzienkach. Równolegle z próbkami pacjentów inkubowano dołączone przez producenta kalibratory o znanych stężeniach PIVKA-II, które pozwoliły na wykreślenie krzywej standardowej. W drugim etapie kompleks przeciwciało-antygen (PIVKA-II) inkubowano z przeciwciałami (króliczymi) znakowanymi peroksydazą chrzanową skierowanymi przeciwko PIVKA-II. Aktywność przeciwciała znakowanego enzymem wykazano poprzez barwną reakcję z substratem (orto-fenylodiamina) w obecności nadtlenku mocznika. W etapie końcowym przerywano reakcję 3M kwas siarkowym. Fotometrycznej oceny intensywności barwy dokonano po 10 minutach od zakończenia

reakcji przy długości fali 492 nm i referencyjnej długości fali 405 nm. Stężenia PIVKA-II u badanych pacjentów odczytano z krzywej punkt do punktu zależności absorbancji od stężenia. U zdrowych osób stężenie PIVKA-II wynosi <2 ng/ml.

Z kolei oceny stężenia niekarboksylowanej oraz karboksylowanej osteokalcyny dokonano przy użyciu testów Glu-type Osteocalcin EIA kit oraz Gla-type Osteocalcin EIA kit firmy Takara BIO INC (Takara BIO INC. Otsu, Shiga, Japonia). W pierwszym etapie rozcieńczone surowice pacjentów inkubowano z monoklonalnymi mysimi przeciwciałami opłaszczonymi na płytce (w zależności od testu anty-Glu-OC lub anty-Gla-OC), a następnie dodawano koniugatu (oddzielnego dla obu oznaczeń), zawierającego drugie przeciwciało znakowane peroksydazą chrzanową. Substratem była 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna, a roztworem przerywającym reakcję 1N kwas siarkowy. Fotometrycznego odczytu dokonano w czasie jednej godziny przy długości fali 450nm i referencyjnej długości fali 620nm. Badane stężenia odczytano z wykreślonej krzywej standardowej zależności absorbancji od stężenia. Stężenia Glu-OC oraz Gla-OC pozwoliły na wyliczenie odsetka Glu-OC.

3.3.2.5. Parametry koagulologiczne

Oceny parametrów koagulologicznych dokonano u pacjentów podczas rutynowych badań diagnostycznych przeprowadzonych w trakcie hospitalizacji lub pobytów kontrolnych w szpitalach i poradniach specjalistycznych.

W osoczu cytrynianowym zmierzono PT z użyciem preparatu czynnika tkankowego (Tissue Factor - TF). PT został wyrażony jako procentowy wskaźnik czasu protrombinowego określający stosunek PT kontrolnego/ PT osoby badanej (oba czasy w sekundach) x 100% oraz INR [97].

3.3.2.6. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano programy GraphPadPrism5 oraz Statistica version 10. Różnice wieku, standaryzowanej wartości masy i wysokości ciała, FEV1, parametrów koagulologicznych (INR, PT%), stężeń albumin, aktywności enzymów wątrobowych (AlAT, AspAT, GGTP), dawkowania enzymów trzustkowych oraz witaminy K w badanych podgrupach pacjentów z prawidłowymi oraz patologicznymi

stężeniami PIVKA-II, a także biorących i niebiorących witaminy K oceniono przy wykorzystaniu testu Mann Whitney (test nieparametryczny).

Do oceny wpływu stanu odżywienia, funkcji płuc, niewydolności trzustki, cukrzycy, kolonizacji *Pseudomonas aeruginosa*, mutacji genu *CFTR*, antybiotykoterapii wziewnej i doustnej pobieranej na stałe, antybiotykoterapii dożylniej i doustnej pobieranej w ostatnich 3 miesiącach, glikokortykosteroidoterapii, a także suplementacji witaminy K na częstość występowania niedoboru powyższej witaminy wykorzystano test Chi-square, a dla prób o liczebności poniżej 5 - test Chi-square z poprawką Yates'a. Z kolei do oceny częstości występowania niedoboru witaminy K w grupie pacjentów z marskością wątroby, hepatopatią oraz bez chorób wątroby - test Fishera-Freemana-Haltona.

W analizie korelacji pomiędzy zmiennymi użyto współczynnika korelacji liniowej Pearsona. Potencjalny wpływ parametrów klinicznych na występowanie niedoboru witaminy K w oparciu o stężenie PIVKA-II oceniono przy użyciu analizy regresji wielorakiej.

Do weryfikacji przydatności oznaczania PIVKA-II i parametrów koagulologicznych w ocenie występowania niedoboru witaminy K wykorzystano test McNemara.

Stężenia PIVKA-II oraz odsetki Glu-OC przed suplementacją oraz po zastosowaniu witaminy K w dawkach 2,5 i 5 mg/tydz oraz 2,5; 5,0 i 10 mg/tydz porównano stosując test Anova Friedmana, współczynnik zgodności Kendalla oraz test Nemenyi-Dunna. Z kolei test kolejności par Wilcoxon użyto dla porównania parametrów oceniających zasoby ustrojowe witaminy K przed podażą i po suplementacji powyższej witaminy w dawce 2,5 mg/tydz.

Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p < 0,05$.

3.3.3. ZAGADNIENIA ETYCZNE

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Komisji Bioetycznej przy Western Ukrainian Specialized Children's Medical Centre we Lwowie.

3.4. CHARAKTERYSTYKA GRUP

3.4.1. MODEL PRZEKROJOWY PIERWSZY

3.4.1.1. Stan odżywienia. Pomiary antropometryczne

Wartości masy oraz wysokości ciała dwa odchylenia standardowe poniżej średniej stwierdzono odpowiednio u 7 (18,4%) oraz 8 (21,0%) niemowląt. Standaryzowane wartości wysokości i masy ciała w badanej grupie zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Parametry antropometryczne w modelu przekrojowym pierwszym.

Parametr	$X_{\bar{s}} \pm SD$	Mediana	1-3 kwartył
Standaryzowana wartość masy ciała	0,96±1,23	-1,15	-1,85 - -0,06
Standaryzowana wartość wysokości ciała	0,18±1,98	-0,23	-1,69 - 1,31

3.4.1.2. Ekspresja kliniczna choroby

3.4.1.2.1. Funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki

Ciężką niewydolność zewnątrzwydzielniczą trzustki (stężenie elastazy-1 w stolcu <100 µg/g stolca) stwierdzono u 29 (76,3%) niemowląt, podczas gdy 9 (23,7%) pacjentów było wydolnych trzustkowo.

3.4.1.2.2. Kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*

U 33 (86,8%) pacjentów nie stwierdzono obecności *Pseudomonas aeruginosa*, natomiast 5 (13,2%) badanych było przewlekle skolonizowanych powyższą bakterią.

3.4.1.3. Suplementacja witaminy K

Witaminą K suplementowanych było 26 (68,4%) niemowląt, podczas gdy 12 (31,6%) badanych nie otrzymywało powyższej witaminy. Zastosowana dawka suplementacyjna mieściła się w zakresie 0,175-5 mg/tydz ($X_{sr} \pm SD$: 2,3 \pm 1,4 mg/tydz; mediana: 2,8), jednakże 7 (18,4%) niemowląt otrzymywało witaminę K w dawce mniejszej od rekomendowanej dla chorych na CF. Najczęściej stosowanym preparatem witaminy K w badanej grupie był AquADEKs (tabela 9).

Tabela 9. Preparaty witaminy K zastosowane w modelu przekrojowym pierwszym.

Preparat witaminy K	n [%]
AquADEKs	18 [69,3]
Vita K	4 [15,4]
Vitacon 10mg	2 [7,7]
ADEKs	1 [3,8]
Vitbaby D+K twist off	1 [3,8]

3.4.2. MODEL PRZEKROJOWY DRUGI

3.4.2.1. Stan odżywienia

3.4.2.1.1. Pomiary antropometryczne

Wartości masy i wysokości ciała dwa odchylenia standardowe poniżej średniej stwierdzono odpowiednio u 27 (16,1%) oraz 39 (23,2%) pacjentów. Standaryzowane wartości wysokości i masy ciała w badanej grupie zestawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Parametry antropometryczne w modelu przekrojowym drugim.

Parametr	$\bar{X}_{sr} \pm SD$	Mediana	1-3 kwartyl
Standaryzowana wartość masy ciała	0,97±1,06	-0,94	-1,77 - -0,33
Standaryzowana wartość wysokości ciała	0,99±1,33	-0,83	-1,88 - -0,06

3.4.2.1.2. Gospodarka białkowa

W badanej grupie pacjentów średnie stężenia albumin wyniosły 3,86±0,55 g/dl (mediana: 3,90) - tabela 11.

Tabela 11. Parametry gospodarki białkowej.

Parametr	Poniżej normy		Norma	
	n	%	n	%
Albuminy [g/dl]	30	17,9	138	82,1

3.4.2.2. Ekspresja kliniczna choroby

3.4.2.2.1. Funkcja płuc

Badanie spirometryczne wykonano u 133 (79,2%) pacjentów. Ze względu na ograniczenia wiekowe (<6 r.ż) badania nie przeprowadzono u 35 (20,8%) chorych. Prawidłową funkcję płuc stwierdzono u 46 (34,6%) pacjentów, natomiast znaczące zaburzenia w spirometrii u 36 (27,1%) badanych (tabela 12).

Tabela 12. Funkcja płuc.

Wartość FEV1 [%]	n [%]
<40%	36 [27,1]
40-80	51 [38,3]
>80%	46 [34,6]

3.4.2.2.2. Funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki

Ciężką niewydolność zewnątrzwydzielniczą trzustki (stężenie elastazy-1 w stolcu <100 µg/g stolca) stwierdzono u 144 (85,7%) badanych, podczas gdy 24 (14,3%) pacjentów uznano za wydolnych trzustkowo.

3.4.2.2.3. Funkcja wątroby

Marskość oraz hepatopatia występowały odpowiednio u 9 (5,4%) oraz 47 (28,0%) badanych. Średnie aktywności enzymów wątrobowych AspAT, AlAT i GGTP wyniosły 32,7±19,2 U/l (mediana: 28,0), 29,6±23,5 U/l (mediana: 23,5) i 25,9±34,0 U/l (mediana: 14,0). Odsetek pacjentów z prawidłowymi i patologicznymi aktywnościami enzymów wątrobowych przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Funkcja wątroby.

Parametr	Norma		Powyżej normy	
	n	%	n	%
AspAT [U/l]	129	76,8	39	23,2
AlAT [U/l]	135	80,4	33	19,6
GGTP [U/l]	138	82,1	30	17,9

3.4.2.2.4. Kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*

U 72 (42,9%) pacjentów nie stwierdzono obecności *Pseudomonas aeruginosa*, natomiast 96 (57,1%) badanych było przewlekłe skolonizowanych powyższą bakterią.

3.4.2.2.5. Współwystępowanie cukrzycy

Cukrzycę zdiagnozowano u 18 (10,7%) chorych.

3.4.2.3. Zastosowane leczenie

3.4.2.3.1. Suplementacja witaminy K

Witaminą K suplementowanych było 150 (89,3%) pacjentów, podczas gdy 18 (10,7%) chorych nie otrzymywało powyższej witaminy. Zastosowana dawka suplementacyjna mieściła się w zakresie 1,05-70 mg/tydz ($\bar{x}\pm SD$: 14,8 \pm 11,0 mg/tydz; mediana: 10), jednakże 4 (2,4%) pacjentów otrzymywało witaminę K w dawce mniejszej od rekomendowanej dla chorych na CF. Najczęściej stosowanym preparatem witaminy K w badanej grupie, był Vitacon 10mg w tabletkach (tabela 14).

Tabela 14. Preparaty witaminy K zastosowane w modelu przekrojowym drugim.

Preparat witaminy K	n [%]
Vitacon 10mg	111 [74]
AquADEKs	24 [16]
ADEKs	2 [1,3]
Vitacon 10mg + AquADEKs	9 [6]
Vitacon 10mg + ADEKs	4 [2,7]

3.4.2.3.2. Suplementacja enzymów trzustkowych

Enzymy trzustkowe podawano 146 (86,9%) pacjentom, a dawka suplementacyjna mieściła się w zakresie 526-11494 FIP/kg m.c./dz ($\bar{x}\pm SD$: 4541 \pm 2289 FIP/kg mc./dz; mediana: 4084).

3.4.2.3.3. Podaż antybiotyków pobieranych na stałe

Odsetek pacjentów otrzymujących antybiotyki na stałe wziewnie i doustnie zestawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Podaż antybiotyków pobieranych na stałe wziewnie i doustnie.

Antybiotykoterapia		n [%]
Wziewna	Tak	42 [25,0]
	Nie	126 [75,0]
Doustna	Tak	46 [27,4]
	Nie	122 [72,6]

3.4.2.3.4. Podaż antybiotyków w ostatnich 3 miesiącach

Odsetek pacjentów poddanych antybiotykoterapii dożylniej oraz doustnej w ostatnich trzech miesiącach zestawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Dożylna i doustna podaż antybiotyków w ostatnich 3 miesiącach.

Antybiotykoterapia		n [%]
Dożylna	Tak	100 [59,5]
	Nie	68 [40,5]
Doustna	Tak	31 [18,5]
	Nie	137 [81,5]

3.4.2.3.5. Wziewna glikokortykosteroidoterapia

Wziewne glikokortykosteroidy otrzymywało 81 (48,2%) pacjentów.

3.4.3. MODEL DŁUGOFALOWY

3.4.3.1. Stan odżywienia. Pomiary antropometryczne

Wartości masy i wysokości ciała dwa odchylenia standardowe poniżej średniej stwierdzono odpowiednio u 5 (10,6%) oraz 12 (25,5%) pacjentów. Standaryzowane wartości wysokości i masy ciała w badanej grupie zestawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Parametry antropometryczne w modelu długofalowym.

Parametr	$X_{sr} \pm SD$	Mediana	1-3 kwartył
Standaryzowana wartość masy ciała	1,23±0,89	-1,31	-1,62 - -0,82
Standaryzowana wartość wysokości ciała	1,13±1,15	-1,06	-1,76 - -0,48

3.4.3.2. Ekspresja kliniczna choroby

3.4.3.2.1. Funkcja płuc

Badanie spirometryczne wykonano u 39 (83,0%) pacjentów. Ze względu na ograniczenia wiekowe (< 6 r.ż) badania nie przeprowadzono u 8 (17,0%) chorych. Prawidłową funkcję płuc stwierdzono u 13 (33,3%) pacjentów, natomiast znaczące zaburzenia w spirometrii u 3 (7,7%) badanych (tabela 18).

Tabela 18. Funkcja płuc.

Wartość FEV1 [%]	n [%]
<40%	3 [7,7]
40-80	23 [59,0]
>80%	13 [33,3]

3.4.3.2.2. Funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki

Ciężką niewydolność zewnątrzwydzielniczą trzustki (stężenie elastazy-1 w stolcu <100 µg/g stolca) stwierdzono u 44 (93,6%) badanych, podczas gdy 3 (6,4%) pacjentów było wydolnych trzustkowo.

3.4.3.2.3. Funkcja wątroby

Średnie aktywności enzymów wątrobowych AspAT, AlAT i GGTP wyniosły $31,5 \pm 13,1$ U/l (mediana: 27,0); $26,5 \pm 15,4$ U/l (mediana: 21,0) i $18,8 \pm 13,9$ U/l (mediana: 15,1). Odsetek pacjentów z prawidłowymi i patologicznymi aktywnościami enzymów wątrobowych przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Funkcja wątroby.

Parametr	Norma		Powyżej normy	
	n	%	n	%
AspAT [U/l]	40	85,1	7	14,9
AlAT [U/l]	38	80,8	9	19,2
GGTP [U/l]*	40	90,9	4	9,1

* U 3 pacjentów nie oznaczono GGTP

3.4.3.2.4. Kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*

U 6 (12,8%) pacjentów nie stwierdzono obecności *Pseudomonas aeruginosa*, natomiast 41 (87,2%) badanych było przewlekle skolonizowanych powyższą bakterią.

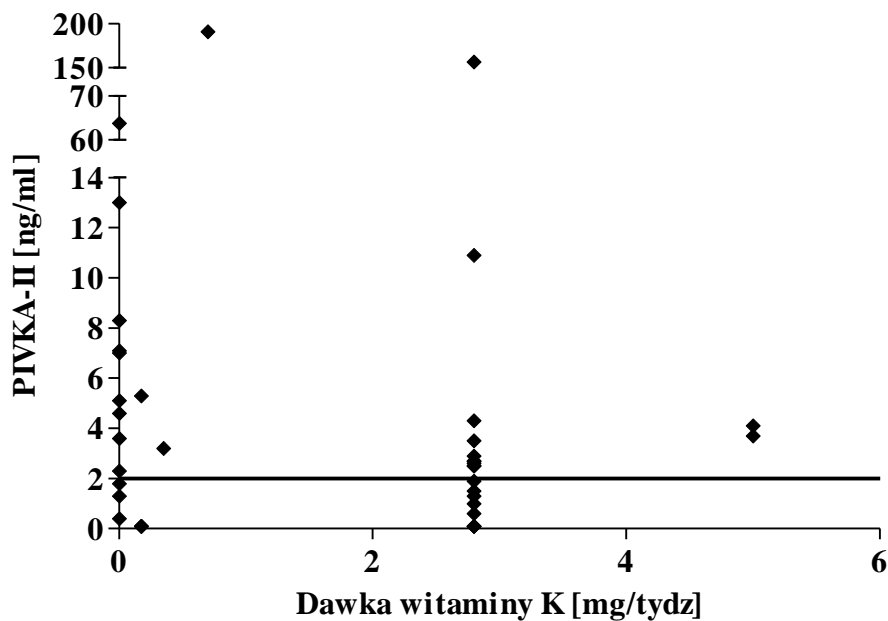
4. WYNIKI

4.1. MODEL PRZEKROJOWY PIERWSZY

4.1.1. ZASOBY USTROJOWE WITAMINY K

Patologiczne stężenia PIVKA-II ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: $21,4 \pm 48,8$ ng/ml; mediana: 4,2) stwierdzono u 24 (63,2%) niemowląt z CF. Niedobór witaminy K wykazano odpowiednio u 12 (60,0%) i 12 (66,7%) niemowląt niepoddawanych i poddawanych suplementacji. Zależność stężenia PIVKA-II od dawki witaminy K przedstawiono na wykresie 1.

Wykres 1. Zależność stężenia PIVKA-II od dawki witaminy K w badanej grupie pacjentów z CF (patologiczne stężenia PIVKA-II >2 ng/ml).



Badane podgrupy pacjentów z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku, standaryzowanej wartości masy i wysokości ciała oraz zastosowanej dawki suplementacyjnej witaminy K wyrażonej w mg/tydz oraz mg/kg/tydz (tabela 20).

Tabela 20. Parametry kliniczne w podgrupach niemowląt z CF.

Badany parametr		PIVKA-II<2 ng/ml	PIVKA-II>2 ng/ml	<i>p</i>
Wiek [lata]	$X_{\bar{r}}\pm SD$	0,6±0,3	0,6±0,2	0,7392
	Mediana	0,7	0,6	
	1-3 kwartyl	0,3-0,9	0,4-0,7	
Standaryzowana wartość masy ciała	$X_{\bar{r}}\pm SD$	-0,79±1,30	-1,06±1,21	0,4959
	Mediana	-0,41	-1,42	
	1-3 kwartyl	-1,89-0,19	-1,85- -0,52	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	$X_{\bar{r}}\pm SD$	0,35±1,85	-0,49±2,03	0,1593
	Mediana	0,43	-0,45	
	1-3 kwartyl	-0,44-1,79	-2,18-0,75	
Dawka witaminy K [mg/tydz]	$X_{\bar{r}}\pm SD$	1,6±1,4	1,6±1,7	0,7568
	Mediana	2,8	1,8	
	1-3 kwartyl	0,2-2,8	0-2,8	
Dawka witaminy K [mg/kg/tydz]	$X_{\bar{r}}\pm SD$	0,21±0,18	0,26±0,29	0,8057
	Mediana	0,27	0,19	
	1-3 kwartyl	0,03-0,33	0-0,42	

Podgrupa niemowląt z CF, u których nie stosowano suplementacji witaminy K, nie różniła się istotnie statystycznie pod względem wieku, standaryzowanej wartości masy i wysokości ciała oraz stężenia PIVKA-II od niemowląt, które otrzymywały powyższą witaminę (tabela 21).

Tabela 21. Parametry kliniczne w podgrupach niemowląt nieotrzymujących i otrzymujących witaminę K.

Badany parametr		Pacjenci bez suplementacji*	Pacjenci z suplementacją	<i>p</i>
Wiek [lata]	X _{śr} ±SD	0,6±0,2	0,6±0,3	0,7700
	Mediana	0,6	0,6	
	1-3 kwartył	0,4-0,8	0,4-0,9	
Standaryzowana wartość masy ciała	X _{śr} ±SD	-0,79±1,31	-1,11±1,18	0,4829
	Mediana	-0,80	-1,42	
	1-3 kwartył	-1,83-0,05	-1,86- -0,22	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	X _{śr} ±SD	-0,01±1,82	-,032±2,16	0,8493
	Mediana	-0,42	0,06	
	1-3 kwartył	-0,85-1,64	-2,07-0,89	
PIVKA-II [ng/ml]	X _{śr} ±SD	17,7±45,6	10,3±34,5	0,2132
	Mediana	4,1	2,6	
	1-3 kwartył	1,4-7,1	1,2-3,5	

* do grupy pacjentów nieotrzymujących witaminy K włączono również chorych otrzymujących dawkę mniejszą niż najmniejsza zalecana - 0,3 mg/d

4.1.2. WPLYW STANU ODŻYWIENIA NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem niedoboru witaminy K u niemowląt z CF a stanem odżywienia (tabela 22).

Tabela 22. Parametry stanu odżywienia w podgrupach niemowląt z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		<i>p</i>
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
Standaryzowana wartość masy ciała	<-1	6 (28,6)	15 (71,4)	0,2401
	>-1	8 (47,1)	9 (52,9)	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	<-1	2 (18,2)	9 (81,8)	0,2496
	>-1	12 (44,4)	15 (55,6)	

4.1.3. WPLYW GENOTYPU I EKSPRESJI KLINICZNEJ CHOROBY NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w częstości występowania niedoboru witaminy K w grupie pacjentów posiadających genotyp F508del/F508del i inne ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR*, skolonizowanych i bez infekcji *Pseudomonas aeruginosa*, a także niewydolnych i wydolnych trzustkowo (tabela 23).

Tabela 23. Wydolność trzustki, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa* i mutacje genu *CFTR* w podgrupach niemowląt z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		p
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
Wydolność trzustki	Tak	3 (33,3)	6 (66,7)	0,8841
	Nie	11 (37,9)	18 (62,1)	
Kolonizacja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tak	0 (0)	5 (100,0)	0,1818
	Nie	14 (42,4)	19 (57,6)	
Mutacja genu <i>CFTR</i>	F508del/F508del	2 (22,2)	7 (77,8)	0,5187
	inna/inna	12 (41,4)	17 (58,6)	
	c/c*	7 (30,4)	16 (69,6)	0,3106
	inna/inna	7 (46,7)	8 (53,3)	

* ciężka klasa mutacji w obu allelach genu *CFTR*

4.1.4. WPLYW STOSOWANEGO LECZENIA NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Nie wykazano istotnie statystycznej różnicy w częstości występowania niedoboru witaminy K w grupie niemowląt poddanych i niepoddanych suplementacji (tabela 24).

Tabela 24. Suplementacja witaminy K w podgrupach niemowląt z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		p
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
Suplementacja witaminy K	<2,1mg/tydz*	8 (40,0)	12 (60,0)	0,6706
	>2,1mg/tydz	6 (33,3)	12 (66,7)	

* do grupy pacjentów nieotrzymujących witaminy K włączono również chorych otrzymujących dawkę mniejszą niż najniższa zalecana - 0,3 mg/d.

4.1.5. ANALIZA KORELACJI LINIOWEJ I REGRESJI WIELORAKIEJ

W modelu przekrojowym pierwszym nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniami PIVKA-II, a wiekiem ($r=0,1723$, $p=0,3010$), standaryzowaną wartością masy ($r= -0,08480$, $p=0,6127$) i wysokości ciała ($r= -0,2953$, $p=0,0718$), dawką witaminy K wyrażoną w mg/tydz ($r= -0,05552$, $p=0,7406$) oraz przeliczoną na mg/kg/tydz ($r= -0,06522$, $p=0,6972$).

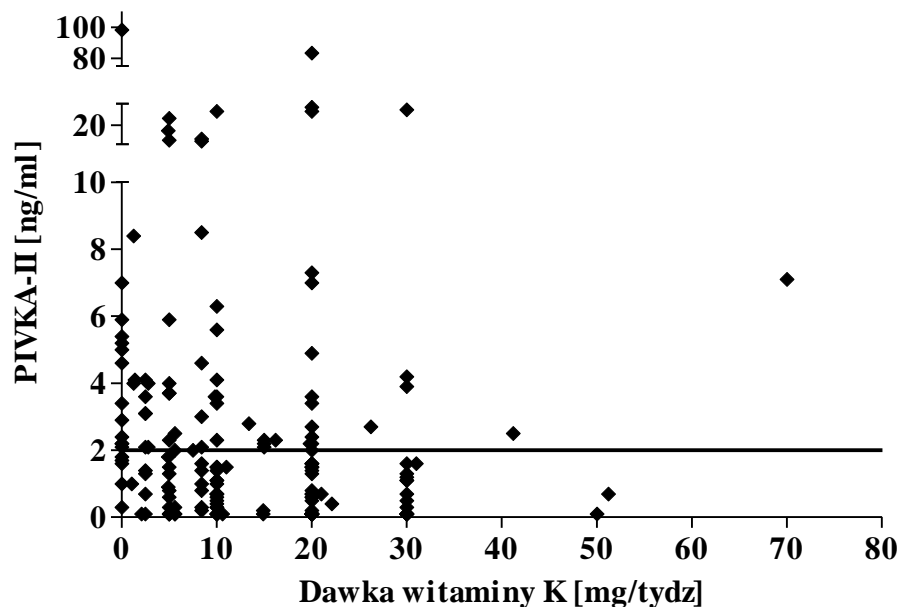
W analizie regresji wielorakiej nie wykazano aby parametry kliniczne - wiek, standaryzowana wartość masy i wysokości ciała, niewydolność trzustki, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, dawka witaminy K oraz mutacja genu *CFTR* były czynnikami ryzyka niedoboru witaminy K w grupie niemowląt.

4.2. MODEL PRZEKROJOWY DRUGI

4.2.1. ZASOBY USTROJOWE WITAMINY K

Patologiczne stężenia PIVKA-II ($X_{sr} \pm SD$: $8,3 \pm 15,4$ ng/ml; mediana: 3,7) stwierdzono u 72 (42,8%) pacjentów. Niedobór witaminy K wykazano odpowiednio u 16 (72,7%) i 56 (38,4%) chorych niepoddawanych i poddawanych suplementacji. Zależność stężenia PIVKA-II od dawki witaminy K przedstawiono na wykresie 2.

Wykres 2. Zależność stężenia PIVKA-II od dawki witaminy K w badanej grupie pacjentów z CF (patologiczne stężenia PIVKA-II >2 ng/ml).



Badane podgrupy pacjentów z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku, standaryzowanej wartości masy i wysokości ciała, FEV1, PT%, stężenia albumin, aktywności enzymów wątrobowych AlAT i GGTP, a także dawkowania enzymów trzustkowych (tabela 25).

Tabela 25. Parametry kliniczne w podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II<2 ng/ml	PIVKA-II>2 ng/ml	<i>p</i>
Wiek [lata]	X _{sr} ±SD	14,5±7,9	12,4±9,1	0,0549
	Mediana	14,1	12,7	
	1-3 kwartyl	8,2-19,5	3,3-17,2	
Standaryzowana wartość masy ciała	X _{sr} ±SD	-0,99±1,07	-0,96±1,05	0,6148
	Mediana	-1,10	-0,90	
	1-3 kwartyl	-1,81- -0,42	-1,59- -0,31	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	X _{sr} ±SD	-0,99±1,35	-0,99±1,31	0,8075
	Mediana	-0,90	-0,80	
	1-3 kwartyl	-1,88- -0,04	-1,88- -0,10	
FEV1 [%]	X _{sr} ±SD	63,2±31,8	65,4±28,0	0,6406
	Mediana	67,5	67,3	
	1-3 kwartyl	30,7-89,0	40,5-89,4	
PT%	X _{sr} ±SD	94,2±8,7	92,0±9,0	0,0806
	Mediana	94,6	92,0	
	1-3 kwartyl	89,0-100,6	85,8-97,7	
Albuminy [g/dl]	X _{sr} ±SD	3,8±0,5	3,9±0,6	0,3273
	Mediana	3,8	3,9	
	1-3 kwartyl	3,5-4,2	3,6-4,2	
GGTP [U/l]	X _{sr} ±SD	23,6±25,4	28,9±42,9	0,9910
	Mediana	14,0	13,0	
	1-3 kwartyl	10,0-25,2	11,0-25,2	
AIAT [U/l]	X _{sr} ±SD	27,7±21,8	32,2±25,6	0,0582
	Mediana	22,0	26,0	
	1-3 kwartyl	16,0-32,0	21,0-30,0	
Dawka enzymów [FIP/kg /d]	X _{sr} ±SD	3835,2±2779,6	4094,0±2424,8	0,6189
	Mediana	3554,5	3856,6	
	1-3 kwartyl	1992,2-5941,6	2306,0-5283,6	

Różnice istotne statystyczne w badanych podgrupach stwierdzono natomiast w odniesieniu do parametru INR, aktywności AspAT, a także dawki suplementacyjnej witaminy K wyrażonej w mg/tydz oraz przeliczonej na mg/kg/tydz (tabela 26).

Tabela 26. Parametry kliniczne w podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II<2 ng/ml	PIVKA-II>2 ng/ml	<i>p</i>
INR	X _{śr} ±SD	1,08±0,11	1,11±0,12	0,0178
	Mediana	1,07	1,11	
	1-3 kwartył	1,00-1,13	1,04-1,18	
AspAT[U/l]	X _{śr} ±SD	30,5±16,8	35,7±21,7	0,0160
	Mediana	26,5	30,0	
	1-3 kwartył	19,0-37,0	25,0-42,0	
Dawka witaminy K[mg/tydz]	X _{śr} ±SD	15,2±10,6	10,7±11,6	0,0006
	Mediana	10,3	8,4	
	1-3 kwartył	7,7-20,0	2,5-19,8	
Dawka witaminy K[mg/kg/tydz]	X _{śr} ±SD	0,43±0,30	0,32±0,27	0,0076
	Mediana	0,40	0,28	
	1-3 kwartył	0,23-0,54	0,11-0,47	

Podgrupa pacjentów z CF, u których nie stosowano suplementacji witaminy K nie różniła się istotnie statystycznie pod względem standaryzowanej wartości masy i wysokości ciała, FEV1, PT%, INR, stężenia albumin, aktywności GGTP oraz dawki enzymów trzustkowych od chorych, którzy poddani byli suplementacji (tabela 27).

Tabela 27. Parametry kliniczne w podgrupach pacjentów z CF nieotrzymujących i otrzymujących witaminę K.

Badany parametr		Pacjenci bez suplementacji*	Pacjenci z suplementacją	<i>p</i>
Standaryzowana wartość masy ciała	X _{śr} ±SD	-0,77±0,80	-1,00±1,09	0,3076
	Mediana	-0,83	-1,00	
	1-3 kwartył	-1,36- -0,43	-1,86- -0,32	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	X _{śr} ±SD	-0,85±1,1	-1,01±1,36	0,5426
	Mediana	-0,66	-0,84	
	1-3 kwartył	-1,52- -0,06	-1,98- -0,03	
FEV1 [%]	X _{śr} ±SD	73,2±34,1	63,1±29,9	0,2326
	Mediana	84,9	67,0	
	1-3 kwartył	50,5-101,7	35,3-87,7	
PT%	X _{śr} ±SD	93,1±9,8	93,3±8,8	0,8196
	Mediana	95,2	93,0	
	1-3 kwartył	87,0-99,6	88,0-99,0	
INR	X _{śr} ±SD	1,1±0,1	1,1±0,1	0,6082
	Mediana	1,1	1,1	
	1-3 kwartył	1,0-1,2	1,0-1,2	
Albuminy [g/dl]	X _{śr} ±SD	3,9±0,5	3,8±0,6	0,7558
	Mediana	3,9	3,9	
	1-3 kwartył	3,6-4,2	3,6-4,2	
GGTP [U/l]	X _{śr} ±SD	21,6±19,2	26,5±35,8	0,7902
	Mediana	13,5	14,0	
	1-3 kwartył	10,2-23,2	10,0-26,0	
Dawka enzymów [FIP/kg /d]	X _{śr} ±SD	3281,5±2303,8	4046,3±2667,2	0,2184
	Mediana	3082,5	3801,0	
	1-3 kwartył	1392-4936,7	2264,6-5676,5	

* do grupy pacjentów nieotrzymujących witaminy K włączono również chorych otrzymujących dawkę mniejszą niż najmniejsza zalecana - 0,3 mg/d.

Z kolei istotne statystycznie różnice pomiędzy pacjentami bez suplementacji oraz otrzymującymi witaminę K wykazano w odniesieniu do wieku, aktywności enzymów AlAT i AspAT, stężenia PIVKA-II (tabela 28).

Tabela 28. Parametry kliniczne w podgrupach pacjentów z CF nieotrzymujących i otrzymujących witaminy K.

Badany parametr		Pacjenci bez suplementacji*	Pacjenci z suplementacją	<i>p</i>
Wiek [lata]	X _{sr} ±SD	10,2±10,9	14,1±7,9	0,0073
	Mediana	7,3	14,1	
	1-3 kwartył	1,6-15,1	7,9-19,2	
AlAT [U/l]	X _{sr} ±SD	38,6±35,0	28,3±21,1	0,0398
	Mediana	27,0	23,0	
	1-3 kwartył	22,0-37,0	18,0-30,8	
AspAT [U/l]	X _{sr} ±SD	46,0±34,7	30,7±14,8	0,0236
	Mediana	37,5	28,0	
	1-3 kwartył	23,5-51,0	22,0-35,8	
PIVKA-II [ng/ml]	X _{sr} ±SD	7,8±20,3	3,4±8,4	0,0005
	Mediana	3,2	1,4	
	1-3 kwartył	1,9-5,2	0,3-2,8	

* do grupy pacjentów nieotrzymujących witaminy K włączono również chorych otrzymujących dawkę mniejszą niż najmniejsza zalecana - 0,3 mg/d.

4.2.2. WPLYW STANU ODŻYWIENIA NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Nie wykazano aby częstość występowania niedoboru witaminy K u pacjentów z CF pozostawała w związku ze stanem odżywienia (tabela 29).

Tabela 29. Parametry stanu odżywienia w podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		<i>p</i>
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
Standaryzowana wartość masy ciała	<-1	49 (59,8)	33 (40,2)	0,5039
	>-1	47 (54,7)	39 (45,3)	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	<-1	47 (63,5)	27 (36,5)	0,1387
	>-1	49 (52,1)	45 (47,9)	
Albuminy [g/dl]	Poniżej wartości referencyjnych	76 (55,1)	62 (44,9)	0,2448
	W granicach wartości referencyjnych	20 (66,7)	10 (33,3)	

4.2.3. WPŁYW GENOTYPU I EKSPRESJI KLINICZNEJ CHOROBY NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Niedobór witaminy K znacznie częściej występował w grupie pacjentów niewydolnych trzustkowo oraz posiadających genotyp F508del/F508del lub inne ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR*. Pozostałe parametry związane z ekspresją kliniczną choroby nie różniły się istotnie statystycznie w badanych podgrupach pacjentów z CF (tabela 30).

Tabela 30. Parametry kliniczne w podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		p
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
FEV1	<80%	55 (63,2)	32 (36,8)	0,7902
	>80%	28 (60,9)	18 (39,1)	
Wydolność trzustki	Tak	21 (87,5)	3 (12,5)	0,0012
	Nie	75 (52,1)	69 (47,9)	
Choroby wątroby	Marskość	5 (55,6)	4 (44,4)	1,0000
	Hepatopatia	27 (57,4)	20 (42,6)	
	Nie	64 (57,1)	48 (42,9)	
Cukrzyca	Tak	12 (66,7)	6 (33,3)	0,3875
	Nie	84 (56,0)	66 (44,0)	
Kolonizacja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tak	56 (58,3)	40 (41,7)	0,7188
	Nie	40 (55,6)	32 (44,4)	
Mutacja genu <i>CFTR</i>	F508del/F508del	36 (48,6)	38 (51,4)	0,0484
	inna/inna	60 (63,8)	34 (36,2)	
	c/c*	54 (50,5)	53 (49,5)	0,0206
	inna/inna	42 (68,9)	19 (31,1)	

* ciężka klasa mutacji w obu allelach genu *CFTR*

4.2.4. WPLYW STOSOWANEGO LECZENIA NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Na częstość występowania niedoboru witaminy K nie miała wpływu podaż antybiotyków pobieranych na stałe wziewnie i doustnie, antybiotykoterapia dożylna

i doustna w ostatnich trzech miesiącach poprzedzających badanie, a także glikokortykosteroidoterapia. Jednakże pacjenci, którzy otrzymywali witaminę K znacznie częściej mieli prawidłowe jej zasoby ustrojowe (tabela 31)

Tabela 31. Antybiotykoterapia, glikokortykosteroidoterapia oraz suplementacja witaminy K w wybranych podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		p
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
Antybiotyki pobierane na stałe wziewnie	Tak	27 (64,3)	15 (35,7)	0,2801
	Nie	69 (54,8)	57 (45,2)	
Antybiotyki pobierane na stałe doustnie	Tak	31 (67,4)	15 (32,6)	0,0993
	Nie	65 (53,3)	57 (46,7)	
Antybiotykoterapia dożylna w ostatnich 3 miesiącach	Tak	55 (55,0)	45 (45,0)	0,4961
	Nie	41 (60,3)	27 (39,7)	
Antybiotykoterapia doustna w ostatnich 3 miesiącach	Tak	22 (71,0)	9 (29,0)	0,0850
	Nie	74 (54,0)	63 (46,0)	
Glikokortyko- steroidoterapia	Tak	41 (50,6)	40 (49,4)	0,0991
	Nie	55 (63,2)	32 (36,8)	
Suplementacja witaminy K	<2,1mg/tydz*	6 (27,3)	16 (72,7)	0,0024
	>2,1mg/tydz	90 (61,6)	56 (38,4)	

* do grupy pacjentów nieotrzymujących witaminy K włączono również chorych otrzymujących dawkę mniejszą niż najmniejsza zalecana - 0,3 mg/d.

4.2.5. ANALIZA KORELACJI LINIOWEJ I REGRESJI WIELORAKIEJ

W modelu przekrojowym drugim nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem PIVKA-II, a wiekiem ($r = -0,06662$, $p = 0,3909$), standaryzowaną wartością masy ciała

($r = -0,1327$, $p = 0,0865$), FEV1 ($r = -0,07328$, $p = 0,4019$), stężeniem albumin ($r = -0,06331$, $p = 0,4149$), a także dawką witaminy K wyrażoną w mg/tydz ($r = -0,05308$, $p = 0,4944$) i przeliczoną na mg/kg/tydz ($r = -0,03414$, $p = 0,6604$) oraz dawką enzymów trzustkowych ($r = 0,04515$, $p = 0,5611$). Z kolei dodatnią korelację wykazano pomiędzy stężeniem PIVKA-II a INR ($r = 0,2931$, $p = 0,0001$), GGTP ($r = 0,1541$, $p = 0,0461$), AlAT ($r = 0,2294$, $p = 0,0028$), AspAT ($r = 0,2604$, $p = 0,0007$), a ujemną ze standaryzowaną wartością wysokości ciała ($r = -0,1677$, $p = 0,0298$) oraz PT% ($r = -0,2884$, $p = 0,0002$).

Wzrost wartości parametru INR oraz współwystępowanie chorób wątroby (marskość, hepatopatia) pozostają w związku ze stężeniem PIVKA-II (odpowiednio $p = 0,018766$ oraz $p = 0,033081$). Pozostałe parametry kliniczne - wiek, standaryzowana wartość masy i wysokości ciała, FEV1, niewydolność trzustki, cukrzyca, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, stężenie albumin, aktywność enzymów wątrobowych (AlAT, AspAT, GGTP), antybiotykoterapia pobierana na stałe wziewnie i doustnie oraz podawana dożylnie i doustnie w ostatnich trzech miesiącach, glikokortykosteroidoterapia, podaż enzymów trzustkowych, mutacja genu *CFTR*, nie stanowią czynnika ryzyka niedoboru witaminy K u pacjentów z CF w modelu przekrojowym drugim.

4.3. MODEL DŁUGOFALOWY

4.3.1. ZASOBY USTROJOWE WITAMINY K

W modelu długofalowym patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzono u 36 (76,6%) spośród 47 pacjentów niesuplementowanych witaminą K. Badane podgrupy chorych z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II nie różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku, standaryzowanej wartości wysokości ciała, FEV1 oraz aktywności enzymów wątrobowych - GGTP, AlAT, AspAT. Z kolei istotną statystycznie różnicę wykazano w odniesieniu do standaryzowanej wartości masy ciała (tabela 32).

Tabela 32. Parametry kliniczne w podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II<2	PIVKA-II>2	<i>p</i>
		ng/ml	ng/ml	
Wiek [lata]	$X_{sr} \pm SD$	12,7±5,6	8,8±5,0	0,0595
	Mediana	11,4	8,3	
	1-3 kwartył	8,7-15,0	4,9-12,8	
Standaryzowana wartość masy ciała	$X_{sr} \pm SD$	-1,79±0,92	-1,09±0,80	0,0201
	Mediana	-1,74	-1,25	
	1-3 kwartył	-2,27- -1,25	-1,51- -0,80	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	$X_{sr} \pm SD$	-1,69±1,11	-1,02±1,12	0,1223
	Mediana	-2,24	-0,96	
	1-3 kwartył	-2,49- -0,80	-1,67- -0,34	
FEV1 [%]	$X_{sr} \pm SD$	66,4±23,7	72,4±20,9	0,4082
	Mediana	60,4	77,0	
	1-3 kwartył	46,3-83,5	57,8-85,5	
GGTP [U/l]	$X_{sr} \pm SD$	17,7±6,6	19,8±15,6	0,6309
	Mediana	16,0	15,0	
	1-3 kwartył	15,0-18,0	13,0-18,0	
AIAT [U/l]	$X_{sr} \pm SD$	26,7±16,9	25,7±15,0	0,9298
	Mediana	21,0	20,0	
	1-3 kwartył	17,0-33,0	17,0-26,2	
AspAT [U/l]	$X_{sr} \pm SD$	29,0±11,8	32,3±13,6	0,4656
	Mediana	27,0	28,0	
	1-3 kwartył	21,5-33,5	23,0-41,2	
Glu-OC [%]	$X_{sr} \pm SD$	51,8±28,2	66,3±24,9	0,1106
	Mediana	61,9	76,6	
	1-3 kwartył	36,8-68,5	55,9-84,2	

4.3.2. WPLYW STANU ODZYWIENIA NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Wykazano, że częstość występowania niedoboru witaminy K u pacjentów z CF nie pozostaje w związku ze stanem odżywienia (tabela 33).

Tabela 33. Standaryzowana wartość masy i wysokości ciała w badanych podgrupach pacjentów z CF.

Badany parametr		PIVKA-II		<i>p</i>
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
Standaryzowana wartość masy ciała	<-1	10 (31,2)	22 (68,8)	0,1373
	>-1	1 (6,7)	14 (93,3)	
Standaryzowana wartość wysokości ciała	<-1	8 (30,8)	18 (69,2)	0,3269
	>-1	3 (14,3)	18 (85,7)	

4.3.3. WPLYW GENOTYPU I EKSPRESJI KLINICZNEJ CHOROBY NA CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Niedobór witaminy K znacznie częściej występował w grupie pacjentów posiadających ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR*. Pozostałe parametry związane z ekspresją kliniczną choroby nie różniły się istotnie statystycznie w badanych podgrupach pacjentów z CF (tabela 34).

Tabela 34. FEV1, wydolność trzustki, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa* oraz mutacje genu *CFTR* w badanych podgrupach pacjentów.

Badany parametr		PIVKA-II		p
		Prawidłowa n (%)	Nieprawidłowa n (%)	
FEV1	<80%	8 (30,8)	18 (69,2)	0,8999
	>80%	3 (23,1)	10 (76,9)	
Wydolność trzustki	Tak	1 (33,3)	2 (66,7)	0,7757
	Nie	10 (22,7)	34 (77,3)	
Kolonizacja <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tak	9 (22,0)	32 (78,0)	0,9213
	Nie	2 (33,3)	4 (66,7)	
Mutacja genu <i>CFTR</i>	F508del/F508del	2 (14,3)	12 (85,7)	0,5585
	inna/inna	9 (27,3)	24 (72,7)	
	c/c*	6 (16,7)	30 (83,3)	0,0484
	inna/inna	5 (45,4)	6 (54,5)	

* ciężka klasa mutacji w obu allelach genu *CFTR*

4.3.4. ANALIZA REGRESJI LINIOWEJ I REGRESJI WIELORAKIEJ

W modelu długofalowym nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniami PIVKA-II, a wiekiem ($r=0,1035$, $p=0,4888$), standaryzowaną wartością masy ($r= -0,05326$, $p=0,7222$) i wysokości ciała ($r= -0,1741$, $p=0,2417$), FEV1 ($r=0,06024$, $p=0,7156$). Z kolei dodatnią korelację wykazano pomiędzy stężeniem PIVKA-II a aktywnością enzymów wątrobowych - GGTP ($r=0,8219$, $p<0,0001$), AlAT ($r=0,4365$, $p=0,0022$) oraz AspAT ($r=0,6446$, $p<0,0001$).

W analizie regresji wielorakiej wykazano, że aktywność GGTP ($p=0,000931$) pozostaje w związku ze stężeniem PIVKA-II. Pozostałe parametry kliniczne - wiek, standaryzowana wartość masy i wysokości ciała, FEV1, wydolność trzustki, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, aktywność enzymów wątrobowych (AlAT, AspAT), mutacja

genu *CFTR* nie są czynnikami ryzyka niedoboru witaminy K w grupie pacjentów niepoddawanych dotychczas jej suplementacji.

4.3.5. DŁUGOFALOWA OBSERWACJA SUPLEMENTACJI WITAMINY K

W oparciu o patologiczne stężenia PIVKA-II, 36 pacjentów przez okres dwóch miesięcy otrzymywało witaminę K w dawce 2,5 mg/tydz. Po okresie suplementacyjnym przebadano 29 chorych, z czego u 22 (75,9%) stwierdzono nieprawidłowe stężenia PIVKA-II. Stężenie powyższego parametru wraz z odsetkiem Glu-OC po zastosowanej suplementacji porównano z wynikami uzyskanymi przed podażą witaminy K. Wykazano istotnie statystycznie obniżenie stężenia PIVKA-II bez zmiany odsetka Glu-OC (tabela 35).

Tabela 35. Zasoby ustrojowe witaminy K po suplementacji dawką 2,5 mg/tydz.

Badany parametr Mediana (1-3 kwartyl)	PIVKA-II [ng/ml]	Glu-OC [%]
Bez suplementacji	5,6 (3,7-12,5)	76,5 (54,6-82,5)
Po suplementacji witaminą K 2,5 mg/tydz	3,4 (2,0-8,0)	79,3 (51,7-85,4)
<i>p</i>	0,0089	0,6266

W kolejnym etapie spośród 22 pacjentów, u których zastosowano suplementację w dawce 5,0 mg/tydz, zasoby ustrojowe witaminy K zostały ocenione u 13 chorych. W tej grupie badanych patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzono u 9 (69,2%) pacjentów z CF. Stężenie PIVKA-II oraz odsetek Glu-OC u tych chorych porównano z wynikami uzyskanymi przed podażą witaminy K oraz po suplementacji w dawce 2,5 mg/tydz. Podaż 5,0 mg witaminy K/tydz istotnie statystycznie obniżała stężenie PIVKA-II, pozostając bez wpływu na odsetek Glu-OC (tabela 36).

Tabela 36. Zasoby ustrojowe witaminy K po suplementacji dawką 2,5 oraz 5,0 mg/tydz.

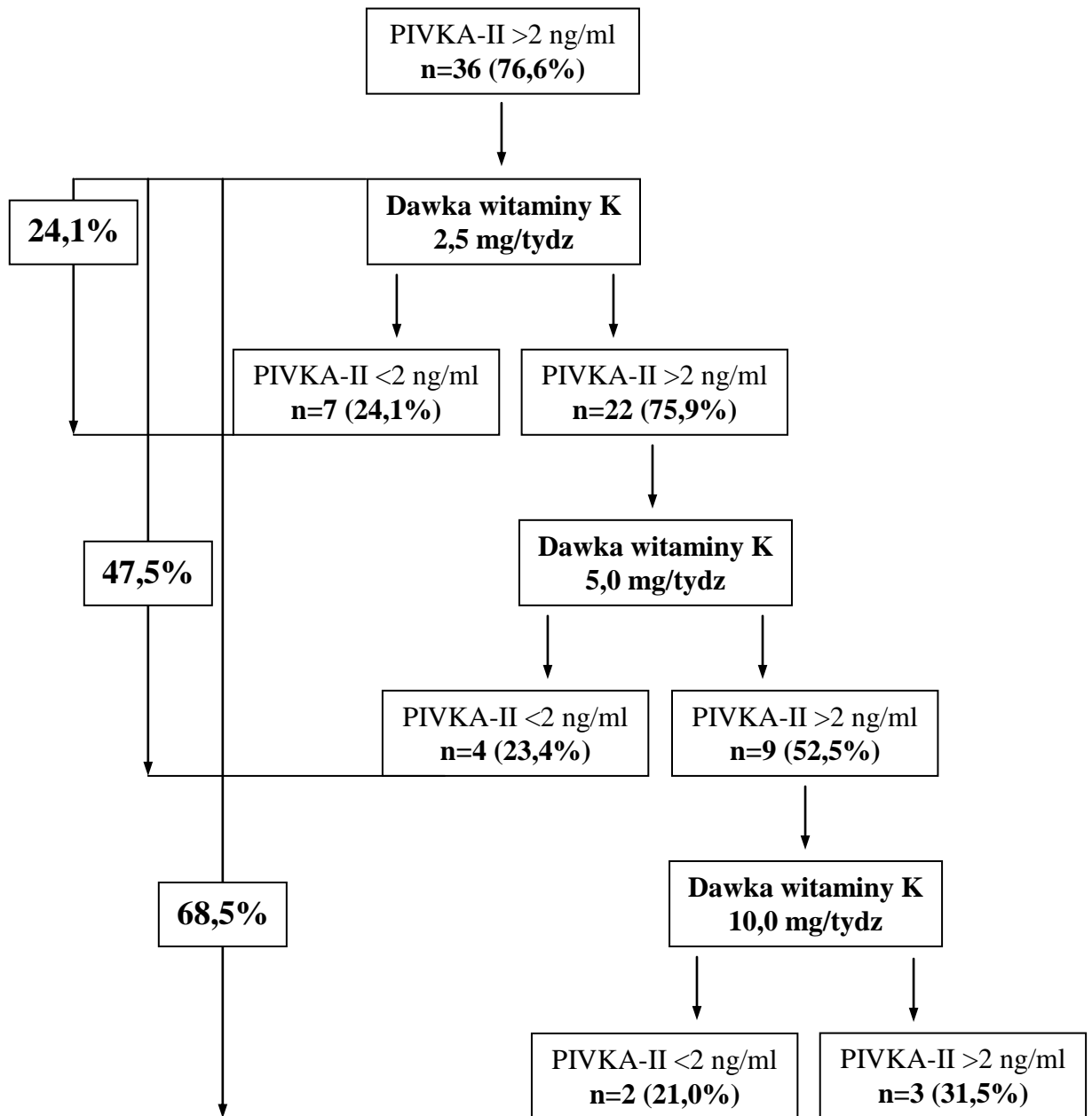
Badany parametr Mediana (1-3 kwartyl)	PIVKA-II [ng/ml]	Glu-OC [%]
Bez suplementacji	8,0 (5,6-16,8)	78,3 (59,5-82,6)
Po suplementacji witaminą K 2,5 mg/tydz	8,9 (5,1-19,0)	83,2 (76,5-87,8)
Po suplementacji witaminą K 5,0 mg/tydz	3,5 (1,8-4,9)	78,8 (60,6-86,4)
<i>p</i>	0,0312	0,3679

Spośród 9 pacjentów, którzy wymagali zwiększenia dawki witaminy K do 10,0 mg/tydz, jej zasoby ustrojowe zostały ocenione u 5 chorych. W 3 (60%) przypadkach nie uzyskano normalizacji parametru PIVKA-II. Skuteczność suplementacji w dawce 10,0 mg/tydz porównano z okresem bez podaży powyższej witaminy, a także z dawką 2,5 oraz 5,0 mg/tydz. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic (tabela 37). Na ryc. 7 przedstawiono schemat suplementacji.

Tabela 37. Zasoby ustrojowe witaminy K w grupie pacjentów po suplementacji dawką 2,5 mg/tydz, 5,0 oraz 10,0 mg/tydz.

Badany parametr Mediana (1-3 kwartył)	PIVKA-II [ng/ml]	Glu-OC [%]
Bez suplementacji	8,8 (8,6-13,7)	87,7 (82,6-93,9)
Po suplementacji witaminą K 2,5 mg/tydz	14,1 (7,6-88,8)	85,1 (68,7-88,3)
Po suplementacji witaminą K 5,0 mg/tydz	7,8 (5,2-31,2)	86,4 (80,0-88,7)
Po suplementacji witaminą K 10,0 mg/tydz	2,9 (0,9-3,2)	41,2 (10,4-49,3)
<i>p</i>	0,1272	0,0858

Ryc.7. Schemat suplementacji witaminy K w modelu długofalowym.



4.4. PORÓWNANIE PRZYDATNOŚCI OZNACZANIA PIVKA-II I PARAMETRÓW KOAGULOLOGICZNYCH W OCENIE WYSTĘPOWANIA NIEDOBORU WITAMINY K

Prawidłowe wartości zarówno PT% oraz INR stwierdzono u 160 (95,2%) pacjentów z CF. Tylko u 4 badanych patologicznym stężeniem PIVKA-II odpowiadały nieprawidłowe wartości powyższych parametrów. W tabeli 38 dokonano analizy przydatności parametrów koagulologicznych w ocenie występowania niedoboru witaminy K.

Tabela 38. Porównanie przydatności oznaczania PIVKA-II i parametrów koagulologicznych w ocenie występowania niedoboru witaminy K.

Stężenie PIVKA-II [ng/ml]	Parametry koagulologiczne (PT%, INR)		<i>p</i>
	Patologiczne n (%)	Prawidłowe n (%)	
Patologiczne	4 (2,4)	68 (40,5)	<0,0001
Prawidłowe [<2ng/ml]	4 (2,4)	92 (54,8)	

5. DYSKUSJA

CF jest jedną z najczęściej występujących w populacji kaukaskiej genetycznie uwarunkowanych chorób o autosomalnym recesywnym typie dziedziczenia [75]. W latach 2006-2010 w Polsce w skryningu noworodkowym, CF wykryto u 221 pacjentów. W tym okresie łącznie przebadano 1212487 noworodków. Na podstawie powyższych danych wskaźnik zapadalności na CF w polskiej populacji oszacowano na 1/4394 [117].

Pacjenci z CF stanowią wysoką grupę ryzyka występowania niedoboru witaminy K. Dodatkowo istotnym problemem jest dobór odpowiedniej dawki suplementacyjnej, która pozwoliłaby na zachowanie jej prawidłowych zasobów ustrojowych w tej grupie chorych [61]. Okazuje się bowiem, że zastosowana suplementacja poprawia parametry związane z niedoborem witaminy K lecz nie doprowadza do ich całkowitej normalizacji [12]. Z drugiej strony zdarza się, że po podaży witaminy K odsetek pacjentów z CF, u których nie stwierdza się już niedoboru, jest niewielki [40]. W aspekcie leczenia osteopenii i osteoporozy u chorych na CF, choć widoczna jest poprawa w markerach niedoboru powyższej witaminy, nie zwiększa się gęstość mineralna kości [86].

Wychodząc naprzeciw powyższym problemom, celem pracy była ocena częstości występowania niedoboru witaminy K, a także egzogennych i endogennych uwarunkowań jej zasobów ustrojowych. Z praktycznego punktu widzenia istotnym stało się również określenie wielkości dawki suplementacyjnej powyższej witaminy. Realizując założone cele, badanie przeprowadzono w trzech modelach eksperymentalnych: przekrojowym pierwszym i drugim oraz długofalowym, do których włączono odpowiednio niemowlęta z CF, pacjentów powyżej 1 r.ż oraz chorych, którzy nigdy nie otrzymywali witaminy K.

Do oceny zasobów ustrojowych witaminy K można stosować pomiar jej stężenia w surowicy lub osoczu krwi [124], a także alternatywnie oznaczać jej metabolity - 5C- i 7C- aglikony - w moczu [49]. Jednakże na podstawie powyższych parametrów nie można wnioskować o poziomach witaminy K w tkankach. Taką informację dostarcza natomiast ocena gamma-karboksylacji białek Gla. Pomiar poziomu PIVKA-II umożliwia oszacowanie wątrobowych zasobów witaminy K [105]. Z kolei Glu-OC dostarcza informacji na temat jej magazynów w kościach [46].

W badaniach własnych do oceny zasobów ustrojowych witaminy K wykorzystano czuły marker - PIVKA-II oraz dodatkowo w modelu długofalowym - odsetek Glu-OC.

W badaniach własnych patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzono u 63,2% niemowląt. Odsetek niemowląt niepoddawanych i poddawanych suplementacji powyższą witaminą, u których wykazano nieprawidłowe jej zasoby ustrojowe wyniósł odpowiednio 60,0% oraz 66,7% i nie różnił się. Dla porównania Sokol i wsp. ocenili zasoby ustrojowe witaminy K w grupie 36 niemowląt z CF w 1 tygodniu oraz 6 i 12 miesiącu życia w oparciu o parametr PIVKA-II wykrywany metodą immunoelektroforezy przed i po absorpcji węgla baru. Autorzy nie wykazali niedoboru witaminy K w grupie badanej. Do głównych przyczyn takiego stanu rzeczy zaliczyli domięśniową podaż powyższej witaminy wszystkim niemowlętom po urodzeniu oraz zastosowanie odpowiedniej dawki enzymów trzustkowych [119]. Występowanie nieprawidłowych zasobów ustrojowych witaminy K jest dobrze opisane w grupach pacjentów z CF w szerokim przedziale wiekowym, gdzie do ich oceny wykorzystano parametr PIVKA-II, odsetek Glu-OC oraz stężenie witaminy K oznaczone odpowiednio metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang.: high performance liquid chromatography - HPLC), immunoenzymatyczną (ang.: enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) oraz radioimmunologiczną (ang.: radioimmunoassay - RIA) [39, 40, 82, 102, 137]. Brak jest natomiast danych literaturowych odnoszących się tylko do najmłodszych chorych. Dostępne piśmiennictwo ogranicza się bowiem do opisów pojedynczych przypadków niemowląt z CF, u których obserwowano krwawienia związane z niedoborem witaminy K, będące często pierwszym objawem klinicznym CF [47, 77, 89, 98, 128, 133].

W modelu przekrojowym pierwszym nie wykazano aby stan odżywienia, genotyp, wydolność trzustki, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, suplementacja witaminy K miały wpływ na częstość występowania jej niedoborów. Nie stwierdzono również korelacji pomiędzy stężeniami PIVKA-II, a wiekiem, standaryzowaną wartością masy i wysokości ciała oraz dawką suplementacyjną witaminy K. Analiza regresji wielorakiej pozwalająca ocenić jednoczesny wpływ wielu zmiennych niezależnych na zmienną zależną nie wykazała aby powyższe parametry mogły wpływać na stężenie PIVKA-II w grupie niemowląt z CF. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że dużym ograniczeniem modelu przekrojowego pierwszego jest mała liczebność grupy.

W modelu przekrojowym drugim patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzono u 72 (42,8%) pacjentów spośród 168, jednakże biorąc pod uwagę tylko chorych bez

suplementacji odsetek wyniósł 72,7%. W badaniu Dougherty i wsp., przeprowadzonym w grupie 97 pacjentów z CF w wieku 8-25 lat suplementowanych witaminą K w dawce niskiej ($<150 \mu\text{g}/\text{dzień}$), średniej ($150-999 \mu\text{g}/\text{dzień}$) oraz wysokiej ($\geq 1000 \mu\text{g}/\text{dzień}$), nieprawidłowe stężenie PIVKA-II stwierdzono odpowiednio u 67%, 58% oraz 29% chorych [39]. Grey i wsp. w badaniach przeprowadzonych w grupie 81 dzieci z CF w średnim wieku 12,6 lat suplementowanych witaminą K w dawce $295 \pm 184 \mu\text{g}/\text{dobę}$, nieprawidłowe stężenia PIVKA-II lub Glu-OC stwierdzili u 82% pacjentów [45]. Conway i wsp. patologiczne stężenia powyższego parametru wykazali u 65 (70,0%) spośród 93 pacjentów z CF powyżej 5 r.ż., którzy nie byli poddawani suplementacji. Z kolei po podaży witaminy K w dawce $10 \text{ mg}/\text{dobę}$ w grupie 15 dzieci, w 7 (46,7%) przypadkach nie wykazano normalizacji parametru PIVKA-II [26]. Wilson i wsp. patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzili u 58 (81%) spośród 72 pacjentów nieotrzymujących witaminy K. Po suplementacji w dawce $0,15-0,30 \text{ mg}/\text{dobę}$ w 29 (40%) przypadkach nadal utrzymywał się jej niedobór [137]. Rashid i wsp. nieprawidłowe stężenia PIVKA-II (mediana: $7,5 \mu\text{g}/\text{L}$) wykazali u 65 (78%) spośród 83 chorych z niewydolnością trzustki i nieotrzymujących witaminy K [102].

W grupie pacjentów z CF zakwalifikowanych do modelu przekrojowego drugiego nie wykazano aby częstość występowania niedoboru witaminy K pozostawała w związku ze stanem odżywienia. Pacjenci z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II nie różnili się istotnie statystycznie standaryzowaną wartością masy i wysokości ciała. Wykazano natomiast ujemną korelację pomiędzy stężeniem PIVKA-II a standaryzowaną wartością wysokości ciała. Z dostępnych danych piśmienniczych wynika, że prawidłowy stan odżywienia jest niezwykle ważny dla chorych na CF [17]. Prawidłowe żywienie jest niezbędne do utrzymania odpowiedniej masy ciała, która z kolei jest czynnikiem determinującym masę kostną. Właściwy stan odżywienia jest szczególnie istotny w okresie dojrzewania, kiedy następuje przyrost kostny. Wiadomo również, że u pacjentów z CF z niskim BMI wzrasta umieralność [50]. Dlatego tak ważne jest zapobieganie oraz wczesna interwencja u chorych zagrożonych niedożywieniem [17]. Jednakże niewiele jest danych piśmienniczych oceniających potencjalny wpływ stanu odżywienia u pacjentów z CF na parametry związane z zasobami ustrojowymi witaminy K. W badaniu Dougherty i wsp. wykazano, że chorzy z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II różnili się istotnie statystycznie standaryzowaną wartością wysokości ciała ($-0,7 \pm 0,9$ vs. $-0,2 \pm 0,8$) oraz BMI ($-0,6 \pm 0,8$ vs. $-0,1 \pm 0,8$). W badaniu własnym stwierdzono ujemną korelację

pomiędzy standaryzowaną wartością wysokości ciała a stężeniem PIVKA-II. Nicolaidou i wsp w swoim badaniu wykazali, że standaryzowana wartość BMI w grupach osób zdrowych oraz pacjentów z CF przed suplementacją i 1 rok po podaży witaminy K, mieściła się w granicach wartości prawidłowych. Jednakże, w grupie zdrowych ochotników była ona istotnie statystycznie większa w porównaniu z chorymi na CF [86].

W modelu przekrojowym drugim, u pacjentów którzy mieli zachowaną funkcję trzustki znacznie częściej obserwowano prawidłowe stężenia PIVKA-II w porównaniu z pacjentami niewydolnymi trzustkowo ($p=0,0012$). Niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki oraz zaburzenia wchłaniania tłuszczów i soli żółciowych u pacjentów z CF, skutkują zwiększonym ryzykiem występowania niedoborów witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, w tym witaminy K [16, 42, 56, 73, 88]. W większości dostępnych danych piśmienniczych do badań kwalifikowani byli pacjenci z CF niewydolni trzustkowo, dlatego też trudno porównać częstość występowania niedoboru witaminy K w grupach chorych z wydolną oraz niewydolną trzustką [39, 40, 45, 82, 137]. Jedynie Rashid i wsp. przebadali 83 pacjentów z CF niewydolnych trzustkowo w wieku 0,6-45,8 lat oraz 15 w wieku 6,5-45,3 lat z prawidłową funkcją trzustki. W powyższym badaniu wykazali istotnie statystycznie większe stężenia PIVKA-II u chorych niewydolnych trzustkowo w porównaniu z pacjentami z prawidłową funkcją narządu ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: $22,8 \pm 35,7 \mu\text{g/L}$ vs. $3,4 \pm 2,2 \mu\text{g/L}$, $p < 0,05$) [102]. W swoim badaniu, Nicolaidou i wsp. stwierdzili znaczące różnice w stężeniach parametrów Glu-OC (mediana: 4,0 vs. 8,1 ng/ml, $p=0,017$) oraz Gla-OC (mediana: 22,0 vs. 13,8 ng/ml, $p=0,002$) w grupach osób zdrowych oraz chorych na CF, nieotrzymujących witaminy K i niewydolnych trzustkowo [86]. Podobnie Hoorn i wsp. wykazali znacząco większe stężenia PIVKA-II u pacjentów z CF niewydolnych trzustkowo oraz niesuplementowanych lub otrzymujących witaminę K w dawce $< 2,5$ mg/dzień, w porównaniu z osobami zdrowymi [52].

Choroby wątroby związane z CF (ang.: CFLD - cystic fibrosis - related liver disease) wynikają z nadlepkości żółci, która powoduje niedrożność dróg żółciowych występującą do 1/3 pacjentów z CF. Diagnostyka CFLD jest niezwykle trudna, ponieważ jej obraz kliniczny może obejmować proste stłuszczenie wątroby, aż po wielozrazikową marskość żółciową z nadciśnieniem wrotnym [60]. W pierwszej dekadzie życia 5-10% chorych rozwija marskość wątroby. U większości chorych pojawiające się nadciśnienie wrotne, może skutkować krwawieniami z żyłaków

przełyku lub niewydolnością narządu [34]. Choroby wątroby wymienia się jako jeden z czynników ryzyka niedoboru witaminy K u pacjentów z CF [56, 130]. Z kolei na podstawie danych piśmienniczych wiadomo, że u dzieci oraz dorosłych z chorobami wątroby występują podwyższone stężenia PIVKA-II lub obniżone stężenia witaminy K [67, 71, 90].

W modelu przekrojowym drugim nie wykazano, aby choroby wątroby wpływały na częstość występowania niedoboru witaminy K u pacjentów z CF. Jednakże, pacjenci z patologicznymi oraz prawidłowymi stężeniami PIVKA-II różnili się istotnie statystycznie aktywnością AspAT ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$; mediana: $35,7 \pm 21,7$; $30,0$ U/l vs $30,5 \pm 16,8$; $26,5$ U/l; $p=0,0160$) czego nie zaobserwowano dla enzymów AlAT oraz GGTP. Z kolei porównując grupy chorych niesuplementowanych ($n=22$) oraz suplementowanych ($n=146$) witaminą K różnice dotyczyły zarówno AlAT ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$; mediana: $38,6 \pm 35,0$; $27,0$ U/l vs $28,3 \pm 21,1$; $23,0$ U/l; $p=0,0398$), jak i AspAT ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$; mediana: $46,0 \pm 34,7$; $37,5$ U/l vs $30,7 \pm 14,8$; $28,0$ U/l; $p=0,0236$). Większe aktywności AlAT oraz AspAT u chorych nieotrzymujących witaminy K mogą wynikać z faktu, iż porównano ze sobą dwie grupy, które znacząco różniły się liczebnością. W powyższym modelu stwierdzono również dodatnią korelację pomiędzy stężeniami PIVKA-II a aktywnością enzymów wątrobowych: AlAT ($p=0,0028$), AspAT ($p=0,0007$), GGTP ($p=0,0461$). W badaniu Stropke i wsp. przeprowadzonym w grupie 31 pacjentów w wieku 0,5-54 lat bez CF ale z cholestatyczną chorobą wątroby, niedobór witaminy K stwierdzono u 68% badanych pomimo stosowanej suplementacji. Dodatkowo wykazano dodatnią korelację pomiędzy parametrem PIVKA-II a aktywnością AlAT ($p=0,02$) oraz AspAT ($p=0,01$) [121]. W badaniach Mosler i wsp. spośród 15 pacjentów z CF ze współistniejącymi chorobami wątroby, którzy otrzymywali doustnie kwas ursodeoksycholowy z powodu wysokich aktywności GGTP, tylko w 2 przypadkach wykazano prawidłowe stężenia PIVKA-II [82]. Wilson i wsp. przebadali 72 chorych na CF, ale tylko 6 miało zdiagnozowaną chorobę wątroby. Patologiczne stężenia PIVKA-II (mediana; zakres: $4,1$; $5,5-55$ ng/ml) wykazali we wszystkich 6 przypadkach [137]. W badaniach Rashida i wsp. spośród 98 pacjentów z CF, 83 było niewydolnych trzustkowo, a 8 z nich miało chorobę wątroby. Patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzono u wszystkich 8 badanych i były one większe w porównaniu z pacjentami, którzy byli niewydolni trzustkowo ale bez współistniejących chorób wątroby ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: $46,6 \pm 65,3$ vs $15,3 \pm 26,1$ $\mu\text{g/L}$; $p<0,05$) [102].

Cukrzyca związana z mukowiscydozą (ang.: cystic fibrosis - related diabetes - CFRD) występuje u ok. 20% chorych w okresie dojrzewania oraz u 40-50% dorosłych. Rzadko pojawia się w dzieciństwie, chociaż jej występowanie opisano w każdym wieku włączając okres niemowlęcy. Cukrzyca związana jest z ciężkimi mutacjami w obrębie genu *CFTR*, gorszą funkcją płuc, niedożywieniem, chorobami wątroby, niewydolnością trzustki oraz stosowaniem glikokortykosteroidów [81]. W badaniach własnych nie wykazano aby obecność cukrzycy wpływała na częstość występowania niedoboru witaminy K u chorych na CF. W najnowszych badaniach Ibarrola-Jurado i wsp. przeprowadzonych w grupie 1925 zdrowych kobiet i mężczyzn wykazano, że podaż witaminy K1 w dawce 100 µg/dzień redukuje ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2 o 17% [54]. Beulens i wsp. uzyskali podobne wyniki zarówno w odniesieniu do witaminy K1, jak i K2 [18]. Z kolei w badaniu Yoshidy i wsp. nie stwierdzono aby podaż witaminy K1 wpływała na stężenie glukozy oraz insuliny na czczo [139]. Dostępne dane piśmiennicze odnoszą się zatem głównie do wpływu powyższej witaminy na obniżanie ryzyka występowania cukrzycy natomiast brak jest informacji na temat wpływu cukrzycy na zasoby ustrojowe witaminy K.

W modelu przekrojowym drugim nie wykazano również aby kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa* wpływała na częstość występowania niedoboru witaminy K u chorych na CF. Obecność *Pseudomonas aeruginosa* w dolnych drogach oddechowych związana jest z szybkim spadkiem funkcji płuc, pogorszeniem stanu odżywienia, częstszymi hospitalizacjami oraz krótszą długością życia. Jest coraz więcej dowodów na to, że wcześnie rozpoczęte leczenie antybiotykami po wystąpieniu infekcji stanowi efektywną strategię w skutecznej eradykacji, a tym samym może opóźnić przewlekłą kolonizację. Główną przyczyną przewlekłej kolonizacji *Pseudomonas aeruginosa* jest tworzenie biofilmu, który przyczynia się między innymi do wzrostu oporności na antybiotyki [23]. Brak jest niestety danych piśmienniczych mówiących o występowaniu niedoboru witaminy K u pacjentów z CF skolonizowanych *Pseudomonas aeruginosa*.

W modelu przekrojowym drugim patologiczne stężenia PIVKA-II znacznie częściej występowały u pacjentów z CF, którzy posiadali genotyp F508del/F508del ($p=0,0484$) lub dwie ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR* ($p=0,0206$). Gen *CFTR* został odkryty w 1989 r. Od tego momentu zidentyfikowano ponad 1800 mutacji. Mutacje genu *CFTR* zostały podzielone na 5 klas. Klasy I-III (np. F508del, 1717-1G>A, G542X, N1303K, R553X, 621+1G>T) charakteryzują się ciężkim przebiegiem choroby z powodu braku ekspresji genu, podczas gdy IV-V (np. R347P, 3849+10kbC>T,

3272-26A>G, 621+3A>G, 711+3A>G) odpowiada za łagodny obraz kliniczny na skutek zachowania częściowej ekspresji i funkcji *CFTR* [93]. Uwzględniając możliwe konsekwencje, wyróżniamy również cztery grupy mutacji: A - powodujące CF, B - zaburzające funkcję białka *CFTR*, C - niemające konsekwencji klinicznych oraz D - o niepewnym znaczeniu klinicznym. Pacjentów z CF, u których zidentyfikowano mutacje należące do klasy I-III charakteryzuje również niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki, natomiast klasa IV-V daje wysokie prawdopodobieństwo zachowania wydolności trzustki, co skutkuje lepszym stanem odżywienia chorych lecz nie zwalnia ich z ryzyka wystąpienia zapalenia trzustki. Chociaż nie znaleziono korelacji pomiędzy mutacjami genu *CFTR* a niedrożnością smółkową i jej ekwiwalentami, chorobami wątroby oraz cukrzycą, powyższe objawy prawie nigdy nie występują z mutacjami, które nie manifestują się nieprawidłową funkcją trzustki [21]. Brak jest danych piśmienniczych dotyczących zależności pomiędzy mutacją genu *CFTR*, a występowaniem niedoboru witaminy K. Z kolei wiadomo, że ciężkie mutacje charakteryzują się gorszym obrazem klinicznym pacjenta, co również może mieć przełożenie na występowanie patologicznych zasobów ustrojowych powyższej witaminy u tych chorych. Z drugiej strony nie bez znaczenia jest występowanie niewydolności trzustki w ciężkich mutacjach genu *CFTR* która, jak wiadomo jest czynnikiem ryzyka niedoboru witaminy K [56, 102].

Jako jedną z przyczyn niedoboru witaminy K w grupie pacjentów z CF podaje się zmniejszoną jej produkcję przez bakterie jelitowe na skutek długotrwałej antybiotykoterapii [41]. Na podstawie analizy modelu przekrojowego drugiego, częstość występowania niedoboru witaminy K u chorych na CF nie zależy od antybiotykoterapii podawanej na stałe wziewnie i doustnie, a także dożylnie i doustnie w ostatnich trzech miesiącach poprzedzających badanie. W oparciu o dostępne dane piśmiennicze wpływ antybiotykoterapii na zasoby ustrojowe witaminy K w CF nie jest jednoznaczny. W badaniu Montalemberta i wsp. wykazano istotną statystycznie różnicę ($p < 0,001$) pomiędzy stężeniami PIVKA-II u pacjentów niepoddawanych ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: $7,8 \pm 12,4$ mU/ml) oraz poddawanych ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: $18,9 \pm 14,8$ mU/ml) antybiotykoterapii [80]. Z kolei Beker i wsp. w grupie 18 chorych w wieku 13-35 lat otrzymujących witaminę K w dawce 5 mg/tydz przez okres 4 tygodni nie stwierdzili istotnie statystycznej korelacji pomiędzy podażą antybiotyków a stężeniami PIVKA-II [12]. Rashid i wsp. patologiczne poziomy PIVKA-II wykazali u 76% oraz 83% pacjentów z CF niewydolnych trzustkowo ($n=83$), odpowiednio otrzymujących i nieotrzymujących

antybiotyku. Z kolei w grupie chorych z prawidłową funkcją trzustki (n=15), nieprawidłowe stężenia powyższego parametru udokumentowali u 5 pacjentów, spośród których antybiotyki otrzymywały tylko 2 osoby. Podobnie jak Beker i wsp. nie stwierdzili korelacji pomiędzy powyższym parametrem a antybiotykoterapią oraz nie wykazali różnicy w stężeniach PIVKA-II w grupie pacjentów otrzymujących i nieotrzymujących antybiotyku [102]. Warto zwrócić uwagę na badanie Conly'ego i Steina, w którym przebadano pośmiertnie 22 ludzkie wątroby pochodzące od 9 osób, które otrzymywały przed śmiercią antybiotyki o szerokim spektrum działania oraz 13, które były ofiarami nagłej, niespodziewanej śmierci. Wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniu MK pomiędzy osobami poddawanymi oraz niepoddawanymi antybiotykoterapii ($X_{sr} \pm SEM$: 70,0 \pm 23,3 vs 423,1 \pm 141,0 pmol/g tkanki). W odniesieniu do stężeń PK, grupy nie różniły się między sobą ($X_{sr} \pm SEM$: 21,9 \pm 15,5 vs 16,0 \pm 9,3 pmol/g tkanki) [24]. Brak zależności pomiędzy podażą antybiotyków a zasobami ustrojowymi witaminy K w badanej grupie pacjentów z CF może tłumaczyć fakt, że chorzy suplementowani byli witaminą K1, a antybiotykoterapia jak pokazują powyższe wyniki znacząco wpływa na poziomy witaminy K2. Choć witamina K2 syntetyzowana jest przez bakterie jelitowe, dyskusyjna pozostaje ciągle kwestia jej biodostępności z jelit [114]. Nie zostało udowodnione aby obniżenie syntezy witaminy K2 przez bakterie jelitowe mogło doprowadzić do niedoboru powyższej witaminy w organizmie [113]. Jej udział w utrzymywaniu prawidłowych zasobów ustrojowych witaminy K jest zatem mniejszy niż wcześniej zakładano [122].

W badaniach własnych nie wykazano również aby glikokortykosteroidoterapia wpływała na częstość występowania niedoboru witaminy K w CF. Z dostępnych danych piśmienniczych wynika, że glikokortykosteroidoterapia jest jednym z czynników odpowiedzialnych za obniżenie BMD u pacjentów z CF. 20-50% chorych stosuje powyższą terapię w celu poprawy funkcji układu oddechowego najczęściej w postaci leków wziewnych [10]. Brak jest natomiast danych piśmienniczych na temat ewentualnego wpływu terapii na stężenia PIVKA-II.

Dawkowanie witaminy K w poszczególnych ośrodkach różniło się, nie było wcześniej monitorowane i często mogło być również zbyt wysokie. W modelu przekrojowym drugim chorzy z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II różnili się istotnie statystycznie dawką witaminy K wyrażoną w mg/tydz ($p=0,0006$) oraz przeliczoną na mg/kg/tydz ($p=0,0076$). Z kolei pacjenci suplementowani byli starsi ($p=0,0073$) oraz mieli istotnie statystycznie mniejsze stężenia PIVKA-II ($p=0,0005$)

w porównaniu z nieotrzymującymi powyższej witaminy. Chorzy, którym podawano witaminę K, częściej mieli prawidłowe jej zasoby ustrojowe. Jednakże nie wykazano korelacji pomiędzy parametrem PIVKA-II a dawką suplementacyjną powyższej witaminy. Dougherty i wsp. w swoim badaniu stwierdzili ujemną zależność pomiędzy podażą witaminy K a PIVKA-II oraz odsetkiem Glu-OC. W grupach pacjentów otrzymujących niską (<150 µg/dzień), średnią (159-999 µg/dzień) oraz wysoką (≥1000 µg/dzień) dawkę witaminy K, patologiczne stężenia PIVKA-II wykazali odpowiednio w 67%, 58% oraz 29% przypadkach. Odsetek pacjentów z nieprawidłowymi poziomami PIVKA-II był istotnie statystycznie mniejszy po zastosowaniu wysokiej dawki witaminy K w porównaniu z suplementacją <150 µg/dzień. [39]. Wilson i wsp. wykazali również istotnie statystycznie mniejsze stężenia PIVKA-II u pacjentów po okresie suplementacyjnym w porównaniu z okresem bez podaży witaminy K ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$; mediana: 10,1±26,7; 2,2 vs. 16,6±26,8; 7,3 ng/ml). W grupie chorych otrzymujących i nieotrzymujących powyższą witaminę, patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzili odpowiednio w 40% oraz 81% przypadków [137]. Baker L.T. i wsp. udokumentowali stężenia PIVKA-II 21,8±3,2 ng/ml oraz 5,1±3,2 ng/ml odpowiednio w grupach pacjentów niesuplementowanych oraz suplementowanych witaminą K w dawce 5 mg/tydz [12].

W oparciu o analizę regresji wielorakiej w badaniu własnym wykazano, że czynnikami predykcyjnymi w odniesieniu do stężenia PIVKA-II są współwystępowanie chorób wątroby (marskość, hepatopatia) oraz wartości wskaźnika INR. Pozostałe parametry kliniczne analizowane w modelu przekrojowym drugim - wiek, standaryzowana wartość masy i wysokości ciała, stężenie albumin, FEV₁, niewydolność trzustki, cukrzyca, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, aktywność enzymów wątrobowych, antybiotykoterapia, glikokortykosteroidoterapia, podaż enzymów trzustkowych, mutacja genu *CFTR* nie stanowiły czynnika ryzyka niedoboru witaminy K u pacjentów z CF ocenianej w oparciu o parametr PIVKA-II. W badaniu Dougherty i wsp. w analizie regresji wielokrotnej wykazano, że wiek, płeć, a także suplementacja witaminy K oraz D₃ są czynnikami predykcyjnymi zasobów ustrojowych powyższej witaminy ale ocenianych za pomocą odsetka Glu-OC, a nie przy wykorzystaniu parametru PIVKA-II. [39].

Poszukując czynników mogących mieć znaczenie w występowaniu niedoboru witaminy K u pacjentów z CF, analizę wybranych parametrów klinicznych podjęto również u pacjentów zakwalifikowanych do modelu długofalowego, którzy nigdy nie

byli suplementowani powyższą witaminą. Chorzy z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II różnili się istotnie statystycznie standaryzowaną wartością masy ciała. Nie wykazano natomiast wpływu stanu odżywienia, genotypu oraz ekspresji klinicznej choroby na częstość występowania niedoboru witaminy K. Stwierdzono natomiast dodatnią korelację pomiędzy stężeniami PIVKA-II, a aktywnością enzymów wątrobowych (AlAT, AspAT, GGTP). Z kolei analiza regresji wielorakiej wykazała, że jedynym czynnikiem predykcyjnym dla parametru PIVKA-II jest aktywność GGTP. Pozostałe parametry wiek, standaryzowane wartości masy i wysokości ciała, FEV1, wydolność trzustki, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, aktywność AlAT oraz AspAT, a także mutacja genu *CFTR* nie są czynnikami ryzyka niedoboru witaminy K.

W celu ustalenia wielkości dawki suplementacyjnej u pacjentów z CF zakwalifikowanych do modelu długofalowego, po każdorazowej zmianie dawki suplementacyjnej witaminy K, jej zasoby ustrojowe oceniano przy wykorzystaniu parametru PIVKA-II oraz dodatkowo odsetka Glu-OC. Nie ulega wątpliwości, że powyższa witamina jest niezbędna w procesie karboksylacji osteokalcyny produkowanej przez osteoblasty podczas tworzenia kości [15, 57]. Nieprawidłowe zasoby ustrojowe witaminy K przyczyniają się do występowania niskiego BMD u pacjentów z CF, co może skutkować wzrostem częstości patologicznych złamań [10, 112]. Ponieważ witamina K jest w większym stopniu wychwytywana przez wątrobę niż przez kości uważa się, że Glu-OC może być bardziej czułym markerem jej niedoboru niż PIVKA-II, dlatego też powyższy parametr został włączony do oceny skuteczności dawki suplementacyjnej. Osteokalcyna jest pierwszym białkiem, które pojawia się w formie niekarboksylowanej przy niedoborach witaminy K i jako ostatnia przechodzi w formę karboksylowaną, po uzupełnieniu jej zasobów ustrojowych [127].

W modelu długofalowym odsetek pacjentów z patologicznymi stężeniami PIVKA-II wyniósł 76,6% i był porównywalny z uzyskanym u chorych bez suplementacji w modelu przekrojowym drugim (72,7%). W badaniach własnych wykazano, że podaż witaminy K chorym niesuplementowanym w dawce 2,5 mg/tydz znacząco obniża stężenia PIVKA-II (mediana: 5,6 ng/ml vs. 3,4 ng/ml; $p=0,0089$), natomiast nie wpływa na odsetek Glu-OC (mediana: 76,5% vs. 79,3%). Porównując brak suplementacji z podażą dawki 2,5 oraz 5 mg/tydz stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stężeniu PIVKA-II (mediana: 8,0 ng/ml vs. 8,9 ng/ml vs. 3,5 ng/ml, $p=0,0312$). Dawka 5 mg/tydz okazała się nieskuteczną w obniżaniu odsetka Glu-OC (mediana: 78,3 % vs. 83,2 % vs. 78,8 %). Suplementację witaminy K w dawce 10 mg/tydz wdrożono tylko

u 5 pacjentów, co stanowi dość duże ograniczenie tej części eksperymentu. Ze względu na niewielką grupę badaną nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w stężeniu PIVKA-II oraz Glu-OC w porównaniu z dawką 0, 2,5 oraz 5 mg/tydz. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, iż stężenie PIVKA-II obniżyło się z 7,8 ng/ml do 2,9 ng/ml, a odsetek Glu-OC zmniejszył się z 86,4 % do 41,2 % przy zwiększeniu dawki z 5 do 10 mg/tydz. Jednakże, pomimo zastosowanej suplementacji nie wykazano całkowitej normalizacji powyższych parametrów.

Uzyskane wyniki potwierdzają fakt, że odsetek Glu-OC w porównaniu z PIVKA-II znacznie później reaguje na uzupełnianie zasobów ustrojowych witaminy K. W badaniu własnym dopiero dawka 10 mg/tydz powyższej witaminy wpłynęła na obniżenie jej odsetka. Wynika to z faktu, że wątroba posiada bardzo efektywny mechanizm wyłapywania witaminy K z osocza krwi i utrzymywania jej prawidłowych zasobów w tkankach, pomimo niskiego stężenia we krwi. Kości potrzebują wysokich stężeń powyższej witaminy w krążeniu i dlatego są bardziej narażone na jej niedobory. Niedobór witaminy K w kościach może istnieć przy prawidłowych jej zasobach w wątrobie [82].

W badaniu Wilsona i wsp. w grupie 72 chorych w wieku 0,6 miesięcy do 46 lat, zastosowano suplementację witaminy K w dawce 0,15 mg/dobę u dzieci między 4 a 10 r.ż, natomiast u pacjentów >10 r.ż - 0,30 mg/dobę. Pomimo niewielkiej dawki patologiczne stężenia PIVKA-II stwierdzono tylko u 40% badanych. Autorzy zasugerowali, że codzienna suplementacja może być bardziej skuteczna niż podaż tygodniowa [137]. W modelu długofalowym w badaniu własnym po zastosowaniu suplementacji w dawce 2,5 mg/tydz patologiczne stężenia PIVKA-II występowały aż u 75,9% chorych.

Beker i wsp. stwierdzili, że dawka witaminy K 5mg/tydz, pozwala na obniżenie parametrów związanych z jej niedoborem ale nie powoduje ich całkowitej normalizacji u wszystkich badanych. Stężenie PIVKA-II oraz odsetek Glu-OC w grupie pacjentów nieotrzymujących i otrzymujących witaminę K w dawce 5 mg/tydz wyniosły odpowiednio $21,8 \pm 3,2$ ng/ml i $5,1 \pm 3,2$ ng/ml oraz $31 \pm 3\%$ i $17 \pm 3\%$ [12]. W badaniach własnych po podaży 5 mg witaminy K/tydz, u 52,5% chorych nie osiągnięto normalizacji PIVKA-II.

Nicolaidou i wsp. przez okres jednego roku podawali pacjentom witaminę K w dawce 10 mg/tydz. W porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych chorzy suplementowani mieli istotnie statystycznie mniejsze stężenia Glu-OC (mediana:

4,0 ng/ml vs. 1,25 ng/ml, $p < 0,001$) [86]. Dougherty i wsp. wykazali patologiczne stężenia PIVKA-II u 67%, 58% oraz 29% pacjentów otrzymujących odpowiednio witaminę K w dawce niskiej (0-86 $\mu\text{g}/\text{dobę}$), średniej (150-380 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) oraz wysokiej (1371-10000 $\mu\text{g}/\text{dobę}$). Dokonali również porównania odsetka Glu-OC w trzech podgrupach pacjentów otrzymujących witaminę K w powyższych dawkach i stwierdzili odpowiednio jej niedobór u 37%, 18%, 5% oraz niewystarczające zasoby ustrojowe u 59%, 70%, 38% chorych. Zatem pomimo wysokiej dawki suplementacyjnej (1371-10000 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) nieprawidłowe poziomy witaminy K w oparciu o parametry PIVKA-II oraz Glu-OC stwierdzano odpowiednio u 29% oraz 43% pacjentów [39]. Drury i wsp. w grupie 14 dzieci z CF z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki w wieku 8-18 lat po trwającym miesiąc okresie suplementacyjnym, stwierdzili normalizację odsetka Glu-OC < 21% tylko u 1 oraz 2 pacjentów otrzymujących odpowiednio witaminę K w dawce 5 oraz 1 mg/dobę. Odsetek Glu-OC po zastosowanej suplementacji obniżył się znacząco (mediana: 46,8% vs. 29,1%, $p < 0,0003$) [40]. W badaniu Conwaya i wsp. spośród 106 dzieci powyżej 5 r.ż., 15 z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki otrzymywało witaminę K w dawce aż 10 mg/dobę. U 4 z nich wykazano wzrost stężenia witaminy K, a u trzech pacjentów stwierdzono również normalizację PIVKA-II. Dwoje dzieci miało prawidłowe stężenia zarówno witaminy K, jak i PIVKA-II, a dwoje niskie poziomy witaminy K, z czego u jednego z badanych wykazano prawidłowe stężenie PIVKA-II. U pozostałych 7 pacjentów witamina K była niewykrywalna, lecz u 2 obserwowano poziomy PIVKA-II w granicach normy [26]. W modelu przekrojowym drugim w badaniu własnym tylko u jednego pacjenta zastosowano witaminę K w dawce 70 mg/tydzień, jednakże zarówno stężenie PIVKA-II, jak i odsetek Glu-OC wskazywał na występowanie patologicznych zasobów ustrojowych powyższej witaminy.

Według najnowszych europejskich zaleceń dawka suplementacyjna witaminy K w CF powinna być zróżnicowana od 0,3 mg/dobę do 10 mg/tydzień [29, 116]. Z kolei w oparciu o wytyczne Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy dawka terapeutyczna mieści się w zakresie 2,5 - 20 mg/tydzień [131]. Na podstawie wyników własnych 10 mg witaminy K /tydzień pozwala na poprawę parametrów PIVKA-II oraz odsetka Glu-OC u pacjentów z CF, jednakże nie doprowadza do normalizacji zasobów ustrojowych powyższej witaminy u wszystkich chorych. W 31,5% przypadkach nadal stwierdzano nieprawidłowe jej zasoby ustrojowe. Należy zatem indywidualnie dobierać dawkę suplementacyjną i bezwzględnie monitorować zasoby ustrojowe witaminy K.

Choć w rutynowej diagnostyce do oceny niedoboru witaminy K wykorzystuje się parametr PT [8] z danych literaturowych wynika, że tylko 50% prawidłowego stężenia protrombiny wystarcza aby czas protrombinowy mieścił się w granicach wartości referencyjnych [25]. W najnowszych badaniach przeprowadzonych przez Dituriego i wsp. 53 zdrowe noworodki po 30 dniach od podaży profilaktycznej dawki witaminy K (0,5 mg i.m.) zostały podzielone na trzy grupy, w których otrzymywały powyższą witaminę w dawkach 25 i 12 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ oraz placebo. We wszystkich grupach oceniono PT oraz stężenie PIVKA-II po upływie kolejnych 30 oraz 90 dni. Wykazano istotnie statystyczny wzrost PIVKA-II ($p=0,001$) między 30 a 90 dniem w grupie noworodków otrzymujących 12 μg witaminy K/dobę oraz w grupie z placebo ($p<0,001$), bez zmiany w parametrze PT [36]. W badaniach własnych pacjenci z prawidłowymi oraz patologicznymi stężeniami PIVKA-II różnili się istotnie statystycznie wartością parametru INR ($p=0,0178$). Wykazano również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem PIVKA-II a INR ($p=0,0001$), a ujemną z PT% ($p=0,0002$). Parametr INR okazał się również czynnikiem predykcyjnym dla parametru PIVKA-II ($p=0,033081$). Jednakże, spośród 72 pacjentów z CF z patologicznymi stężeniami PIVKA-II tylko u 4 (5,6%) badanych stwierdzono nieprawidłowe wartości parametrów koagulologicznych PT% oraz INR. Istotna statystycznie różnica ($p<0,0001$) pomiędzy parametrami koagulologicznymi a PIVKA-II potwierdza małą ich przydatność w ocenie niedoboru witaminy K.

W przeprowadzonym badaniu analizowano częstość występowania niedoboru witaminy K u pacjentów z CF, egzogenne i endogenne uwarunkowania jej zasobów ustrojowych oraz podjęto próbę określenia wielkości dawki suplementacyjnej. Wykazano, że niedobór witaminy K jest częsty w tej grupie pacjentów i pojawia się już w okresie niemowlęcym. Wielkość podaży witaminy K w CF wydaje się być uzależniona od współistniejących chorób wątroby. Dobór odpowiedniej dawki suplementacyjnej witaminy K w tej grupie pacjentów wymaga monitorowania jej zasobów ustrojowych. Parametry koagulologiczne nie są skuteczną metodą oceny niedoboru powyższej witaminy.

6. WNIOSKI

1. Niedobór witaminy K u chorych na CF jest częsty, pojawia się już w okresie niemowlęcym oraz pomimo stosowanej suplementacji.
2. Nie ma dobrych czynników prognostycznych niedoboru witaminy K u chorych na CF. Czynnikiem ryzyka występowania niedoboru witaminy K są choroby wątroby.
3. Nieprawidłowe stężenie niekarboksylowanej protrombiny występuje częściej u pacjentów niewydolnych trzustkowo oraz posiadających dwie ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR*.
4. U chorych na CF konieczne jest wczesne wdrożenie suplementacji witaminy K.
5. Nie można jednoznacznie określić wielkości dawki suplementacyjnej witaminy K, stąd wskazane jest stałe monitorowanie jej zasobów ustrojowych.
6. Parametry koagulologiczne nie są dobrą metodą oceny niedoboru powyższej witaminy.

7. STRESZCZENIE

Mukowiscydoza (ang.: cystic fibrosis - CF) jest najczęściej występującą w populacji kaukaskiej chorobą genetyczną, o autosomalnym recesywnym typie dziedziczenia. Jej przyczyną są mutacje genu *CFTR* (ang.: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), zlokalizowanego na chromosomie 7. Produktem powyższego genu jest białko CFTR, spełniające rolę kanału chlorkowego, które obecne jest na szczytowej powierzchni komórek nabłonkowych wydzielania zewnętrznego. Efektem mutacji genu *CFTR* jest brak funkcjonalnego białka, co w konsekwencji prowadzi do gromadzenia lepkiego śluzu w wielu narządach układu oddechowego i pokarmowego. Chorzy na CF są narażeni na niedobór witaminy K z powodu: zaburzeń wchłaniania tłuszczów (niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki), chorób wątroby, długotrwałej antybiotykoterapii oraz resekcji fragmentu jelita cienkiego w przebiegu niedrożności smółkowej. Pomimo dostępnych danych, sugerujących występowanie ryzyka niedoboru witaminy K u wszystkich pacjentów z CF, wielkość dawki suplementacyjnej nie jest jednoznacznie określona, a efekty samej suplementacji pozostają niejednoznaczne.

Celem pracy była ocena częstości występowania niedoboru witaminy K u pacjentów z CF, egzogennych i endogennych uwarunkowań jej zasobów ustrojowych, określenie wielkości dawki suplementacyjnej oraz porównanie przydatności oceny parametrów koagulologicznych z pomiarem stężeń niekarboksylowanej protrombiny w ocenie ustrojowych zasobów witaminy K.

Badania zostały przeprowadzone w latach 2009-2012 u chorych na CF w trzech modelach eksperymentalnych: dwóch przekrojowych oraz jednym długofalowym. Do modelu przekrojowego pierwszego i drugiego zakwalifikowano odpowiednio 38 niemowląt z CF rozpoznanych w skryningu noworodkowym otrzymujących i nieotrzymujących witaminy K oraz 168 chorych na CF w wieku 1,2-41,4 lat suplementowanych i niesuplementowanych powyższą witaminą. Z kolei do modelu długofalowego włączono 47 pacjentów w wieku 1,0-23,5 lat, którzy nigdy nie otrzymywali witaminy K. W modelu przekrojowym pierwszym dokonano oceny stanu odżywienia (standaryzowane wartości masy oraz wysokości ciała), genotypu, ekspresji klinicznej choroby (funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki - elastaza-1 w stolcu, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*), suplementacji witaminy K oraz stężenia niekarboksylowanej protrombiny (ang.: prothrombin induced by vitamin K absence

- PIVKA-II). W modelu przekrojowym drugim oceniono stan odżywienia (standaryzowane wartości masy oraz wysokości ciała, stężenie albumin), genotyp, ekspresję kliniczną choroby (funkcja płuc - spirometria, funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki - elastaza-1 w stolcu, wykładniki biochemiczne funkcji wątroby - AlAT, AspAT, GGTP, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, choroby współistniejące - cukrzyca, marskość wątroby), stosowane leczenie (suplementacja witaminy K i enzymów trzustkowych, podaż antybiotyków pobieranych na stałe wziewnie i doustnie, antybiotykoterapia dożylna oraz doustna w ostatnich trzech miesiącach, glikokortykosteroidoterapia), a także stężenie PIVKA-II oraz parametry koagulologiczne (PT%, INR). W modelu długofalowym dokonano oceny stanu odżywienia (standaryzowane wartości masy oraz wysokości ciała), genotypu, ekspresji klinicznej choroby (funkcja płuc - spirometria, funkcja zewnątrzwydzielnicza trzustki - elastaza-1 w stolcu, wykładniki biochemiczne oceniające funkcję wątroby - AlAT, AspAT, GGTP, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*), a także stężenia PIVKA-II, a dla porównania skuteczności stosowanych dawek, dodatkowo odsetek niekarboksylowanej osteokalcyny (ang.: glutamic acid-containing osteocalcin - Glu-OC). W modelu długofalowym u pacjentów, u których stwierdzone zostały niedobory powyższej witaminy, wdrożona została suplementacja. Dawki zwiększano raz na 2 miesiące, rozpoczynając od 2,5 mg/tydz odpowiednio do 5 i 10 mg/tydz.

Patologiczne stężenia PIVKA-II ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: 21,4 \pm 48,8 ng/ml; mediana: 4,2) stwierdzono u 24 (63,2%) niemowląt z CF. Niedobór witaminy K wykazany u niemowląt niepoddawanych i poddawanych suplementacji był porównywalny i wyniósł odpowiednio 60,0% i 66,7%. W modelu przekrojowym drugim patologiczne stężenia PIVKA-II ($X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$: 8,3 \pm 15,4 ng/ml; mediana: 3,7) stwierdzono u 72 (42,8%) pacjentów. Niedobór witaminy udokumentowano odpowiednio u 72,7% i 38,4% chorych nieotrzymujących i otrzymujących powyższą witaminę. Tylko u 4 badanych patologicznym stężeniom PIVKA-II odpowiadały nieprawidłowe wartości parametrów PT% oraz INR. W modelu długofalowym nieprawidłowe stężenia PIVKA-II stwierdzono u 76,6% pacjentów.

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że niedobór witaminy K znacznie częściej występował w grupie pacjentów niewydolnych trzustkowo oraz posiadających dwie ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR*. Analiza regresji wielorakiej w modelu przekrojowym drugim wykazała, że współwystępowanie chorób wątroby (marskość, hepatopatia) i INR, a w modelu długofalowym aktywność GGTP, pozostają w związku

ze stężeniem PIVKA-II, odpowiednio $p=0,033081$ i $p=0,018766$, oraz $p=0,000931$. Nie wykazano aby parametry kliniczne - wiek, standaryzowana wartość masy i wysokości ciała, natężona pojemność objętość wydechowa jednosekundowa (ang.: Forced Expiratory Volume in 1 Second - FEV1), niewydolność trzustki, cukrzyca, kolonizacja *Pseudomonas aeruginosa*, stężenie albumin, aktywność enzymów wątrobowych (AlAT, AspAT), antybiotykoterapia pobierana na stałe wziewnie i doustnie oraz podawana dożylnie i doustnie w ostatnich trzech miesiącach, glikokortykosteroidoterapia, podaż enzymów trzustkowych, mutacja genu *CFTR*, stanowiły czynnik ryzyka niedoboru witaminy K u pacjentów z CF. Długofalowa obserwacja suplementacji witaminą K wykazała, że dawki 2,5 i 5,0 oraz 10,0 mg/tydz powodują normalizację zasobów ustrojowych powyższej witaminy odpowiednio u 24,1%, 47,5% oraz 68,5% pacjentów z CF.

Niedobór witaminy K u chorych na CF jest częsty, pojawia się już w okresie niemowlęcym oraz pomimo stosowanej suplementacji. Nie ma dobrych czynników prognostycznych niedoboru witaminy K u chorych na CF. Czynnikiem ryzyka występowania niedoboru witaminy K są choroby wątroby. Nieprawidłowe stężenie niekarboksylowanej protrombiny występuje częściej u pacjentów niewydolnych trzustkowo oraz posiadających dwie ciężkie mutacje w obu allelach genu *CFTR*. U chorych na CF konieczne jest wczesne wdrożenie suplementacji witaminy K. Nie można jednoznacznie określić wielkości dawki suplementacyjnej witaminy K, stąd wskazane jest stałe monitorowanie jej zasobów ustrojowych. Parametry koagulologiczne nie są dobrą metodą oceny niedoboru powyższej witaminy.

7. SUMMARY

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disease in the Caucasians population. It is caused by mutations in the *CFTR* gene (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene) located on chromosome 7. The product of this gene is the CFTR protein, acting as a chloride channel which is found in apical membrane of exocrine epithelial cells. *CFTR* mutations result in the lack of functional protein, what leads to an accumulation of viscous mucus in many organs in the respiratory and gastrointestinal systems. CF patients are at risk of vitamin K deficiency due to: fat malabsorption (exocrine pancreatic insufficiency), liver disease, the long-term use of antibiotics, and resection of the small bowel for complications such as meconium ileus. Despite of available evidence which suggests the risk of vitamin K deficiency in CF patients, supplementation dose is not clearly defined, and the effects of supplementation are very ambiguous.

The aim of this study was to assess the frequency of vitamin K deficiency in CF patients, exogenous and endogenous determinants of the vitamin K status, identification of supplementation dose and the comparison of coagulation parameters with concentration of undercarboxylated prothrombin in the assessment of vitamin K body resources.

The study was conducted in 2009-2012 in CF patients. This consisted of three experimental models: two cross-sectional models and one long-term. Thirty-eight CF infants diagnosed with newborns screening receiving and not receiving vitamin K and 168 patients with CF at the age of 1,2-41,4 years supplemented and non-supplemented vitamin K have been qualified to the first and second cross-sectional models, respectively. The long-term model included 47 patients at age of 1,0-23,5 years who have never received vitamin K. In the first cross-sectional model: nutritional status (standardized body weight and height), genotype, clinical expression of the disease (pancreatic exocrine function - elastase-1 in stool, *Pseudomonas aeruginosa* colonization), vitamin K supplementation and concentration of undercarboxylated prothrombin (prothrombin induced by vitamin K absence - PIVKA-II) were assessed. In the second cross-sectional model: nutritional status (standardized body weight and height, albumin concentration), genotype, clinical expression of the disease (lung function - spirometry, pancreatic exocrine function - elastase-1 in stool, liver

biochemical markers - AlAT, AspAT, GGTP, *Pseudomonas aeruginosa* colonization, existing diseases such as diabetes, liver cirrhosis), treatment (vitamin K and pancreatic enzymes supplementation, inhaled and oral course of antibiotics, intravenous and oral antibiotic therapy in the last three months, glucocorticoid therapy), concentration of PIVKA- II and coagulation parameters (PT%, INR) were assessed. In the long-term model: nutritional status (standardized body weight and height), genotype, clinical expression of the disease (lung function - spirometry, pancreatic exocrine function - elastase-1 in stool, liver biochemical markers - AlAT, AspAT, GGTP, *Pseudomonas aeruginosa* colonization), concentration of PIVKA-II and additionally percentage of undercarboxylated osteocalcin (glutamic acid-containing osteocalcin Glu-OC) for the comparison of vitamin K doses with its effectiveness were assessed. For patients with vitamin K deficiency in belongs to the long-term model, supplementation has been implemented. Doses were increased every two months, starting from 2,5 mg per week, up to 5,0 and 10,0 mg per week, respectively.

Pathological concentrations of PIVKA-II (mean±SD: 21,4±48,8 ng/ml, median 4.2) were found in 24 (63,2%) CF infants. Vitamin K deficiency in supplemented and not supplemented CF infants was similar and amounted 60,0% and 66,7% respectively. In the second cross-sectional model pathological concentrations of PIVKA-II (mean±SD: 8,3±15,4 ng/ml, median: 3,7) were found in 72 patients (42,8%). Vitamin K deficiency was documented in 72,7% and 38,4% CF patients not receiving and receiving vitamin K respectively. Pathological concentrations of PIVKA-II correlated with abnormal values of PT% and INR only in 4 cases. In the long-term model abnormal PIVKA-II concentrations were found in 76,6% of patients.

It was shown in present study that deficiency of vitamin K was much more frequent in CF patients with pancreatic insufficiency and those who have two severe mutations in both alleles of the *CFTR* gene. Multiple regression analysis based on second cross-sectional model showed that both liver disease (cirrhosis, hepatitis), INR and based on long-term model - GGTP activity are related to PIVKA-II concentration ($p=0,033081$ and $p=0,018766$ and $p= 0,000931$), respectively. There was no clinical evidence that clinical parameters such as: age, standardized body weight and height, forced expiratory volume in 1 second (FEV1), pancreatic insufficiency, diabetes mellitus, *Pseudomonas aeruginosa* colonization, albumin concentration, activity of liver enzymes (AlAT, AspAT), antibiotics taken: inhaled and oral permanently, or intravenous and oral in the last three months, glucocorticoid therapy, pancreatic enzymes supply and *CFTR* gene

mutations were risk factors for occurrence of vitamin K deficiency in CF patients. Long-term observation of vitamin K supplementation showed that the doses of 2,5 and 5,0 and 10,0 mg per week successfully normalized body resource in 24,1%, 47,5% and 68,5% CF patients, respectively.

Vitamin K deficiency in CF patients is very common, it might appear during infancy period, and still persist despite of supplementation. There are no good predicting factors of vitamin K deficiency in CF patients. Liver disease is a risk factor for vitamin K deficiency. Abnormal concentration of undercarboxylated prothrombin occurs more frequently in patients with pancreatic insufficiency and who have two severe mutations in both alleles of the *CFTR* gene. It is absolutely necessary to implement early vitamin K supplementation in CF patients. It is impossible to clearly determine the supplementation dose of vitamin K in CF patients hence it's indicated, constantly monitor its body resources. Coagulation parameters are not good method to assess vitamin K deficiency.

8. PIŚMIENICTWO

1. Allison A.C.: The possible role of vitamin K deficiency in the pathogenesis of Alzheimer's disease and in augmenting brain damage associated with cardiovascular disease. *Med Hypotheses* 2001, 57: 151-155.
2. Almquist H.J.: Purification of the antihemorrhagic vitamin. *J Biol Chem* 1936, 114: 241-245.
3. Almquist H.J.: Purification of the antihemorrhagic vitamin by distillation. *J Biol Chem* 1936, 115: 589-591.
4. Almquist H.J.: Chemical and physical studies on the antihemorrhagic vitamin. *J Biol Chem* 1936, 115: 517-523.
5. Almquist H.J.: Further studies on the antihemorrhagic vitamin. *J Biol Chem* 1937, 120: 635-640.
6. Almquist H.J., Klose A.A.: Determination of the anti-haemorrhagic vitamin. *Biochem J* 1939, 33: 1055-1060.
7. Almquist H.J., Mecchi E., Klose A.A.: Estimation of the anti-haemorrhagic vitamin. *Biochem J* 1938, 32: 1897-1903.
8. Amukele T.K., Baird G.S., Chandler W.L.: Reducing the use of coagulation test panel. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011, 22: 688-695.
9. Andrus W. DeW., Lord J., Moore R.A.: The effect of hepatectomy on plasma prothrombin and the utilization of vitamin K. *Surgery* 1939, 6: 899-900.
10. Aris R.M., Merkel P.A., Bachrach L.K., Borowitz D.S., Boyle M.P., Elkin S.L., Guise T.A., Hardin D.S., Haworth Ch.S., Holick M.F., Joseph P.M., O'Brien K., Tullis E., Watts N.B., White T.B.: Consensus statement: Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 1888-1896.
11. Beharry S., Ellis L., Corey M., Marcon M., Durie P.: How useful is pancreatic elastase1 as a marker of exocrine pancreatic disease? *J Pediatr* 2002, 141: 84-90.
12. Beker L.T., Ahrens R.A., Fink R.J., O'Brien M.E., Davidson K.W., Kenneth W., Sokoll L.J., Sadowski J.A.: Effect of vitamin K1 supplementation on vitamin K status in cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997, 24: 512-517.
13. Binkley N., Harke J., Krueger D., Engelke J., Vallarta-Ast N., Gemar D., Checovich M., Chappell R., Suttie J.: Vitamin K treatment reduces undercarboxylated osteocalcin but dose not alter bone turnover, density

- or geometry in healthy postmenopausal north American women. *J Bone Miner Res* 2009, 24: 983-991.
14. Binkley S.B., MacCorquodale D.W., Thayer S.A., Doisy E.A.: The isolation of vitamin K1. *J Biol Chem* 1939, 130: 219-234.
 15. Booth S.L.: Roles for Vitamin K beyond coagulation. *Annu Rev Nutr* 2009, 29: 89-110.
 16. Borgo G., Mastella G., Gasparini P., Zorzanello A., Doro R., Pignatti P.F.: Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis. *J Med Genet* 1990, 27: 665-669.
 17. Borowitz D., Baker R.D., Stallings V.: Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002, 35: 246-259.
 18. Beulens J.W., Van der A D.L., Grobbee D.E., Sluijs J., Spijkerman A.M., Van der Schouw Y.T.: Dietary phylloquinone and menaquinones intakes and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010, 33: 1699-1705.
 19. Carr S.B., McBratney J.: The role of vitamins in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 2000, 93: 14-19.
 20. Carrié I., Portoukalian J., Vicaretti R., Rochford J., Potvin S., Ferland G.: Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain. *J Nutr* 2004, 134: 167-172.
 21. Castellani C., Cuppens H., Macek M., Cassiman J.J., Kerem E., Durie P., Tullis E., Assael B.M., Bombieri C., Brown A., Casals T., Claustres M., Cutting G.R., Dequeker E., Dodge J., Doull I., Farrell P., Ferec C., Girodon E., Johannesson M., Kerem B., Knowles M., Munck A., Pignatti P.F., Radojkovic D., Rizzotti P., Schwarz M., Stuhmann M., Tzetis M., Zielenski J., Elborn J.S.: Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008, 7: 179-196.
 22. Cockayne S., Adamson J., Lanham-New S., Shearer M.J., Path M.R.C., Gilbody S., Torgerson D.J.: Vitamin K and the prevention fractures. *Arch Intern Med* 2006, 166: 1256-1261.
 23. Cohen-Cymbarknoh M., Shoseyov D., Kerem E.: Managing cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 183: 1463-1471.

24. Conly J., Stein K.: Reduction of vitamin K2 concentrations in human liver associated with the use of broad spectrum antimicrobials. *Clin Invest Med* 1994, 17: 531-539.
25. Conway S.P.: Vitamin K in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 2004, 97: 48-51.
26. Conway S.P., Wolfe S.P., Brownlee K.G., White H., Oldroyd B., Truscott J.G., Harvey J.M., Shearer M.J.: Vitamin K status among children with cystic fibrosis and its relationship to bone mineral density and bone turnover. *Pediatrics* 2005, 115: 1325-1331.
27. Cranenburg E.C.M, Schurgers L.J., Vermeer C.: Vitamin K: The coagulation vitamin that become omnipotent. *Thromb Haemost* 2007, 98: 120-125.
28. Cuthbert A.W.: New horizons in the treatment of cystic ffibrosis. *Br J Pharmacol* 2010, 163: 173-183.
29. Cystic Fibrosis Trust Nutrition Working Group. Nutritional management of cystic fibrosis. London: Cystic Fibrosis Trust 2002: 1-51.
30. Dam H.: The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem* 1935, 29: 1237-1285.
31. Dam H.: The discovery of vitamin K, its biological function and therapeutical application. Nobel lecture. *Les Prix Nobel, Stockholm* 1946: 205-220.
32. Dam H., Schönheyder F.: A deficiency disease in chicks resembling scurvy. *Biochem J* 1934, 28: 1355-1359.
33. Danziger J.: Vitamin K-dependent proteins, warfarin and vascular calcification. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008, 3: 1504-1510.
34. Debray D.: Cystic fibrosis associated with liver disease. *Arch Pediatr* 2012, 19: 23-26.
35. Dembińska-Kieć A., Drożdż R.: Białka osocza. Elektroforeza białek surowicy. W (red.: Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W.) *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*. Urban&Partner, Wrocław 2002: 199-201.
36. Dituri F., Buonocore G., Pietravalle A., Naddeo F., Cortesi M., Pasqualetti P., Tataranno M.L., Aqostino R.: PIVKA-II plasma levels as marker of subclinical vitamin K deficiency in term infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012, 25: 1660-1663.
37. Dobrzańska A., Czech-Kowalska J.: Profilaktyka krwawienia z niedoboru witaminy K u noworodków i niemowląt. *Med Praktyczna* 2008, 1: 34-37.

38. Doef H.P.J., Kokke F.T.M., Ent C.K., Houwen R.H.J.: Intestinal obstruction syndromem In cystic fibrosis: meconium ileus, distal intestinal obstruction syndrome, and constipation. *Curr Gastroenterol Rep* 2011, 13: 265-270.
39. Dougherty K.A., Schall J.I., Stallings V.A.: Suboptimal vitamin K status despite supplementation in children and young adults with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 2010, 92: 660-667.
40. Drury D., Grey V.L., Ferland G., Gundberg C., Larry C.L.: Efficacy of high dose phylloquinone in correcting vitamin K deficiency in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008, 7: 457-459.
41. Durie P.R.: Vitamin K and the management of patients with cystic fibrosis. *CMAJ* 1994, 151: 933-936.
42. Durie P.R.: Pathophysiology of pancreas in cystic fibrosis. *Neth J Med* 1992, 41: 97-100.
43. Fewtrell M.S., Benden C., Williams J.E., Chomtho S., Ginty F., Nigdikar S.V., Jaffe A.: Undercarboxylated osteocalcin and bone mass in 8-12 year old children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008, 7: 307-312.
44. Greer F.R.: Vitamin K the basics - What's new? *Early Hum Dev* 2010, 86: S43-S47.
45. Grey V., Atkinson S., Drury D., Casey L., Ferland G., Gundberg C., Lands L.C.: Prevalence of low bone mass and deficiencies of vitamin D and K in pediatric patients with cystic fibrosis from 3 canadian centers. *Pediatrics* 2008, 122: 1014-1020.
46. Gundberg C.M., Nieman S.D., 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.
47. Hamid B., Khan A.: Cerebral hemorrhage as the initial manifestation of cystic fibrosis. *J Child Neurol* 2007, 22: 114-115.
48. Hara K., Akiyama Y., Nakamura T., Murota S., Morita I.: The inhibitory effect of vitamin K2 (Menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain. *Bone* 1995, 16: 179-184.
49. Harrington D.J., Clarke P., Card D.J., Mitchell S.J., Shearer M.J.: Urinary extraction of vitamin K metabolites in term and preterm infants: relationship to vitamin K status and prophylaxis. *Pediatr Res* 2010, 68: 508-512.

50. Hecker T.M., Aris R.M.: Management of osteoporosis in adults with cystic fibrosis. *Drugs* 2004, 64: 133-147.
51. Holst W.F., Halbrook E.R.: A "scurvy-like" disease in chicks. *Science* 1933, 77: 354.
52. Hoorn J.H.L., Hendriks J.J.E, Vermeer C., Forget P.Ph.: Vitamin K supplementation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2003, 88: 974-975.
53. Høiby N.: Recent advances In the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections In cystic fibrosis. *BMC Medicine* 2011, 9: 32 doi:10.1186/1741-7015-9-32.
54. Ibarrola-Jurado N., Salas-Salvadó J., Martínez-González M.A., Bulló M.: Dietary phylloquinone intake and risk of type 2 diabetes in elderly subjects at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2012, 96: 1113-1118.
55. Ito A., Shirakawa H., Takumi N., Minegishi Y., Ohashi A., Howlader Z.H., Ohsaki Y., Sato T., Goto T., Komai M.: Menaquinone-4 enhances testosterone production in rats and testis-derived tumor cells. *Lipids Health Dis* 2011, 10: 1-9.
56. Jagannath V.A., Fedorowicz Z., Thaker V., Chang A.B., Al-Harthy N.: Vitamin K supplementation for cystic fibrosis (Protocol). *The Cochrane Collaboration* 2010, 4: 1-9.
57. Javier R.M., Jacquot J.: Bone disease in cystic fibrosis: What's new? *Joint Bone Spine* 2011, 78: 445-450.
58. Kameda T., Miyazawa K., Mori Y., Yuasa T., Shiokawa M., Nakamaru Y., Mano H., Hakeda Y., Kameda A., Kumegawa M.: Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 220: 515-519.
59. Kaneki M., Hosoi T., Ouchi Y., Ormio H.: Pleiotropic actions of vitamin K: protector of bone health and beyond? *Nutrition* 2006, 22: 845-852.
60. Karlas T., Neuschulz M., Oltmanns A., Güttler A., Petroff D., Wirtz H., Mainz J.G., Mössner J., Berg T., Tröltzsch M., Keim V., Wiegand J.: Non-Invasive Evaluation of Cystic Fibrosis Related Liver Disease in Adults with ARFI, Transient Elastography and Different Fibrosis Scores *PLoS ONE* 2012, 7: e42139. doi: 10.1371/ journal.pone. 0042139.
61. Kleinman R.E., Fracchia M.S.: Vitamin K and cystic fibrosis: give me a double, please. *Am J Clin Nutr* 2010, 92: 469-470.

62. Kohlmeier M., Salomon A., Saupe J., Shearer M.J.: Transport of vitamin K to bone in humans. *J Nutr* 1996, 126: 1192S-1196S.
63. Koivu-Tikkanen T.J., Schurgers L.J., Thijssen H.H.W., Vermeer C.: Intestinal, hepatic and circulating vitamin K levels at low and high intakes of vitamin K in rats. *British J Nutr* 2000, 83: 185-190.
64. Komp D.M., Selden R.F.: Coagulation abnormalities in cystic fibrosis. *Chest* 1970, 58: 501-503.
65. Koshihara Y., Hoshi K.: Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* 1997, 12: 431-437.
66. Koshihara Y., Hoshi K., Ishibashi H., Shiraki M.: Vitamin K2 promotes $1\alpha 25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 - induced mineralization in human periosteal osteoblast. *Calcif Tissue Int* 1996, 59: 466-473.
67. Kuwabara A., Fujii M., Kawai N., Tozawa K., Kido S., Tanaka K.: Bone is more susceptible to vitamin K deficiency than liver in the institutionalized elderly. *Asia Pac J Clin Nutr* 2011, 20: 50-55.
68. Lee W., Chung H-J., Kim S., Jang S., Park Ch-J., Chi H-S., Chun S., Min W-K.: PIVKA-II is a candidate marker for monitoring the effects of the oral anticoagulant warfarin. *Clin Biochem* 2010, 43: 1177-1179.
69. Lippi G., Franchini M.: Vitamin K in neonates: facts and myths. *Blood Transfus* 2011, 9: 4-9.
70. Lisowska A., Walkowiak J.: Zespół jelitowego przerostu bakteryjnego a zapalenie jelit w mukowiscydozie. *Pediatr Pol* 2007, 82: 567-570.
71. Mager D.R., McGee P.L., Furuya K.N., Roberts E.A.: Prevalence of vitamin K deficiency in children with mild to moderate chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006, 42: 71-76.
72. Martin R., Saller K.: *Lehrbuch der Anthropologie in systematischer Darstellung. Band I.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1957: 488-595.
73. Maqbool A., Stallings V.A.: Update on fat-soluble vitamins in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008, 14: 574-581.
74. McCann J.C., Ames B.N.: Vitamin K, an example of triage theory: is a micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? *Am J Clin Nutr* 2009, 90: 889-907.

75. McKay K.O.: Cystic fibrosis: Benefits and clinical outcome. *J Inherit Metab Dis* 2007, 30: 544-555.
76. McKee R.W., Binkley S.B., MacCorquodale D.W., Thayer S.A., Doisy, E. A.: The isolation of vitamins K1 and K2 (Communications to the editor). *J Am Chem Soc* 1939, 61: 1295-1295.
77. McPhail G.L.: Coagulation disorders as a presentation of cystic fibrosis. *J Emerg Med* 2010, 38: 320-322.
78. Mischler E.H., Chesney P.J., Chesney R.W., Mazess R.B.: Demineralization in cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1979, 133: 632-635.
79. Mogayzel P.J., Fiume P.A.: Update in cystic fibrosis 2010. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 183: 1620-1624.
80. Montalembert M., Lenoir G., Saint-Raymond A., Rey J., Lefrère J-J.: Increased PIVKA-II concentrations in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 1992, 45: 180-181.
81. Moran A., Becker D., Casella S.J., Gottlieb P.A., Kirman M.S., Marshall B.C., Slovis B.: Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis - related diabetes. *Diabetes Care* 2010, 33: 2677-2683.
82. Mosler K., von Kries R., Vermeer C., Saupe J., Schmitz T., Schuster A.: Assessment of vitamin K deficiency in CF - how much sophistication is useful? *J Cyst Fibros* 2003, 2: 91-96.
83. Mughal Z., Sood M., Ward K.A., Adams J.E.: Pathogenesis of bone disease in cystic fibrosis: the role of bone size and sarcopenia. *J R Soc Med* 2006, 99: 2-5.
84. Nakagawa K.: New developments in research on vitamin K biosynthesis. *J Health Sci* 2010, 56: 623-631.
85. National Institutes of Health Consensus Statement, Genetic testing for Cystic Fibrosis 1997, 15: 1-45.
<http://consensus.nih.gov/1997/1997GeneticTestCysticFibrosis106PDF.pdf>
86. Nicolaidou P., Stavrinnadis I., Loukou I., Papadopoulou A., Georgouli H., Douros K., Priftis K.N., Gourgiotis D., Matsinos Y.G., Doudounakis S.: The effect of vitamin K supplementation on biochemical markers of bone formation in children and adolescents with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 2006, 165: 540-545.
87. Nimptsch K., Rohrmann S., Kaaks R., Linseisen J.: Diet Dietary vitamin K intake in relation to cancer incidence and mortality: results from the Heidelberg

- cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *Am J Clin Nutr* 2010, 91: 1348-1358.
88. Nousia-Arvanitakis S.: Cystic fibrosis and pancreas. *J Clin Gastroenterol.* 1999, 29: 138-142.
89. Ngo B., Van Pelt K., Labarque V., Van De Casseye W., Penders J.: Late vitamin K deficiency bleeding leading to a diagnosis of cystic fibrosis: a case report. *Acta Clin Belg* 2011, 66: 142-143.
90. O'Brien D.P., Shearer M.J., Waldron R.P., Horgan P.G., Given H.F.: The extent of vitamin K deficiency in patients with cholestatic jaundice: a preliminary communication. *J R Soc Med* 1994, 87: 320-322.
91. Ohsaki Y., Shirakawa H., Miura A., Giriwono P.E., Sato S., Ohashi A., Iribe M., Goto T., Komai M.: Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide – induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α/β phosphorylation. *J Nutr Biochem* 2010, 21: 1120-1126.
92. Okano T., Shimomura Y., Yamane M., Suhara Y., Kamao M., Sugiura M.: Conversion of phylloquinone (vitamin K1) into menaquinone-4 (vitamin K2) in mice. Two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem* 2008, 283: 11270-11279.
93. Ooi Ch.Y., Durie P.R.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene mutations in pancreatitis. *J Cyst Fibros* 2012, 11: 355-362.
94. Paccou J., Zeboulon N., Combescure C., Gossec L., Cortet B.: The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* 2010, 86: 1-7.
95. Palczewska I., Niedźwiecka Z.: Wskaźniki rozwoju somatycznego dzieci i młodzieży warszawskiej. *Med Wieku Rozw* 2001, 5: 17-118.
96. Panizo S., Cardus A., Encinas M., Parisi E., Valcheva P., Lòpez-Ongil S., Coll B., Fernandez E., Valdivelso J.M.: RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP 4- dependent pathway. *Circ Res* 2009, 104: 1041-1048.
97. Partyka Ł., Dembińska-Kieć A.: Hemostaza. Monitorowanie terapii antykoagulantami doustnymi. W (red.: Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W.) *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Urban&Partner, Wrocław 2002: 521-525.

98. Popova K., Foley J., Nasra S.Z.: Bleeding diathesis due to vitamin K deficiency in an infant with cystic fibrosis. *Respir Med* 2010, 3: 165-166.
99. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K.: Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18: 1400-1407.
100. Presse N., Shatenstein B., Kergoat M.J., Ferland G.: Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an stage of Alzheimer's disease. *J Am Diet Assoc* 2008, 108: 2095-2099.
101. Quick A.J.: The coagulation defect in sweet clover disease and in the hemorrhagic chick disease of dietary origin. *Am J Physiol* 1937, 118: 260-271.
102. Rashid M., Durie P., Andrew M., Kalnins D., Shin J., Corey M., Tullis E., Pencharz P.B.: Prevalence of vitamin K deficiency in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1999, 70: 378-382.
103. Rejnmark L., Vestergaard P., Charles P., Hermann A.P., 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.
104. Sands D., Nowakowska A., Piotrowski R., Zybert K., Milanowski A.: Postępowanie diagnostyczne w mukowiscydozie. *Przegl Pediatr* 2003, 33: 198-203.
105. Schubiger G., Gruter J., Shearer M.J.: Plasma vitamin K1 and PIVKA-II after oral administration of mixed-micellar or cremophor EL-solubilized preparations of vitamin K1 to normal breast-fed newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997, 24: 280-284.
106. Schumann G., Bonora R., Ceriotti F., Férard G., Ferrero C.A., Franck P.F., Gella F.J., Hoelzel W., Jørgensen P.J., Kanno T., Kessner A., Klauke R., Kristiansen N., Lessinger J.M., Linsinger T.P., Misaki H., Panteghini M., Pauwels J., Schiele F., Schimmel H.G., Weidemann G., Siekmann L.: IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40: 718-724.
107. Schumann G., Bonora R., Ceriotti F., Férard G., Ferrero C.A., Franck P.F., Gella F.J., Hoelzel W., Jørgensen P.J., Kanno T., Kessner A., Klauke R.,

- Kristiansen N., Lessinger J.M., Linsinger T.P., Misaki H., Panteghini M., Pauwels J., Schiele F., Schimmel H.G., Weidemann G., Siekmann L.: IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40: 725-733.
- 108.Schumann G., Bonora R., Ceriotti F., Férard G., Ferrero C.A., Franck P.F., Gella F.J., Hoelzel W., Jørgensen P.J., Kanno T., Kessner A., Klauke R., Kristiansen N., Lessinger J.M., Linsinger T.P., Misaki H., Panteghini M., Pauwels J., Schiele F., Schimmel H.G., Weidemann G., Siekmann L.: IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40: 734-738.
- 109.Schurgers L.J., Vermeer C.: Determination of phylloquinone and menaquinones in food. *Haemostasis* 2000, 30: 298-307.
- 110.Schurgers L.J., Vermeer C.: Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1570: 27-32.
- 111.Sebro R., Levy H., Schneck K., Dimmock D., Raby B.A., Cannon C.L., Broeckel U., Risch N.J.: Cystic fibrosis mutations for p.F508del compound heterozygotes predict sweat chloride levels and pancreatic sufficiency. *Clin Genet* 2011 doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01804.x
- 112.Sermet-Gaudelus I., Castanet M., Retsch-Bogart G., Aris R.M.: Update on Cystic Fibrosis - related bone disease: A special focus on children. *Pediatr Respir Review* 2009, 10: 134-142.
- 113.Shearer M.J.: Vitamin K in parenteral nutrition. *Gastroenterology* 2009, 137: 105-118.
- 114.Shearer M.J., Newman P.: Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost* 2008, 100: 530-547.
- 115.Shiraki M., Shiraki Y., Aoki Ch., Miura M.: Vitamin K2 (Menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000, 15: 515-521.

116. Sinaasappel M., Stern M., Littlewood J., Wolfe S., Steinkamp G., Heijerman H.G.M., Robberecht E., Döring G.: Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J Cyst Fibros* 2002, 1: 51-75.
117. Sobczyńska-Tomaszewska A., Ołtarzewski M., Czerska K., Wertheim-Tysarowska K., Sands D., Walkowiak J., Bal J., Mazurczak T.: Newborn screening for cystic fibrosis: Polish 4 years' experience with CFTR sequencing strategy. *Eur J Hum Genet* 2012, doi:10.1038/ejhg.2012.180.
118. Sogabe N., Maruyama R., Baba O., Hosoi T., Goseki-Sone M.: Effects of long-term vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone* 2011, 48: 1036-1042.
119. Sokol R.J., Reardon M.C., Accurso F.J., Stall Ch., Narkiewicz M., Abman S.H., Hammond K.B.: Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of newborns. *Am J Clin Nutr* 1989, 50: 1064-1071.
120. Stafford D.W.: The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 2005, 3: 1873-1878.
121. Strople J., Lovell G., Heubi J.: Prevalence of subclinical vitamin K deficiency in cholestatic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, 49: 78-84.
122. Suttie J.W.: The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 1995, 15: 399-417.
123. Tabb M.M., Sun A., Zhou Ch., Grün F., Errandi J., Romero K., Pham H., Inoue S., Mallick S., Lin M., Forman B.M., Blumberg B.: Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003, 278: 43919-43927.
124. Thane C.W., Bates C.J., Shearer M.J., Unadkat N., Harrington D.J., Paul A.A., Prentice A., Bolton-Smith C.: Plasma phylloquinone (vitamin K1) concentration and its relationship to intake in a national sample of British elderly people. *Br J Nutr* 2002, 87: 615-622.
125. Thijssen H.H.W., Drittij-Reijnders M.J.: Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. *Br J Nutr* 1996, 75: 121-127.
126. Torstenson O.L., Humphrey G.B., Edson J.R., Warwick W.J.: Cystic fibrosis presenting with severe hemorrhage due to vitamin K malabsorption: A report of three cases. *Pediatrics* 1970, 45: 857-861.

127. Urquhart D.S., Fitzpatrick M., Cope J., Jaffe A.: Vitamin K prescribing patterns and bone health surveillance in UK children with cystic fibrosis. *J Hum Nutr Diet* 2007, 20: 605-610.
128. Verghese T., Beverley D.: Vitamin K deficient bleeding in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2003, 88: 553-555.
129. Walkowiak J., Herzig K.H., Strzykała K., Sci N., Przysławski J., Krawczyński M.: Fecal elastase-1 is superior to fecal chymotrypsin in the assessment of pancreatic involvement in cystic fibrosis. *Pediatrics* 2002, 110: 1-4.
130. Walkowiak J., Lisowska A., Błaszczyński M., Przysławski J., Walczak M.: Polyunsaturated fatty acids in cystic fibrosis are related to nutrition and clinical expression of the disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007, 45: 488-489.
131. Walkowiak J., Pogorzelski A., Sands D., Skorupa W., Milanowski A., Nowakowska A., Orlik T., Korzeniewska-Eksterowicz A., Lisowska A., Cofta Sz., Minarowska A., Piotrowski R., Popiel A., Rachel M., Sobczyńska-Tomaszewska A., Staszak-Kowalska R., Teisseyre M., Trawiska-Bartnicka M., Walicka-Serzysko K., Witt M., Woś H.: Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy 2009 Poznań-Warszawa-Rzeszów. *Stand Med* 2009, 6: 352-378.
132. Wallin R., Schurgers L., Wajih N.: Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification. *Thromb Res* 2008, 122: 411-417.
133. Walters T.R., Koch F.: Hemorrhagic diathesis and cystic fibrosis in infancy. *Am J Dis Child* 1972, 124: 641-642.
134. Watanabe K., Naraki T., Iwasaki Y.: Method of determination of PIVKA. *Biotechnol Adv* 1997, 15: 259-259.
135. Weber P.: Vitamin K and bone health. *Nutrition* 2001, 17: 880-887.
136. Weichselbaum T.E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Amer J Clin Path* 1946, 16: 40-48.
137. Wilson D.C., Rashid M., Durie P.R., Tsanq A., Kalnins D., Andrew M., Corey M., Shin J., Tullis E., Pencharz P.B.: Treatment of vitamin K deficiency in cystic fibrosis: Effectiveness of a daily fat-soluble vitamin combination. *J Pediatr* 2001, 138: 851-855.

138. Wu F.Y., Liao W.C., Chang H.M.: Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sci* 1993, 52: 1797-1804.
139. Yoshida M., Booth S.L., Meigs J.B., Saltzman E., Jacques P.F.: Phylloquinone intake, insulin sensitivity, and glycemic status in men and women. *Am J Clin Nutr* 2008, 88: 210-210.
140. Zetterström R.: H.C.P. Dam (1895-1976) and E.A. Doisy (1893-1986): The discovery of antihaemorrhagic vitamin and its impact on neonatal health. *Acta Paediatrica* 2006, 95: 642-644.

Strongly internetowe:

1. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminK/kcycle.html>