

วิตามินเค และความเสี่ยงต่อ การเกิดโรคกระดูกพรุน

Vitamin K and The Risk of Osteoporosis

สนับสนุนการพิมพ์โดย



Human Health Care Company

บริษัท เอไซ (ประเทศไทย) มาร์เก็ตติ้ง จำกัด

รศ.นพ.ศุภศิลาป์ สุนทรภา
ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิตามินเคและความเสี่ยงต่อการเกิด
โรคกระดูกพรุน
Vitamin K and The Risk of Osteoporosis

พิมพ์ครั้งที่ 1

ตุลาคม พ.ศ. 2547

จำนวน 3,000 เล่ม

วิตามินเคและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

บรรณาธิการและผู้เรียบเรียง

ศุภศิลา สุนทรภา

ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของหอสมุดแห่งชาติ

วิตามินเคและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน/ศุภศิลา สุนทรภา

บรรณาธิการ...กรุงเทพฯ: บริษัท เมดิอินโฟ จี.ดี. จำกัด 2547

37 หน้า

- กระดูกพรุน, โรค
- วิตามิน I. ศุภศิลา สุนทรภา. II. ชื่อเรื่อง

(WE250 ศ733ว2547)

ผู้พิมพ์

ศุภศิลา สุนทรภา

วท.บ. (ม.มหิดล) พ.บ. (ร.พ.รามธิบดี)

ป.ชั้นสูงทางศัลยศาสตร์ทั่วไป (ม.มหิดล)

วุฒิปริญญาตรีความรู้ความชำนาญทางศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์

(ม.ขอนแก่น)

รองศาสตราจารย์

ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

สงวนลิขสิทธิ์

ISBN 974-659-878-3

เรียงพิมพ์จัดหน้า : บริษัท เมดิอินโฟ จี.ดี. จำกัด

พิมพ์ที่ : บริษัท เมดิอินโฟ จี.ดี. จำกัด

โทรศัพท์ 0-2416-8487 โทรสาร 0-2416-2990

สารบัญ -----

●	บทนำ	1
●	ลักษณะทางเคมีของวิตามินเค	4
●	แหล่งของวิตามินเค	4
●	การดูดซึมวิตามินเค	5
●	Vitamin K epoxide	7
●	การขับวิตามินเค	9
●	Vitamin K-dependent Gla proteins	9
●	Vitamin K-dependent proteins in calcified tissues	10
●	ระดับของ undercarboxylated osteocalcin ในกระแสเลือดของสตรีสูงอายุ และความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกหัก	12
●	ผลของ MK-4 ในสัตว์ทดลอง	19
●	การศึกษาทางคลินิกของ MK-4	30
●	สรุป	37

วิตามินเคและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

Vitamin K and The Risk of Osteoporosis

unnā¹⁻³

ในช่วงต้นทศวรรษที่ 1930 Henrich Dam ซึ่งเป็น nutritional biochemist ชาว Danish พยายามที่จะแสดงให้เห็นว่า cholesterol เป็นอาหารที่มีความจำเป็น โดยเขาเลี้ยงลูกไก่ด้วยอาหารที่เขาปรุงเป็นพิเศษซึ่งเป็นอาหารที่มีไขมันต่ำและขาด cholesterol และพบว่าลูกไก่มีลักษณะของเลือดออกผิดปกติ แต่เมื่อเติม cholesterol ลงไปในอาหารกลับ พบว่าไม่สามารถรักษาเลือดออกผิดปกติได้ และ Dam (1934) พบว่าการที่เอา cholesterol ออกจากอาหารนั้น เขาได้เอาสารอาหารอื่นๆที่มีความสำคัญออกไปด้วย

ภาวะเลือดออกผิดปกติสามารถรักษาได้โดยการเติม alfalfa meal (อาหารที่เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีฝักในยุโรปใช้เลี้ยงสัตว์) กับอาหารหรือโดยการเพิ่มไขมันที่สกัดได้จากพืชใบเขียว (lipid extract of green plants) เข้าไปในอาหาร ในช่วงปีค.ศ. 1939 มีการศึกษาอย่างมากโดย Dam จาก Denmark โดย Almquist จาก Berkeley และ Doisy จากมหาวิทยาลัย St. Louis พบว่ามีวิตามินชนิดหนึ่งอยู่ใน alfalfa ซึ่งปัจจุบันนี้เรียกว่า vitamin K₁ หรือ phylloquinone ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคือ 2-methyl-3-phytyl-1,4 naphthoquinone แต่วิตามินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียเป็น series of multiprenyl menaquinones ซึ่งมี unsaturated side chain เรียก vitamin K₂ จากการค้นพบนี้ทำให้ทั้ง Dam และ Doisy ได้รับรางวัล Noble Prize ทางการแพทย์ ร่วมกันในปีค.ศ. 1941 ภาวะเลือดออกผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการขาดวิตามินเค นั้น ในเบื้องต้นเชื่อกันว่าเกิดจากความเข้มข้นของ plasma clotting factor prothrombin (factor II) ต่ำ แต่ในภายหลังสามารถพิสูจน์ได้ว่าเกิดจากการสร้าง clotting factors VII, IX, and X ลดลง เนื่องจากขาดวิตามินเค

Vitamin K antagonists (4-hydroxycoumarins) ถูกค้นพบในช่วงทศวรรษที่ 1940 ซึ่งในสมัยก่อนนำไปใช้เป็นยาฆ่าหนูและยังเป็นยาที่นำมาใช้กับผู้ป่วยจนถึงปัจจุบัน การใช้ warfarin และ 4-hydroxycoumarins ชนิดอื่น ๆ มาควบคุมการสร้าง vitamin K-dependent proteins เป็นการทดลองที่สำคัญ เพื่อศึกษาถึงการทำงานของวิตามินเค การขาดความเข้าใจในขบวนการสร้างโปรตีนทำให้การศึกษาทดลองเกี่ยวกับขบวนการสร้าง vitamin K-dependent proteins ในระดับเซลล์และโมเลกุลเป็นไปได้ยาก จนมาเมื่อต้นทศวรรษที่ 1970 ได้มีการแสดงให้เห็นว่าวิตามินนี้เป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งของ microsomal enzyme ที่เกี่ยวข้องในขบวนการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของ vitamin K-dependent proteins จาก inactive form ไปเป็น active form โดยเอ็นไซม์ตัวนี้จะเร่งการเปลี่ยนแปลงของ specific glutamyl residues ไปเป็น γ -carboxyglutamyl (Gla) residues ในโปรตีนที่เป็น vitamin K-dependent และภายในช่วงต้นทศวรรษที่ 1990 เอ็นไซม์ที่ใช้วิตามินเคเป็น cofactor ได้รับการพิสูจน์ และสามารถแยกออกมาให้เห็น

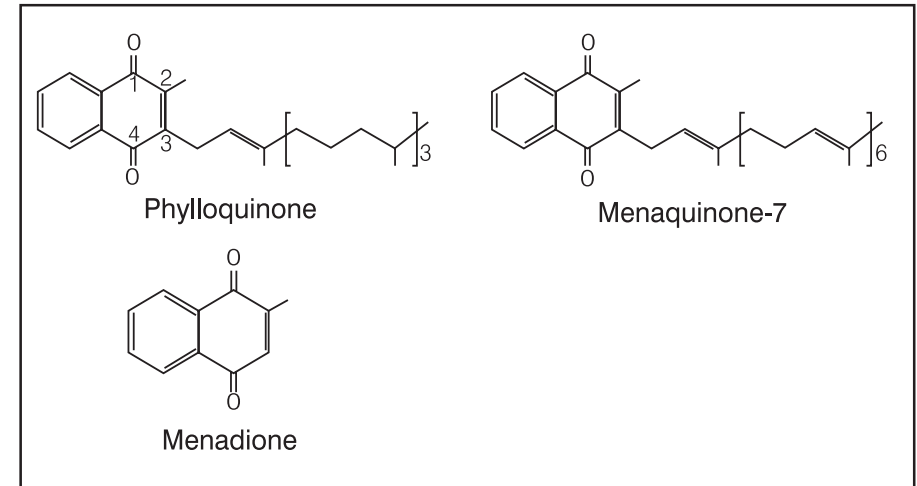
วิตามินเคเป็นชื่อเรียกทั่วไปของ 2-methyl-1,4-naphthoquinone และอนุพันธ์ทั้งหลายของสารตัวนี้ วิตามินตัวนี้ที่พบในธรรมชาติจะเป็นชนิด unsaturated isoprenoid side chain ที่ตำแหน่ง C3 ของ naphthoquinone nucleus ชนิดและจำนวนของ isoprene units (ไม่ใช่อะตอมของคาร์บอน) จะเป็นคุณลักษณะพื้นฐานของ side chain และถูกเรียกเป็น vitamer

Phylloquinone group ประกอบด้วย phytyl side chains และถูก alkylated ต่อกลายเป็นหลายๆ saturated isoprenoid units ตัว vitamer ของกลุ่มนี้จะพบ double bond เพียงอันเดียวใน side chains นั่นคือ proximal isoprene unit วิตามินเคชนิดนี้สังเคราะห์จากพืชใบเขียว จึงถูกเรียกเป็น **phylloquinone** และย่อเป็น **K**

Menaquinone group ประกอบด้วย vitamers ที่มี side chains ประกอบด้วยจำนวนของ isoprenoid units ที่หลากหลาย แต่ในแต่ละ isoprene unit จะมี double bond. Vitamers เหล่านี้สร้างขึ้นจาก bacteria และย่อเป็น MK ซึ่งโดยทั่วไปจะหมายถึง vitamin K₂

K-n และ MK-n ใช้กับ phyloquinones และ menaquinones แต่ละชนิด โดยค่า n คือจำนวนของ isoprenoid units (รูปที่ 1)

Menadione เป็นสารประกอบของ 2-methyl-1,4-naphthoquinone โดยไม่มี side chain สารตัวนี้จะไม่มีในธรรมชาติ แต่สามารถออกฤทธิ์ได้โดยถูก alkylate ในร่างกายของสัตว์กลายเป็น metabolites ที่เรียกว่า MK-4



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของวิตามินเคชนิดต่างๆ โดย phylloquinone ประกอบด้วย phytyl side chains และถูก alkylated กลายเป็นหลายๆ saturated isoprenoid units โดยจะมี double bond เพียงอันเดียวที่ส่วนต้นของ isoprene unit ส่วน menaquinone จะมี side chain ที่ประกอบด้วยจำนวนของ isoprenoid units แตกต่างกันไป โดยที่แต่ละหน่วยของ isoprene unit จะมี double bond ในขณะที่ menadione จะไม่มี side chain (ดัดแปลงจาก Suttie JW. Vitamin K. Stipanuk MH, editor. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2000)

ลักษณะทางเคมีของวิตามินเค

Phylloquinone (K₁) ที่อุดมภูมิท้องจะมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง แต่วิตามินเคชนิดอื่นจะเป็นผลึกสีเหลือง วิตามินเคทุกองค์ประกอบจะไม่ละลายในน้ำ ละลายได้เล็กน้อยใน ethanol แต่จะละลายได้อย่างดีใน ether, chloroform, fats and oils. วิตามินเคไวต่อแสงและต่าง แต่ค่อนข้างจะทนต่อความร้อนและ oxidizing environment

พืชและ bacteria สามารถสังเคราะห์วิตามินเคได้ และสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อก่อให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนและการสร้างพลังงานแต่สัตว์ทั่วไปไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินเคได้ แต่ต้องใช้วิตามินเคเพื่อทำให้เลือดแข็งตัว และสร้างกระดูก

Menaquinone ที่สร้างขึ้นจาก bacteria ที่ลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ และสัตว์ (ชนิดที่ชอบกินมูลสัตว์เป็นอาหาร) ทำให้ทั้งมนุษย์และสัตว์ไม่ค่อยขาดวิตามินเค แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีภาวะขาดวิตามินเคในสัตว์จำพวกสัตว์ปีกและสัตว์ที่มีกระเพาะเดี่ยวที่ได้รับยาปฏิชีวนะทำให้ bacteria ที่ลำไส้ใหญ่ลดลง จึงสังเคราะห์วิตามินเคน้อยลง ในเด็กทารกโดยเฉพาะเด็กที่คลอดก่อนกำหนด มีความเสี่ยงต่อการตกเลือดได้ง่าย เนื่องจากวิตามินเคไม่ผ่านรก

แหล่งของวิตามินเค

ผักใบเขียวจะสังเคราะห์ phylloquinones โดย phylloquinone จะเป็นองค์ประกอบของ chloroplasts ขณะที่ bacteria และ normal flora ของลำไส้ใหญ่และ spore-forming Actinomyces spp. บางชนิดสามารถสังเคราะห์ menaquinones โดยส่วนใหญ่จะเป็น menaquinone 6-10 และบางครั้งสามารถพบได้สูงถึง 13 isoprenoid groups

ในผักใบเขียวจะพบวิตามินเคในปริมาณสูง ในขณะที่ในผลไม้และธัญพืชจะพบน้อย ส่วนในเนื้อและน้ำมันจะพบวิตามินเคในปริมาณปานกลาง

ในลำไส้ของมนุษย์จะมีปริมาณของ menaquinone จำนวนมากที่สังเคราะห์จาก bacteria การดูดซึมวิตามินเคที่บริเวณนี้จะเป็นแบบ passive diffusion

การดูดซึมวิตามินเค

วิตามินเคจะถูกดูดซึมจากลำไส้เข้าทางท่อน้ำเหลืองโดยการ form mixed micelles ทำให้สามารถละลายในน้ำได้ ดังนั้นวิตามินเคจะดูดซึมได้ดีจะต้องมี pancreatic and biliary function ที่ดีด้วย โดยทั่วไปอาหารที่รับประทานมักจะมีองค์ประกอบของ menaquinone และ phylloquinone ซึ่งสามารถถูกดูดซึมในลำไส้ได้ประมาณร้อยละ 40-70 แต่การดูดซึมอาจเกิดจากหลายๆขบวนการดังต่อไปนี้

1. การดูดซึม phylloquinone แบบ active transport

การศึกษานี้ทำโดยการปล้นลำไส้ของหนูให้ mucosa อยู่ด้านนอกและ serosa อยู่ด้านใน พบว่าการดูดซึมของ phylloquinone ทางลำไส้เป็นการดูดซึมที่ต้องอาศัยพลังงาน ซึ่งจะเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนต้นของลำไส้เล็ก และการดูดซึมนั้นจะไม่ถูกขัดขวางโดย menaquinone or menadione แต่จะถูกยับยั้งหากมีการเติม short- และ medium-chain fatty acids เข้าไปใน micellar medium.

2. การดูดซึมโดยวิธี passive diffusion

Menaquinone และ menadione จะต่างจาก phylloquinone โดยจะถูกดูดซึมเฉพาะแบบ passive diffusion อัตราการดูดซึมจะถูกกระทบจากปริมาณของไขมันและน้ำดีใน micellar การดูดซึมโดยวิธีนี้จะพบในส่วนปลายของลำไส้เล็กและในลำไส้ใหญ่ ดังนั้น ในสัตว์ที่ได้รับวิตามินเคจาก bacteria ในลำไส้ส่วนล่าง จะมีการดูดซึมโดยวิธีนี้

เมื่อวิตามินเคถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว จะถูกส่งไปยังตับในลักษณะของ chylomicra และจะเข้าไปอยู่ในตับอย่างรวดเร็ว แต่จะมีช่วงครึ่งชีวิตที่ค่อนข้างสั้นในตับ (ประมาณ 17 ชั่วโมง) ก่อนที่ very low-density lipoproteins (VLDLs) และ low density lipoproteins (LDLs) จะพาวิตามินเคไปตามน้ำเหลือง วิตามินเคแต่ละตัวจะไม่มีตัวพาเฉพาะ ระดับของ phylloquinone ในน้ำเหลืองจะมีความสัมพันธ์กับ triglycerides และ α -tocopherol ในคนที่มีสุขภาพแข็งแรงระดับของวิตามินเคจะอยู่ในช่วง 0.1-0.7 ng/ml

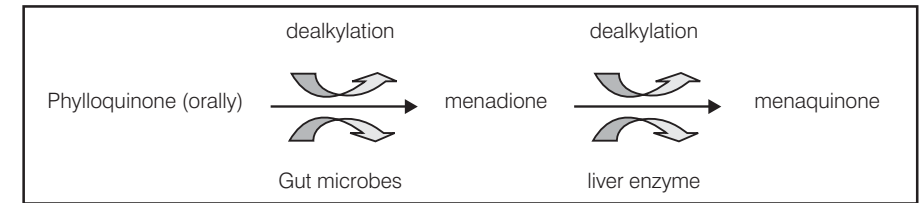
ภายหลังจากได้รับ phyloquinone และ menaquinone มันจะถูกนำเข้าไปเก็บในตับอย่างรวดเร็ว ในทางตรงกันข้าม menadione จะถูกเก็บในตับเป็นจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น แต่ส่วนใหญ่จะกระจายไปตามอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย วิตามินเคจะถูกนำออกจากตับ และถูกขับออกอย่างรวดเร็ว เราพบระดับของวิตามินเคค่อนข้างต่ำในหลายๆอวัยวะ แต่บางอวัยวะจะพบระดับวิตามินเคค่อนข้างสูง เช่นที่ต่อมหมวกไต (adrenal gland) ปอด (lung), ไขกระดูก (bone marrow) ไต (kidney) และต่อมน้ำเหลือง (lymph node) เป็นต้น วิตามินเคจะผ่านรกได้ไม่ดี จึงมักไม่สามารถพบวิตามินเคใน cord blood จากแม่สู่ลูก

การส่งผ่านวิตามินเคในกระแสเลือดกระทำผ่าน lipoproteins โดยจะเป็น triglyceride-rich lipoproteins มากกว่า low-density lipoproteins ซึ่งสิ่งนี้สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์อย่างมากระหว่าง plasma phyloquinone และ plasma triglycerides และ พบว่าความเข้มข้นของ fasting plasma phyloquinone เกี่ยวข้องกับ genetic polymorphism ของ apolipoprotein E (apoE) โดยจะพบสูงที่สุดในกลุ่มที่เป็น apoE2 รองลงมาคือ apoE3 และ apoE4 น้อยที่สุด ซึ่งสิ่งนี้จะสอดคล้องกับความรู้ที่ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง apoE phenotype และอัตราของ hepatic clearance of chylomicron remnants จากกระแสเลือด ซึ่งจะพบว่าจะช้าที่สุดในกรณีของ apoE2 และเร็วขึ้นในกรณีของ apoE3 และเร็วที่สุดในกรณีของ apoE4 และการที่ phyloquinone อยู่ในกระแสเลือดได้นานจะเป็นสาเหตุสำคัญสำหรับการส่งถ่าย phyloquinone ไปยังกระดูก

เนื้อเยื่อของสัตว์ส่วนใหญ่ที่กินพืชเป็นอาหารมักประกอบด้วย phyloquinones เช่นเดียวกับ menaquinones ที่มี isoprenoid side chain 6-13 units ถึงแม้ว่าจะให้อาหารที่มีแต่ MK-4 แต่เราพบว่าในเนื้อเยื่อต่างๆของสัตว์เหล่านี้ยังคงเป็นส่วนผสมของวิตามินเคดังกล่าวข้างต้น สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าวิตามินเคส่วนใหญ่ในเนื้อเยื่อจะเป็นวิตามินเคที่สร้างขึ้นจาก bacteria ในลำไส้ ส่วนในสัตว์ที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วย phyloquinone กลับพบ MK-4 กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อ แสดงว่า bacteria ในลำไส้สามารถเปลี่ยน phytyl side chain ไปเป็น geranylgeranyl side chain โดยจากข้อมูลล่าสุดสามารถพิสูจน์การเปลี่ยนแปลงนี้ได้ในเนื้อเยื่อของหนู ดังนั้นการ

ที่เราสามารถพบ MK-4 ในเนื้อเยื่อนอกตับของสัตว์ที่เลี้ยงด้วย phyloquinone เป็นเพราะเกิด local interconversion.

การที่ phyloquinone เปลี่ยนเป็น menaquinone ในเนื้อเยื่อได้เนื่องจากเกิด metabolic dealkylation ของ phyloquinone side chain (เปลี่ยน phyloquinone เป็น menadione) และตามด้วย dealkylation ต่อไปเป็น menaquinones การเปลี่ยนแปลงนี้จะไม่เกิดขึ้นหากไม่ได้รับ phyloquinone โดยการรับประทาน ดังนั้นจึงเชื่อกันว่า dealkylation นี้เกิดจาก metabolism โดยแบคทีเรียในลำไส้ ส่วนการเกิด dealkylation ของ menadione จะเกิดขึ้นภายในร่างกาย โดยขั้นตอนนี้สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ chick liver homogenates และใช้ geranyl pyrophosphate, farnesyl pyrophosphate หรือ geranylgeranyl pyrophosphate เป็นตัวให้ alkyl group ในปฏิกิริยาที่ถูกยับยั้งโดย O₂ หรือ warfarin ผลลัพธ์ที่ได้จากการเกิด alkylation ของ menadione คือ MK-4

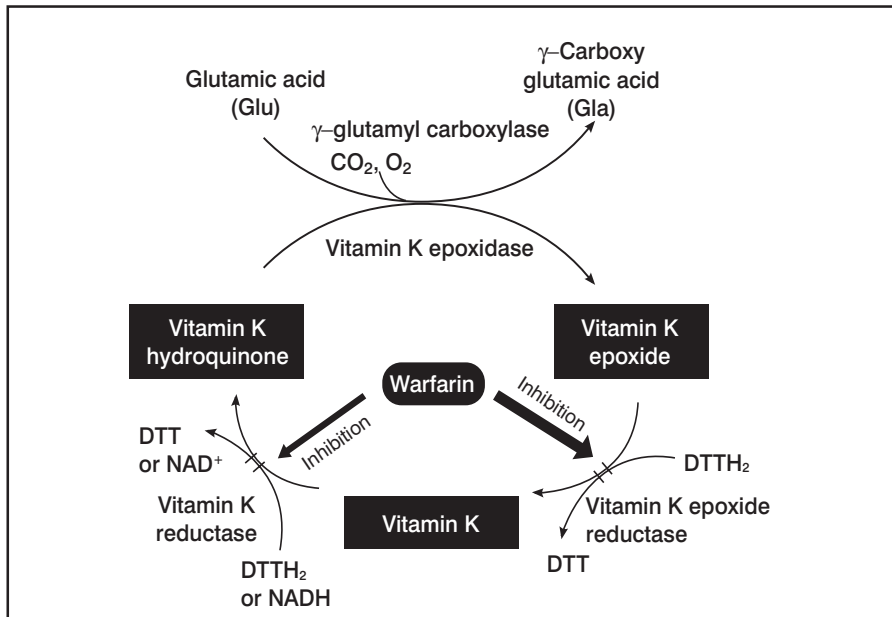


รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงจาก phyloquinone ไปเป็น menaquinone (ดัดแปลงจาก Gerald F. Combs Jr. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 2nd edition. San Diego, California: Academic press, 1998)

Vitamin K epoxide

Napthoquinone ring ของวิตามินเคสามารถถูกเปลี่ยนโดยระบบเอ็นไซม์ของ hepatic microsomal กลายเป็น 2,3-epoxide เรียกว่าเป็น vitamin K epoxide หรือ vitamin K oxide โดย vitamin K oxide นี้จะพบได้ประมาณร้อยละ 10 ของวิตามินเคทั้งหมดในตับของหนูปกติ และจะเพิ่มขึ้นเป็นสารหลักในตับของหนูที่ได้รับการรักษาด้วย warfarin หรือ coumarin anticoagulants ตัวอื่นๆ นอกจากนี้ยังมี

metabolite อื่นๆ เช่น 3-hydroxy- 2,3-dihydrophyloquinone หรือ hydroxyvitamin K ทั้ง vitamin K epoxide และ hydroxyvitamin K จะเป็น degraded metabolite ก่อนจะถูกขับออกจากร่างกาย ในกลุ่มที่รักษาด้วย warfarin ส่วนใหญ่จะขับ phyloquinone metabolites ทางปัสสาวะ ในขณะที่ส่วนที่ถูกขับออกทางอุจจาระจะลดลง วิตามินเคจะถูก metabolized ไปเป็น vitamin K epoxide โดยผ่าน vitamin K hydroquinone และตัว vitamin K epoxide จะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นวิตามินเคอีกครั้งในตับตัวที่เป็น cofactor ของ γ -glutamyl carboxylase ที่แท้จริงคือ vitamin K hydroquinone (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 วงจรของวิตามินเคในตับ (DTT= dithiothreitol, NADH =reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide) (คัดลอกจาก Miyake N, Hoshi K, Sano Y, Kikuchi K, Tadano K, Koshihara Y. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 promote vitamin K_2 metabolism in human osteoblasts. Osteoporos Int 2001)

การขับวิตามินเค

Menadione จะถูก metabolized และถูกขับออกอย่างรวดเร็ว เหลือไว้เพียงเล็กน้อย เพื่อเปลี่ยนไปเป็น MK-4 วิตามินเคส่วนใหญ่ถูกขับออกทางปัสสาวะ (ประมาณร้อยละ 70 ของ physiological dose อาจถูกขับออกภายใน 24 ชม.) ในรูปของ phosphate, sulfate, หรือ glucuronide ของ menadiol นอกจากนี้ยังถูกขับออกทางน้ำดีในรูป glucuronide conjugate

การสลาย phyloquinone และ menaquinone จะเกิดช้ากว่าของ menadione มาก การสลาย menaquinone น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่ side-chain โดย phyloquinone จะถูก oxidized เพื่อตัด side chain ให้สั้นลง เป็น carboxylic acids ที่มีคาร์บอน 5 หรือ 7 ตัว เส้นทางการขับ metabolites เหล่านี้คือทางอุจจาระ ซึ่งจะประกอบไปด้วย glucuronic acid conjugates ซึ่งขับออกทางน้ำดี

Vitamin K-dependent Gla proteins

วิตามินเคออกฤทธิ์โดยการเกิด posttranslational carboxylation และเปลี่ยน specific glutamate residues ไปเป็น γ -carboxyglutamate (Gla) residues พบว่ามีโปรตีนเป็นโพลีที่จัดเป็น vitamin K dependent ในจำนวนนี้จะมี clotting factor 4 ตัวที่ถือเป็น vitamin K dependent ได้แก่ prothrombin (factor II) and factors VII, IX, X นอกจากนี้ยังมี vitamin K-dependent coagulation-inhibiting proteins อีก 4 ตัวที่พบในน้ำเหลือง ได้แก่ proteins C, S, Z และ M ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับกับ phospholipids ที่มีประจุลบด้วยแขนของ Ca^{2+} ที่จับอยู่กับ Gla residues นอกจากนี้ยังสามารถพบ vitamin K-dependent Gla proteins ใน calcified matrices ซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุม calcification โปรตีนเหล่านี้ได้แก่ osteocalcin, matrix Gla protein, and protein S ในกระดูก รวมทั้งในฟัน นอกจากนี้ยังมี atherocalcin ใน atherosclerotic tissue รวมทั้ง Gla protein ในนิวไต

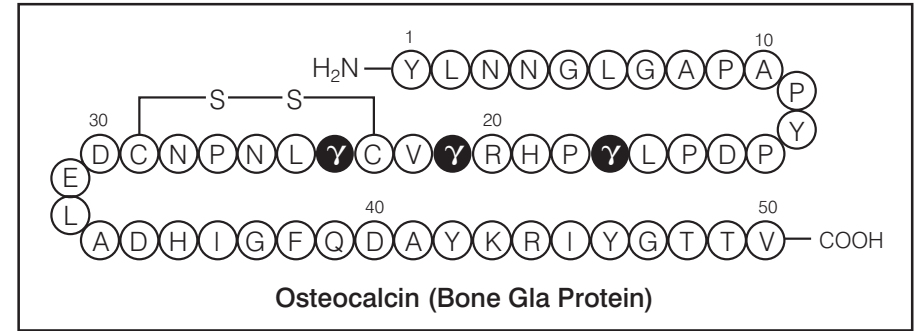
Vitamin K-dependent proteins ทั้ง 8 ตัวจะมีกรดอะมิโนในช่วง 40 ตัวแรกเหมือนกัน ทั้งหมดต้องอาศัยแคลเซียมเพื่อให้มีฤทธิ์ โปรตีน C ยับยั้งการแข็งตัวของเลือดและส่งเสริมการเกิด fibrinolysis และถูกกระตุ้นโดย โปรตีน S

ส่วน clotting factor ดังเดิม 4 ตัวคือ (factor II, VII, IX and X) เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ค่อนข้างซับซ้อน ซึ่งมีหน้าที่ช่วยป้องกันไม่ให้เลือดออกและทำให้เกิด thrombus โดยโปรตีนเหล่านี้จะไหลเวียนในเลือดในรูปของ zymogens (inactive precursors of the functional forms) แต่ละตัวเป็น serine protease ที่มีส่วนร่วมในขบวนการการกระตุ้นให้เกิดการสลายโปรตีนอย่างเป็นระบบ ซึ่งในที่สุดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ fibrinogen ที่เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ไปเป็น fibrin ที่เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ที่จะเชื่อมกับเกร็ดเลือดกลายเป็นการแข็งตัวของเลือด

Vitamin K-dependent proteins in calcified tissues

เซลล์สร้างกระดูกจะสร้าง vitamin K-dependent Gla proteins 3 ชนิดคือ osteocalcin, matrix Gla protein และ protein S โดยที่ osteocalcin ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ osteoblast และ odontoblast เท่านั้น ในขณะที่ matrix Gla protein ส่วนใหญ่สร้างขึ้นจาก soft tissue ส่วน protein S สร้างขึ้นจาก hepatocytes, megakaryocytes และ endothelial cells

Osteocalcin บางครั้งเรียกเป็น bone gamma carboxyglutamic acid (bone Gla protein) เป็นโปรตีนขนาดเล็ก มี amino acid 47-50 ตัวและไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด โปรตีนนี้โดยปกติจะประกอบด้วย 3 Gla residues ที่อยู่ใกล้ๆกัน จับอยู่ที่ด้านหนึ่งของโปรตีน ที่ตำแหน่งที่ 17, 21 และ 24 โดยจะอยู่ในรูปของ glutamic acid และจะถูกเปลี่ยนเป็น gamma carboxyglutamic acid หรือ Gla residue โดยต้องอาศัยความช่วยเหลือจากวิตามินเค การจับของ osteocalcin กับ hydroxyapatite matrix เป็นการจับที่แน่นมาก และขึ้นอยู่กับ degree of carboxylation ในมนุษย์ glutamate residue ที่ตำแหน่ง 17 มักจะไม่ถูก carboxylated ด้วยเหตุนี้กระดูกของมนุษย์จึงมักจะมีระดับของ osteocalcin ต่ำกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ (เพียงประมาณ 10-20% เมื่อเทียบกับสัตว์ใน species อื่นๆ) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ osteocalcin (bone Gla protein) ที่มี Glu-residues ที่ตำแหน่ง 17, 21 และ 24 ของ polypeptide chain (ดัดแปลงจาก Suttie JW. Vitamin K. Stipanuk MH, editor. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2000)

Osteocalcin ในช่วงที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ยังเป็น osteocalcin ที่ไม่มีฤทธิ์หรือเรียกเป็น undercarboxylated osteocalcin (ucOC) ภายหลังจาก ucOC ถูก carboxylated ให้เป็น mature osteocalcin หรือ carboxylated osteocalcin (Gla protein) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยวิตามินเค ดังนั้นหากระดับของ ucOC เพิ่มขึ้น จะสะท้อนถึงระดับของวิตามินเคที่ต่ำหรือการขาดวิตามินเค ซึ่งมีผลทำให้การสร้างกระดูกเสียไป โดยสามารถดูได้จากค่ามวลกระดูกที่ต่ำและทำให้เกิดกระดูกหักง่าย เราสามารถให้ระดับของ ucOC ที่สูงนี้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อกระดูกสะโพกหักในสตรีสูงอายุได้

Matrix Gla protein เป็นโปรตีนตัวเล็กมีน้ำหนักโมเลกุล 9.6 kDa เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในน้ำ และสามารถจับได้อย่างเหนียวแน่น กับ bone matrix ที่ไม่มีแร่ธาตุ รวมทั้งกระดูกอ่อนที่ยังไม่มีการสะสมแคลเซียม พบมากในกระดูกและในกระดูกอ่อน แต่อาจพบ mRNA ของสารนี้ในเนื้อเยื่อที่ไม่มีการสะสมแร่ธาตุ (noncalcified tissue) อื่นๆได้

Protein S เชื่อว่านอกจากจะเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดแล้ว ยังมีบทบาทในกระดูกด้วย แต่ยังไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจน แต่มีรายงานว่าในเด็กที่ขาดโปรตีนนี้ พบมี severe undermineralization of bone

Atherocalcin เป็น Gla protein ตัวหนึ่ง ที่พบใน calcified atherosclerotic tissue เชื่อว่า arterial vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase ซึ่งพบที่ผนังของเส้นเลือดแดง แต่ไม่พบในเส้นเลือดดำ เป็นตัวการสำคัญของการเกิด atherosclerosis นอกจากนี้ renal Gla protein ซึ่งถูกยับยั้งโดย PTH และวิตามินดีมีบทบาทในการขับ Ca^{2+} ในไต นอกจากนี้ยังสามารถพบ Gla proteins ตัวอื่นๆใน sperm, urine, hepatic mitochondria, shark skeletal cartilage and snake venom ดังนั้นจึงเป็นที่ชัดเจนว่าวิตามินเคมีหน้าที่กว้างขวางใน physiological systems นอกจากนี้เกี่ยวข้องกับอาการแข็งตัวของเลือด

ระดับของ ucOC ในกระแสเลือดของสตรีสูงอายุ และความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกหัก

Louisa Plantalech และคณะ (1991)⁴ ต้องการพิสูจน์ว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ osteocalcin จะเกี่ยวข้องกับการเกิด carboxylation ที่ไม่สมบูรณ์หรือไม่ โดยทำการวัดระดับ total and undercarboxylated osteocalcin ในกระแสเลือดในสตรี 72 ราย ที่มีอายุต่างกัน: 22 รายเป็นสตรีก่อนหมดประจำเดือน (อายุเฉลี่ย 31±7 ปี) 20 รายเป็นสตรีภายหลังหมดประจำเดือน (อายุเฉลี่ย 54±3 ปี) และอีก 30 รายเป็นสตรีสูงอายุ (อายุเฉลี่ย 85±8 ปี)

ผลที่ได้คือค่า total serum osteocalcin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสตรีภายหลังหมดประจำเดือนใหม่ๆและสตรีสูงอายุ และพบว่าระดับของ undercarboxylated osteocalcin เพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน early postmenopausal women (0.95±0.4 versus 0.65±0.5 ng/ml in premenopausal women) และพบมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากในสตรีสูงอายุ (1.59±1.1 ng/ml, p<0.001) และพบว่าระดับของ undercarboxylated osteocalcin

มีความสัมพันธ์กับอายุ (r = 0.47, p<0.001) และเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา warfarin เป็นเวลานานๆ พบว่าผู้สูงอายุมีระดับของ ucOC ใกล้เคียงกับผู้ป่วยที่ได้รับยา warfarin (1.94±1.1 ng/ml)

จากผลที่ได้กล่าวข้างต้น จะพบว่าในสตรีหลังหมดประจำเดือนใหม่ๆระดับของ carboxylated serum osteocalcin เพิ่มขึ้นอย่างมากแต่ไม่พบลักษณะเช่นนี้ในผู้สูงอายุ

ได้มีการวัดระดับของ vitamin K₁ และระดับของ menaquinones 6, 7 และ 8 ในสตรีวัยสาวและในผู้สูงอายุบางคน ไม่พบความแตกต่างของระดับวิตามินเหล่านี้ ซึ่งอาจหมายความว่าวิตามินเหล่านี้ไม่ใช่เป็น vitamin K หลักที่ขาดในผู้สูงอายุ ในทางกลับกัน ข้อมูลที่ได้นี้อาจเกี่ยวกับการไม่สามารถนำวิตามินเคมาใช้ใหม่ได้หรือเกี่ยวกับความผิดปกติของเซลล์สร้างกระดูกในผู้สูงอายุที่ไม่สามารถทำให้เกิด carboxylation ต่อ osteocalcin

โดยสรุป จากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า osteocalcin ในกระแสเลือดของผู้สูงอายุส่วนใหญ่จะอยู่ในรูป undercarboxylated โดยยังไม่ทราบกลไก ทำให้ปริมาณของ osteocalcin ในกระดูกลดลง ควรจะมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อจะดูว่าความผิดปกตินี้ จะมีความสำคัญต่อการสูญเสียกระดูกที่เกิดขึ้นในผู้สูงอายุหรือไม่

จากที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าระดับของ ucOC ในกระแสเลือดของสตรีสูงอายุ จะสูงกว่าสตรีก่อนหมดประจำเดือน⁴ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้วิตามินเค ในขนาด 1 mg/day สามารถลดระดับของ ucOC ในกระแสเลือดลงได้ภายในสองสัปดาห์ แสดงว่าการที่ระดับ ucOC สูงขึ้นเกิดจากขาดวิตามินเค นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินดีสามารถกระตุ้นให้เกิด γ -carboxylation ต่อ osteocalcin และต่อ Gla-containing proteins ตัวอื่นๆ ที่อยู่ในไตได้ด้วยเหตุนี้

Szulc P. และคณะ (1993)⁵ ต้องการทราบว่า 1) การเพิ่มขึ้นของระดับ ucOC ในผู้สูงอายุเกี่ยวข้องกับอาการขาดวิตามินดีหรือไม่ 2) การเพิ่มขึ้นของระดับ ucOC จะเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อโรคกระดูกพรุนและทำให้กระดูกสะโพกหักเพิ่มขึ้นหรือไม่

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาขนาดใหญ่ของ Chapuy และคณะ⁶ ที่ศึกษาเกี่ยวกับการให้แคลเซียมและวิตามินดีว่าสามารถป้องกันกระดูกสะโพกหักได้หรือไม่ ผู้สูงอายุที่อยู่ในการศึกษาเป็นผู้สูงอายุที่อาศัยอยู่แต่ในบ้าน มีอายุอยู่ในช่วง 71-101 ปี ผู้สูงอายุถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกให้วิตามินดี 2 ขนาด 800 IU ต่อวันร่วมกับแคลเซียมขนาด 1.2 กรัมในรูปของเกลือแคลเซียมฟอสเฟต ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งได้รับยาหลวง ผู้สูงอายุในการศึกษาคั้งนี้จำนวน 195 รายทำการวัดระดับของ baseline osteocalcin, PTH, 25(OH)D, alkaline phosphatase, calcium, phosphorus และ creatinine และติดตามผลเป็นเวลา 18 เดือน โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือติดตามอุบัติการณ์ของกระดูกสะโพกหักรวมทั้งกระดูกส่วนอื่นๆที่ไม่ใช่กระดูกสันหลังหักร่วมด้วย ติดตามตรวจวัดระดับของ osteocalcin และ ucOC ในช่วง 6 และ 12 เดือนใน 139 จาก 195 ราย (71 รายอยู่ในกลุ่มได้รับวิตามินดีและแคลเซียมและ 68 รายได้รับยาหลวง) ทำการเปรียบเทียบค่า ucOC ของผู้สูงอายุกลุ่มนี้กับค่า upper limit ของ ucOC ปกติ (ได้มาจากการตรวจวัดค่า ucOC, total OC ในสตรีก่อนหมดประจำเดือนช่วงอายุ 21-44 ปีจำนวน 21 ราย โดยค่า upper limit ได้มาจากค่าเฉลี่ย + 2SD พบว่าค่า upper limit ของ total OC=13.9 ng/ml ของ carboxylated OC = 12.5 ng/ml และค่า ucOC = 1.65 ng/ml หรือ 16.7% of total OC)

ผลการศึกษาพบว่าผู้สูงอายุมีค่า serum ucOC สูงกว่าสตรีวัยก่อนหมดประจำเดือน (1.22±1.00 vs. 0.65±0.5 ng/ml, p<0.01) และหากใช้ค่า upper limit ของค่าปกติคือ 1.65 ng/ml พบว่ามีผู้สูงอายุ 45 ราย (23%) ที่มีระดับของ serum ucOC สูงกว่าค่า upper limit ของค่า ucOC ปกติ และหากเทียบระหว่างผู้สูงอายุที่มีค่า serum ucOC สูงกว่าค่า upper limit (จำนวน 45 ราย) กับผู้สูงอายุที่เหลือ (จำนวน 150 ราย) พบว่าผู้สูงอายุที่มีค่า ucOC สูงจะมีค่า serum PTH และ alkaline phosphatase สูงกว่า แต่กลับพบว่าค่า 25(OH)D ต่ำกว่ากลุ่มที่มีค่า ucOC ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า ucOC มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่า PTH (r = 0.29, p<0.001), อายุ (r = 0.23, p<0.002) และค่า creatinine (r = 0.19, p<0.01) ในขณะที่มีความสัมพันธ์ในเชิงผกผันกับระดับของ 25(OH)D (r= -0.32, p<0.001) และยังคงมีความสัมพันธ์เช่นเดิมถึงแม้จะได้ควบคุมผลกระทบจากอายุ ระดับของ PTH และค่า creatinine โดยวิธี partial correlation (r= -0.24, p<0.002)

ในระหว่างติดตามผล 18 เดือน พบว่ามีอยู่ 15 รายที่มีกระดูกสะโพกหักและพบว่าค่า baseline ucOC ในผู้สูงอายุเหล่านี้มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีกระดูกสะโพกหักอย่างมีนัยสำคัญ (1.62 ± 1.16, 0.94 ± 0.93; p<0.01) ในขณะที่ระดับของแคลเซียมฟอสเฟต alkaline phosphatase, creatinine, PTH, 25(OH)D, total and carboxylated OC ไม่มีความแตกต่างกันในทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าผู้สูงอายุที่มีระดับของ ucOC สูง (>1.65 ng/ml) มีความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกสะโพกหักสูงกว่าผู้สูงอายุที่มีระดับ ucOC ต่ำกว่า (<1.65 ng/ml) โดยมีค่า relative risk = 5.9, 99.9%CI 1.5-22.7, p<0.001 (ภายหลังการควบคุมผลกระทบระหว่างการรักษาด้วยวิตามินดีและแคลเซียมกับยาหลวงแล้ว) และหากใช้ค่า % ucOC (ucOC / total OC)*100 ที่ควบคุมผลกระทบจากการรักษาเช่นกัน พบว่ากลุ่มที่มีระดับ % ucOC สูงยังคงมีความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกสะโพกหักสูงกว่ากลุ่มที่มี % ucOC ต่ำเช่นกัน (RR = 3.1; 95%CI 1.8-5.9, p<0.05)

ภายหลังการรักษาด้วยแคลเซียมและวิตามินดีเป็นเวลา 1 ปี พบว่าระดับของ ucOC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และลดลงอย่างมากในกลุ่มที่มีระดับสูงในช่วงแรก (>1.65 ng/ml) โดยลดลงจาก 2.22±0.35 ไปเป็น 1.41±0.29 ng/ml (p<0.005) แต่ไม่เปลี่ยนแปลงในกลุ่มที่มีค่า ucOC ต่ำ (<1.65 ng/ml) ในทางตรงกันข้ามกับกลุ่มยาหลวงที่ระดับของ ucOC กลับเพิ่มขึ้น (p<0.01)

สรุปได้ว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ ucOC ในผู้สูงอายุไม่เพียงแต่จะสะท้อนถึงการขาดวิตามินเคเท่านั้นแต่ยังแสดงให้เห็นถึงการขาดวิตามินดีด้วย นอกจากนี้ระดับ ucOC ที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกสะโพกหัก แสดงว่าระดับของ serum ucOC สะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงบางอย่างใน bone matrix ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเปราะของกระดูก

ในปีค.ศ. 1997 VERGNAUD P และคณะ⁷ ทำการศึกษาในผู้สูงอายุที่มีสุขภาพแข็งแรงจำนวน 7,598 ราย ทั้งหมดมีอายุมากกว่า 75 ปีและอาศัยอยู่เป็นอิสระตามบ้าน (การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา EPIDOS prospective study) พบว่าสตรีสูงอายุจำนวน 104 รายเกิดกระดูกสะโพกหักในช่วงติดตามผล 22 เดือน ทำการจับคู่กับผู้สูงอายุที่

ไม่มีกระดูกหักที่อยู่ในช่วงอายุเดียวกันจำนวน 255 รายเป็นกลุ่มควบคุม จากคุณลักษณะพื้นฐานระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มกระดูกหักพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของน้ำหนักตัว ระดับแคลเซียม ระดับ creatinine, 25(OH)D รวมทั้ง total alkaline phosphatase ในกระแสเลือด แต่พบว่ากลุ่มที่มีกระดูกสะโพกหักมีค่า BMD ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ albumin ในกลุ่มที่มีกระดูกสะโพกหักยังต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน นำเลือดที่ได้ในช่วงแรกก่อนเกิดกระดูกหักไปทำการวัด total OC and ucOC ตรวจวัดโดยวิธี HAP binding assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ และโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นการตรวจแบบใหม่ วิธี direct ELISA นี้ใช้ human recombinant noncarboxylated OC เป็นมาตรฐาน และ 2 monoclonal antibodies, หนึ่งในสองตัวนี้จะจำเพาะกับ 14-30 Glu synthetic peptide เราพบว่าค่า intra-and interassay variations น้อยกว่าร้อยละ 11 และการตรวจด้วยวิธีนี้จะมี cross-reactivity กับ purified human bone osteocalcin เพียงร้อยละ 5 ระดับของ ucOC ที่วัดโดย ELISA นี้มีความสัมพันธ์อย่างดีกว่า HAP binding assay ที่สุ่มศึกษาในกลุ่มประชากรจำนวน 359 ราย ($r=0.82$, $p<0.0001$) ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ total OC ในกลุ่มกระดูกสะโพกหักเท่ากับ 28.0 ± 12.5 ng/mL ขณะที่กลุ่มควบคุมเท่ากับ 27.5 ± 11.2 ng/mL ($p=0.70$) และระดับ ucOC ที่วัดโดยวิธี ELISA ในผู้สูงอายุที่มีกระดูกสะโพกหักเท่ากับ 6.7 ± 4.8 ng/mL ในขณะที่ผู้สูงอายุที่เป็นกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของ ucOC เท่ากับ 5.8 ± 4.1 ng/mL ($p=0.09$) และหากวัดโดยวิธี HAP binding assay (hydroxyapatite binding assay) ค่า ucOC เฉลี่ยในผู้สูงอายุที่มีกระดูกสะโพกหักจะเป็น 5.1 ± 3.7 ng/mL และในกลุ่มควบคุมจะเป็น 4.4 ± 3.3 ng/mL ($p=0.13$) ระดับของ ucOC วัดโดยทั้ง HAP binding assay หรือ ELISA พอๆกันในทั้งสองกลุ่ม แต่หากใช้สัดส่วนระหว่าง ucOC (HAP method)/total OC (%ucOC) พบว่ามีค่าเฉลี่ยสูงกว่าในกลุ่มที่มีกระดูกหักอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าในกลุ่มกระดูกหักมีค่า % ucOC (คือค่าของ ucOC ที่วัดโดยวิธี HAP binding assay ที่แสดงเป็นร้อยละของ total OC) เท่ากับ 17 ± 7.5 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 15.1 ± 6.8 ($p=0.04$)

เมื่อใช้ค่า ucOC ในระดับ highest quartile ของกลุ่มควบคุมจำนวน 255 ราย ค่า odds ratio พบว่า ucOC ที่วัดโดยวิธี ELISA มีค่า odds ratio ต่อการเกิดกระดูกสะโพกหัก = 2.0 (95%CI, 1.2-3.2; $p<0.008$) ในขณะที่ odds ratio ของ ucOC ที่วัดโดยวิธี HAP binding assay = 1.6 (95%CI, 0.9-2.7; $p=0.07$) และ odds ratio ของ %ucOC HAP = 2.0 (95%CI, 1.3-3.3; $p<0.004$) และพบว่าระดับของ ucOC ที่วัดโดยทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์เชิงผกผันกับค่าความหนาแน่นของกระดูกต้นขา ($p<0.0002$; $r=-0.19$) เพื่อจะดูว่าความสัมพันธ์ระหว่าง ucOC และความเสถียรต่อกระดูกสะโพกหักเกิดขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่าง ucOC และมวลกระดูกหรือไม่ ทำโดยปรับให้ค่ามวลกระดูกคงที่ ภายหลังจากปรับค่า femoral neck BMD แล้วพบว่า ucOC (ELISA method) และ % ucOC (HAP method) levels ในกลุ่ม highest quartile ยังคงมีความเสี่ยงต่อกระดูกสะโพกหักที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า ORs = 1.8 (95%CI, 1.1-3.0) and 1.8 (95%CI, 1.1-2.9) ตามลำดับ แสดงว่าค่า ucOC (ELISA method) และ %ucOC (HAP method) สามารถพยากรณ์ความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกสะโพกหักได้โดยไม่ขึ้นกับค่ามวลกระดูกของคอ กระดูกต้นขา ในขณะที่ total OC ไม่สามารถทำเช่นนั้นได้ และหากใช้ร่วมกันระหว่างการวัดระดับ ucOC และการวัดมวลกระดูก โดยใช้ lowest quartile ของค่า BMD ร่วมกับระดับ highest quartile ของ ucOC (ELISA method) หรือ %ucOC (HAP method) พบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการประเมินความเสี่ยงต่อกระดูกสะโพกหักในสตรีสูงอายุได้ โดยมีค่า odds ratio = 5.5 (95%CI, 2.7-11.2) และ 4.4 (95%CI, 2.3-8.4) ตามลำดับ

โดยสรุป คณะผู้ศึกษาได้พัฒนาการตรวจวัด ucOC ใหม่โดยใช้ specific ELISA for serum ucOC วิธีนี้จะมี cross-reactivity กับ carboxylated OC ต่ำและเพิ่ม sensitivity and specificity มากขึ้นเมื่อเทียบกับ HAP assay นอกจากนี้พบว่า ucOC (ELISA method) หรือ %ucOC (HAP method) สามารถบอกถึงความเสี่ยงต่อกระดูกสะโพกหักได้โดยไม่ขึ้นกับค่ามวลกระดูก ในขณะที่ total OC ไม่สามารถทำเช่นนั้นได้ และหากใช้ค่าใช้ lowest quartile ของค่า BMD ร่วมกับ ระดับ highest quartile ของ ucOC (ELISA method) หรือ % ucOC (HAP method) จะสามารถประเมินความเสี่ยงต่อกระดูกสะโพกหักได้ดียิ่งขึ้น

G.Liu และคณะ (1998)⁸ ต้องการทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ serum total osteocalcin และ undercarboxylated osteocalcin ตรวจวัดโดยวิธี two-site immunoassay กับค่าความหนาแน่นของกระดูก (BMD) ที่คอกระดูกต้นขา (femoral neck) และ ultrasonic transmitted velocity (UTV) ที่ตำแหน่ง os calcis ในสตรีจำนวน 257 รายที่มีอายุตั้งแต่ 60-99 ปี โดย 22 รายมีกระดูกสะโพกหัก

พบว่าค่าการเพิ่มขึ้นของค่า serum total osteocalcin และค่า undercarboxylated osteocalcin มีความสัมพันธ์กับอายุอย่างมีนัยสำคัญ ($r=0.19, p=0.003$ และ $r=0.20, p=0.002$ ตามลำดับ) ค่า serum total osteocalcin มีความสัมพันธ์ในเชิงผกผันกับค่า BMD ของคอกระดูกต้นขา ($r = -0.23, p=0.0001$) และค่า os calcis UTV ($r = -0.29, p=0.0001$) และจาก partial correlations พบว่าความสัมพันธ์ทั้งสองนี้ไม่ถูกรบกวนด้วยอายุ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า undercarboxylated osteocalcin มีความสัมพันธ์เชิงผกผันกับค่า os calcis UTV ($r = -0.21, p=0.001$) แต่มีความสัมพันธ์กับค่า BMD ของคอกระดูกต้นขาเล็กน้อยโดยไม่มีนัยสำคัญ ($r = -0.13, p=0.052$) ภายหลังจากการปรับค่าของอายุ พบมีเพียงความสัมพันธ์ระหว่าง undercarboxylated osteocalcin กับค่า os calcis UTV ที่ยังมีนัยสำคัญ ($r = -0.16, p = 0.017$)

จากกลุ่มผู้สูงอายุที่มีกระดูกสะโพกหักจำนวน 22 รายนี้ ทำการศึกษาแบบ case control โดยใช้กลุ่มกระดูกหักที่มีอยู่ 22 ราย เทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอายุและน้ำหนักอยู่ในเกณฑ์ใกล้เคียงกันจำนวน 43 ราย (1:2) ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองกลุ่มมีอายุ ส่วนสูง และน้ำหนักไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ค่า BMD ที่ข้อสะโพกและค่า UTV ที่สันเท้าในกลุ่มที่มีกระดูกสะโพกหักต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่กลับพบว่าทั้ง serum total osteocalcin and undercarboxylated osteocalcin ในกลุ่มที่มีกระดูกหักถึงแม้จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปได้ว่าในสตรีที่มีอายุมากกว่า 60 ปี การเพิ่มขึ้นของค่า serum total osteocalcin จะสะท้อนถึงการปรับแต่งกระดูกที่สูงขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของค่า undercarboxylated osteocalcin สะท้อนถึงระดับของวิตามินเคที่ลดลงเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น และจากค่าความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกว่าระหว่างค่า

undercarboxylated osteocalcin กับค่า UTV เมื่อเทียบกับค่า BMD แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของค่า undercarboxylated osteocalcin น่าจะมีผลต่อคุณภาพของกระดูกมากกว่าปริมาณของแร่ธาตุในกระดูก ในขณะที่ในกลุ่มที่มีประวัติกระดูกสะโพกหักยังไม่สามารถชี้ชัดลงได้ว่าจะมีระดับของค่า serum total osteocalcin และค่า undercarboxylated osteocalcin เพิ่มขึ้นสูงกว่าคนปกติหรือไม่

Sugiyama T และคณะ(2001)⁹ ต้องการศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด carboxylation ของ osteocalcin กับคุณภาพของกระดูก โดยทำการตรวจหา serum bone marker ตรวจวัดคุณภาพของกระดูกโดยใช้ ultrasound velocity ซึ่งพอที่จะบ่งชี้ถึงคุณภาพของกระดูกได้ โดยทำการศึกษาในเด็กที่มีสุขภาพแข็งแรงช่วงอายุระหว่าง 7-12 ปี จำนวน 14 ราย เป็นเด็กชายจำนวน 8 รายและเด็กหญิงจำนวน 6 ราย ทำการตรวจเลือดในช่วงเวลา 8.00 - 9.00 น. ภายหลังจากอดอาหารหลังเที่ยงคืน ตรวจหาระดับของ intact, carboxylated และ undercarboxylated osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase และ type I procollagen carboxyl extension peptide สำหรับการตรวจวัดทาง ultrasound จะตรวจหา speed of sound ที่หน้าแข้งขวา โดยใช้ SoundScan 2000 Compact (Myriad Ultrasound System, Rehovot, Israel) ผลการศึกษา ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง serum bone markers และ Z score ของ speed of sound แต่กลับพบว่า สัดส่วนระหว่าง serum carboxylated osteocalcin ต่อ serum intact osteocalcin มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับค่า Z score ของ speed of sound ($r = 0.621, p = 0.016$)

การพบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเกิด carboxylation of osteocalcin ทำให้กระดูกมีคุณภาพดีขึ้น และสิ่งนี้เป็นหลักฐานใหม่เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของวิตามินเคในการรักษาโรคกระดูกพรุน

ผลของ MK-4 ในสัตว์ทดลอง

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นพอจะบอกได้ว่าผู้สูงอายุมีแนวโน้มจะขาดวิตามินเค ซึ่งสามารถตรวจสอบในทางอ้อมได้โดยดูที่ระดับ undercarboxylated osteocalcin ในกระแสเลือด และการขาดวิตามินเค ถือเป็นปัจจัยเสี่ยงหนึ่งของโรคกระดูกพรุน และ

เพิ่มความแข็งแรงต่อการเกิดกระดูกหัก สิ่งที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นการศึกษาถึงการเสริมวิตามินเค ทั้งในยาฉีดและรูปอาหารเสริม ทั้งการศึกษาในห้องทดลอง ศึกษาทั้ง cell culture ศึกษาทั้งสัตว์ทดลองและสุดท้ายคือการใช้ยาในมนุษย์ เพื่อพิสูจน์ว่าการเสริมวิตามินเค สามารถทำให้กระดูกแข็งแรงขึ้นหรือไม่และสามารถป้องกันความเสี่ยงต่อกระดูกหักต่อโรคกระดูกพรุนได้หรือไม่

Yasuhiro Akiyama และคณะ (1993)¹⁰ ทำการศึกษาในหนู โดยวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือต้องการประเมินประสิทธิภาพของยา menatetrenone ต่อหนูที่มีการสูญเสียกระดูกเนื่องจากถูกตัดรังไข่ การทดลองนี้ได้วางแผนทำไว้ 3 การทดลองที่วัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันคือ

การทดลองที่ 1 ต้องการดูประสิทธิภาพของยาต่อ early metaphyseal bone loss ของกระดูกต้นขา ทดลองในหนูจำนวน 30 ตัวโดยแบ่งหนูเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว หนูทุกตัวได้รับอาหารตามปกติ กลุ่มแรกทำ sham operation กลุ่มที่สองตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและให้ยาลวงเรียกกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่สามตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและให้ยา menatetrenone โดยเติม 20 mg menatetrenone ต่อ 100 g ของอาหาร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เริ่มตั้งแต่วันแรกหลังผ่าตัด เรียกกลุ่มรักษา เมื่อครบสองสัปดาห์พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าน้ำหนักกระดูกและความหนาแน่นของกระดูกของทั้ง whole femur และ femoral metaphysis ต่ำกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะที่ femoral metaphysis ในกลุ่มรักษาพบว่าทั้งค่าน้ำหนักและความหนาแน่นของกระดูก whole femur จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีนัยสำคัญ แต่พบว่าที่ femoral metaphysis ของหนูกลุ่มรักษามีค่าความหนาแน่นของกระดูกสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การทดลองที่ 2 ต้องการดูประสิทธิภาพของยาต่อการสูญเสียกระดูกที่เกิดจากการถูกตัดรังไข่ในระยะเวลา 6 เดือน ทดลองในหนูทั้งหมด 28 ตัว แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกจำนวน 7 ตัวทำ sham operation หนูส่วนที่เหลืออีก 21 ตัวทำการตัดรังไข่ออกและแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มควบคุม กลุ่ม menatetrenone 3 mg/kg/day และกลุ่ม menatetrenone 30 mg/kg/day หนูทั้งหมดได้รับอาหาร ตามปกติ หนูในกลุ่ม menatetrenone ให้อาหารที่ประกอบด้วย

menatetrenone เป็นเวลา 6 เดือนตั้งแต่วันแรกหลังผ่าตัด ผลการทดลองพบว่าระดับ plasma alkaline phosphatase ในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ และการเพิ่มนี้ถูกยับยั้งลงได้โดยการใช้ menatetrenone 30 mg/kg/day สำหรับความแข็งแรงของกระดูกวัดที่กระดูกต้นขาขวาของหนู โดยใช้วิธี 3-point bending test โดยวางกระดูกตามแนวนอนระหว่างแกนสองแกนและวัดแรงกดทางแนวตั้งที่ตรงกลางของ กระดูกต้นขาจนทำให้กระดูกหัก พบว่ากลุ่มควบคุมมีความแข็งแรงลดลง โดยเหลือเพียง ร้อยละ 81 เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ในขณะที่ในกลุ่มรักษาทั้งสองกลุ่มมีความแข็งแรงของกระดูกสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าปริมาณแคลเซียม และปริมาณของ hydroxyproline ในเนื้อกระดูก diaphysis ของกระดูกต้นขา (femur) ซึ่งวัดโดยตัดส่วนของ diaphysis ของกระดูกต้นขาซ้ายของหนูมาบดให้ละเอียดและนำผงกระดูกที่ได้จากการเตรียมมา hydrolyze โดย 6 N HCL นำ hydrolysate ที่ได้มาวัดปริมาณของแคลเซียมและ hydroxyproline โดยปริมาณแคลเซียม วัดโดยวิธี Calcium C-test และ hydroxyproline วัดโดยวิธี Kivirikko ผลการวัดพบว่า ปริมาณแคลเซียมใน diaphysis ของกระดูกต้นขาของกลุ่ม menatetrenone 30 mg/kg/day สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณของ hydroxyproline ใน diaphysis ของกระดูกต้นขาในกลุ่มรักษาทั้ง 3 และ 30 mg/kg/day จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงว่า menatetrenone ทั้ง 3 และ 30 mg/kg/day สามารถยับยั้งการลดลงของ hydroxyproline ใน diaphysis ของกระดูกต้นขาได้

การทดลองที่ 3 ต้องการศึกษาศักยภาพในการรักษาของยาต่อการสูญเสียกระดูกเป็นเวลา 6 เดือนหลังถูกตัดรังไข่และได้รับอาหารที่ขาดแคลเซียม การทดลองนี้ใช้หนูจำนวนสูงถึง 122 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างจำนวน 89 ตัว อีกกลุ่มหนึ่งทำ sham operation จำนวน 33 ตัว ภายหลังผ่าตัดหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกจะได้รับอาหารที่ประกอบด้วย 0.01% calcium and 0.67% phosphorus เป็นเวลา 3 เดือน ในขณะที่หนูกลุ่ม sham ได้รับอาหารปกติ แบ่งหนูมากกลุ่มละ 6 ตัว วัดความแข็งแรงของกระดูกและปริมาณแคลเซียมในกระดูกต้นขา จากนั้นแบ่งหนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับแคลเซียมต่ำออกเป็นอีก 3 กลุ่มคือกลุ่มควบคุม กลุ่ม

menatetrenone 30 mg/kg/day และกลุ่ม menatetrenone 100 mg/kg/day ในทั้งสามกลุ่มนี้จะได้รับอาหารที่ประกอบด้วยแคลเซียม 0.17% และฟอสฟอรัส 0.67% และในกลุ่ม menatetrenone ให้ยานี้เป็นแบบอาหารเสริม ให้เป็นเวลา 6 เดือน ทำการฆ่าหนูกลุ่มละ 6-7 ตัวในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 และตรวจวัดค่าต่างๆ พบว่าความแข็งแรงของกระดูกของหนูในกลุ่ม sham ค่อยๆลดลง ในเดือนที่ 2-6 ในขณะที่พบว่า bone strength เพิ่มขึ้นในเดือนแรกๆของทั้งสามกลุ่มที่ตัดรังไข่ แต่หลังจากนั้น bone strength จะค่อยๆลดลงจนถึงเดือนที่ 6 แต่พบว่าในทั้งสามกลุ่มลักษณะการลดลงของ bone strength จะเหมือนกันในช่วง 3 เดือนแรก ส่วนภายหลังจากนั้นกลุ่ม menatetrenone ทั้งสองกลุ่มจะลดลงน้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยที่พบว่ากลุ่ม menatetrenone 30 mg/kg/day จะมี bone strength สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 6 ในขณะที่กลุ่ม 100 mg/kg/day ไม่ต่างกับกลุ่มควบคุม ลักษณะเช่นนี้พบได้กับ calcium content ของกระดูก femur แต่ในเดือนที่ 6 กลุ่ม treatment ทั้งสองกลุ่ม calcium content สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับ hydroxyproline content ของ femur มีรูปแบบเช่นเดียวกับ calcium content โดยในเดือนที่ 6 กลุ่ม treatment ทั้งสองกลุ่มมีปริมาณของ hydroxyproline สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณของ Gla-osteocalcin ในกระดูก femur ในเดือนที่ 6 ลดลงอย่างชัดเจนในกลุ่มควบคุมเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham และพบว่าปริมาณของ Gla-osteocalcin ในกลุ่มรักษาสูงกว่ากลุ่ม ควบคุมอย่างชัดเจนเช่นกัน ระดับของ serum alkaline phosphatase ในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่ม sham (8.6 ± 1.2 และ 7.3 ± 0.8 ตามลำดับ) ในขณะที่ในกลุ่มรักษาทั้งสองกลุ่มมีระดับ serum alkaline phosphatase สูงกว่ากลุ่มควบคุม (10.2 ± 1.0 for 30 mg/kg, 10.0 ± 0.9 for 100 mg/kg) แต่ทั้งหมดไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาที่ได้นี้พอจะบอกได้ว่า **MK-4 (menatetrenone)** สามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกที่เกิดจากการถูกตัดรังไข่ได้ และคงความแข็งแรงของกระดูก รวมทั้งสารที่มีความจำเป็นต่อการสร้างกระดูกไว้ไม่ให้ลดลง

Kuniko hara และคณะ (1993)¹¹ ต้องการศึกษาว່ายา menatetrenone สามารถยับยั้งการสลายกระดูกได้หรือไม่ โดยทำการศึกษาใน mouse calvarial culture

system โดยนำ mouse calvaria ที่มีอายุในช่วง 4 - 5 วัน ทำการเตรียมตามขบวนการและ incubate ในอุณหภูมิ 37°C ภายหลังจากทำการ incubate เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำ calvaria เหล่านี้ไปไว้ใน media ที่ประกอบด้วย PTH, $1,25-(OH)_2D_3$, PGE_2 , interleukin-1 α (IL-1 α) ที่มีและไม่มี menatetrenone ทำการ incubate ต่อ นาน 168 ชั่วโมง ทำการวัดการสลายกระดูกโดยวัดระดับแคลเซียมและ hydroxyproline ใน culture media ที่ 96 ชั่วโมงและใน calvariae ที่ 168 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า ภายใต้อุณหภูมิของ PGE_2 ที่แตกต่างกัน (10^8 , 10^7 , 10^6 M) ความเข้มข้นของแคลเซียมและ hydroxyproline ใน media เพิ่มขึ้นในขณะที่ใน calvariae จะลดลง เมื่อเทียบกับ intact culture หมายความว่าเมื่อใส่ bone resorption agent เข้าไปใน media จะมีการสลายแคลเซียมและ hydroxyproline ออกจากตัวเซลล์เข้าไปใน media

จากนั้นเพื่อจะพิสูจน์ว่าการสลายกระดูกที่ถูกกระตุ้นโดยสารดังกล่าวข้างต้นเกิดขึ้นเนื่องจากการสร้าง PGE_2 ใน calvariae โดยใส่สารที่มีการสลายกระดูก IL-1 α 2 และ 3 U/ml, 10^{-10} และ 3×10^{-10} M $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 ($1,25-(OH)_2D_3$) 3×10^{-7} M prostaglandin E_2 (PGE_2), and 3×10^{-7} M parathyroid hormone (PTH), และเติม indomethacin เพิ่มเข้าไปและดูการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมใน media พบว่าที่ 10^{-7} M indomethacin สามารถยับยั้งการสลายแคลเซียมจากกระดูกโดย IL-1 α และสามารถยับยั้งได้โดยสมบูรณ์ที่ 10^6 M ของ indomethacin ในขณะที่ indomethacin สามารถยับยั้งการสลายกระดูกที่เกิดจากการกระตุ้นโดย $1,25-(OH)_2D_3$ ได้บางส่วน แต่พบว่า indomethacin ไม่สามารถยับยั้งการสลายกระดูกที่เกิดจากการออกฤทธิ์ของ PGE_2 or PTH และเนื่องจากผู้ศึกษาเชื่อว่าการสลายกระดูกที่เกิดจาก IL-1 α เกิดจากการสร้าง PGE_2 ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นจริงหรือไม่โดยทำการวัดความเข้มข้นของ PGE_2 ใน media ภายหลังจากใส่ IL-1 α ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของ PGE_2 ใน media เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IL-1 α ที่เพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นของ PGE_2 ใน media ขนานควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมที่ถูกหลั่งเข้ามาใน media

การศึกษาถึงผลของยา menatetrenone โดยการเติม menatetrenone เข้าไปใน media ที่เลี้ยง calvariae ที่ความเข้มข้น 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M พบว่าใน media ที่มี 2 U/ml IL-1 α จะมีระดับแคลเซียมใน media สูงกว่า media ที่ไม่มี IL-1 α $145 \pm 4\%$ และลดปริมาณแคลเซียมใน calvariae ลงเหลือ $68 \pm 4\%$ หลังจาก incubate 96 ชั่วโมง แต่เมื่อเติม menatetrenone เข้าไปพบว่า menatetrenone สามารถยับยั้งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดได้โดยเป็น dose dependent แต่มีนัยสำคัญที่ 3×10^{-5} M ทั้งความเข้มข้นของแคลเซียมใน media และใน calvaria ($p < 0.01$) โดยเพิ่มปริมาณของแคลเซียมใน calvariae เป็น $90 \pm 3\%$ ของ intact calvariae นอกจากนี้ยังพบว่า menatetrenone สามารถยับยั้งการสลายของ hydroxyproline ออกจาก calvariae ได้ในลักษณะเดียวกับแคลเซียม

วัดความเข้มข้นของ PGE₂ ใน media เพื่อประเมินผลของ menatetrenone ต่อการสร้าง PGE₂ ที่ถูกกระตุ้นจาก IL-1 α ที่ความเข้มข้นของ IL-1 α 2 U/ml จะพบ PGE₂ ใน media สูงกว่า media ที่ไม่มี IL-1 α ถึง 4.8 เท่า แต่ใน media ที่มี menatetrenone ผลสมอยู่ความเข้มข้นของ PGE₂ ใน media จะลดลงตามปริมาณของ menatetrenone ที่ใส่เข้าไปในกรณีของแคลเซียม จะมีลักษณะการตอบสนองต่อ menatetrenone เช่นเดียวกับ PGE₂

สำหรับ 1,25-(OH)₂D₃ ที่ความเข้มข้น 3×10^{-10} M พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมใน media เพิ่มขึ้นเป็น 120% เมื่อเทียบกับ media ที่ไม่มี 1,25-(OH)₂D₃ แต่พบว่าระดับ PGE₂ มีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่มี 1,25-(OH)₂D₃ (105%) ในกรณีนี้พบว่า menatetrenone สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมใน media ได้ โดยจะมากน้อยเพียงใดขึ้นกับขนาดของ menatetrenone ที่ใส่เข้าไป และพบว่า menatetrenone สามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ ได้บางส่วน ในขณะที่ indomethacin สามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ ได้อย่างมาก โดยเหลือเพียง 12% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มี 1,25-(OH)₂D₃ ในขณะที่ลดปริมาณแคลเซียมใน media ได้เพียงเล็กน้อย (ประมาณ 10%)

สำหรับการสลายกระดูกที่เกิดจาก PGE₂ (10^{-7} M) และ PTH (3×10^{-7} M) พบว่า menatetrenone ในขนาด 10^{-5} , 3×10^{-5} M สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมที่เกิดจากการสลายกระดูกลงได้ รวมทั้งสามารถลดการสลาย hydroxyproline ลงได้ตาม

dose dependent โดยกรณีของ PTH- induced bone resorption จะพบนัยสำคัญที่ 10^{-5} และ 3×10^{-5} M ของ menatetrenone

การศึกษาสุดท้ายคือเพื่อยืนยันว่าการลดลงของการสลายกระดูกไม่ได้เกิดจากพิษของ menatetrenone ต่อเซลล์ โดยพิสูจน์ว่าเมื่อหยุดยา menatetrenone แล้ว ผลการยับยั้งการสลายกระดูกจะหายไปเช่นกัน หลังจากตรวจสอบ media ใน 96 ชั่วโมงแล้ว เปลี่ยน media ใหม่ที่ไม่มี menatetrenone และตรวจสอบ media อีกครั้งใน 72 ชั่วโมง พบว่า การสลายกระดูกที่เกิดจากทั้ง IL-1 α และ PTH กลับมาเป็นปกติอีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับของ LDH ใน media ที่มีและไม่มี menatetrenone ไม่ต่างกัน

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า IL-1 α สามารถสลายกระดูกได้โดยผ่านการสร้าง PGE₂ ซึ่งฤทธิ์การสลายกระดูกนี้สามารถถูกยับยั้งได้โดยสิ้นเชิงโดย indomethacin และ menatetrenone สามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ และยับยั้งการสลายกระดูกที่เกิดจาก IL-1 α ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า menatetrenone สามารถยับยั้งการสลายกระดูกที่เกิดขึ้นจาก PTH, 1,25-(OH)₂D₃, และ PGE₂ โดยไม่ขึ้นกับการสร้าง PGE₂ และการศึกษานี้สามารถพิสูจน์ได้ว่าการที่ menatetrenone สามารถยับยั้งการสลายกระดูกได้ โดยไม่มีพิษต่อเซลล์ พิสูจน์จากเมื่อหยุดยา menatetrenone ความสามารถการสลายกระดูกของสารต่างๆสามารถกลับมาเป็นปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ LDH ใน media ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึง cell lysis ไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง media ที่มีและไม่มี menatetrenone

สรุป **menatetrenone** สามารถยับยั้งการสลายกระดูกที่เกิดจาก **resorptive agent** และผลของ **menatetrenone** ต่อ IL-1 α ส่วนหนึ่งมาจากการยับยั้งการสร้าง PGE₂ และ พบว่า **menatetrenone** สามารถยับยั้งการสลายกระดูกที่เกิดจากตัว PGE₂ โดยตรง

Takashi Tomiuga และคณะ (1994)¹² ศึกษาถึงผลของ vitamin K₂ homologue (MK-4) ต่อ calcium balance ในหลาย ๆ สถานการณ์ การจะดูเช่นนี้ต้องทำการทดลองภายใต้ 2 สถานะคือ

1. ให้อาหารที่ขาดวิตามินเคและฉีดยาปฏิชีวนะกับหนู (เป็นการทดลองที่ 1)
2. ให้อาหารที่ขาดวิตามินเคร่วมกับเพิ่ม sodium chloride เข้าไปในอาหาร (การทดลองที่ 2 และ 3)

การให้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าแบคทีเรียในลำไส้ ทำให้ไม่สามารถสร้างวิตามินเคได้ และการให้ sodium chloride เพื่อกระตุ้นให้เพิ่มการขับแคลเซียมออกทางปัสสาวะ

การทดลองที่ 1: (แบบจำลองของการให้ยาปฏิชีวนะ) แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มปกติได้รับอาหารตามปกติ อีกสามกลุ่มที่เหลือคือกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MK-4 ขนาด 1 mg/kg/day ฉีดทาง subcutaneous และกลุ่มที่ได้รับยา MK-4 ขนาด 10 mg/kg/day ฉีดทาง subcutaneous ได้รับอาหารที่ขาดวิตามินเคและได้รับการฉีดยาปฏิชีวนะทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ทำการบันทึกอาหารที่ได้รับทุกวัน บันทึกปริมาณปัสสาวะและน้ำหนักอุจจาระและปริมาณแคลเซียมทั้งในปัสสาวะและอุจจาระ สมดุลแคลเซียมคำนวณได้จากความแตกต่างระหว่างแคลเซียมที่รับประทานกับแคลเซียมที่ถูกขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระ ในวันที่ 7 ดูดเลือดจาก abdominal aorta จากหนูทุกตัว (ภายหลังวางยาสลบด้วย ether) ผลการศึกษาพบว่า ในวันที่ 7 ค่า blood coagulation time ในกลุ่มควบคุมนานกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในขณะที่กลุ่ม MK-4 ทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มปกติ ระดับแคลเซียมในกระแสเลือดในทั้ง 4 กลุ่มมีระดับไม่ต่างกัน ในขณะที่ระดับ serum alkaline phosphatase ในกลุ่ม MK-4 10 mg/kg มีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ค่า calcium balance เป็นบวกในทุกกลุ่ม แต่ค่า cumulative calcium balance ในกลุ่มควบคุมจะต่ำกว่ากลุ่มปกติ และต่ำกว่ากลุ่ม MK-4 ทั้งสองกลุ่มอย่างชัดเจน ($p < 0.05$) ในวันที่ 7

การทดลองที่ 2: (แบบจำลองของ sodium-loaded) แบ่งหนูเป็น 4 กลุ่มเช่นกันคือ กลุ่มปกติได้รับอาหารตามปกติ กลุ่มควบคุมให้อาหารที่ขาดวิตามินเคและเสริม sodium chloride 4.6% กลุ่มได้ยา MK-4 1 mg/kg ให้อาหารที่ประกอบด้วย MK-4 2 mg ต่อ 100 g ของอาหารที่ขาดวิตามินเคร่วมกับเสริม sodium chloride อีก 4.6% และกลุ่มได้รับยา MK-4 10 mg/kg/day จะได้รับอาหารที่ประกอบด้วย MK-4 20 mg ต่อ 100 g ของอาหารที่ขาดวิตามินเคร่วมกับเสริม sodium chloride อีก 4.6% ทำการตรวจวัด Forty-eight-hour calcium balance สัปดาห์ละหนึ่งครั้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าค่าสมดุลแคลเซียมในกลุ่มควบคุมมีค่าต่ำกว่ากลุ่มปกติตลอดการทดลอง โดยมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 ในขณะที่กลุ่ม MK-4 ทั้งสองกลุ่มมีค่า

สมดุลแคลเซียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 ถึงสัปดาห์ที่ 5 มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณของ MK-4 ที่ให้ สำหรับค่า cumulative calcium balance ในกลุ่มควบคุมในสองสัปดาห์แรกไม่ต่างจากกลุ่มปกติ แต่ในกลุ่มควบคุมค่า cumulative calcium balance จะค่อยๆลดลงจนมีค่าต่ำกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5 ในขณะที่ในกลุ่ม MK-4 ทั้งสองกลุ่มมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 โดยที่กลุ่ม MK-4 10 mg/kg จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่สามเป็นต้นไป ในขณะที่กลุ่ม MK-4 1 mg/kg จะมีลักษณะการเพิ่มขึ้นของค่า cumulative calcium balance ใกล้เคียงกับกลุ่มปกติและจะต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5

การที่สมดุลแคลเซียมลดลงจะมีผลกระทบต่อกระดูกหรือไม่ ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างกันทั้งในปริมาณและมวลกระดูกระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มปกติ แต่การได้รับ sodium chloride เป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่าความหนาแน่นของกระดูกมีแนวโน้มลดลง แต่ยังไม่มีความสำคัญ ($p < 0.10$)

การทดลองที่ 3: (การทดลองการดูดซึมแคลเซียมทางลำไส้) ทำลักษณะคล้ายๆกับการทดลองที่ 2 โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มปกติให้อาหารตามปกติ กลุ่มควบคุมให้อาหารที่ขาดวิตามินเคและเติม 4.6% sodium chloride กลุ่ม MK-4 เติม 4.6% sodium chloride ในอาหารและเสริม MK-4 20 mg ต่ออาหาร 100 g กลุ่มที่ 4 คือกลุ่ม 1- α -OH- D_3 ให้อาหารที่ขาดวิตามินเค เติม 4.6% sodium chloride และฉีด 1- α -OH- D_3 1 μ g/kg intraperitoneum ทุกวันเว้นวัน หลัง 6 สัปดาห์ นำลำไส้ของหนูทุกตัวทำการตรวจ intestinal calcium transport โดยวิธี everted gut-sac technique พบว่าการดูดซึมแคลเซียม ในกลุ่มควบคุมมีค่าต่ำกว่าในทั้งสามกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ทั้งกลุ่ม MK-4 และกลุ่มวิตามินดีมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มปกติ

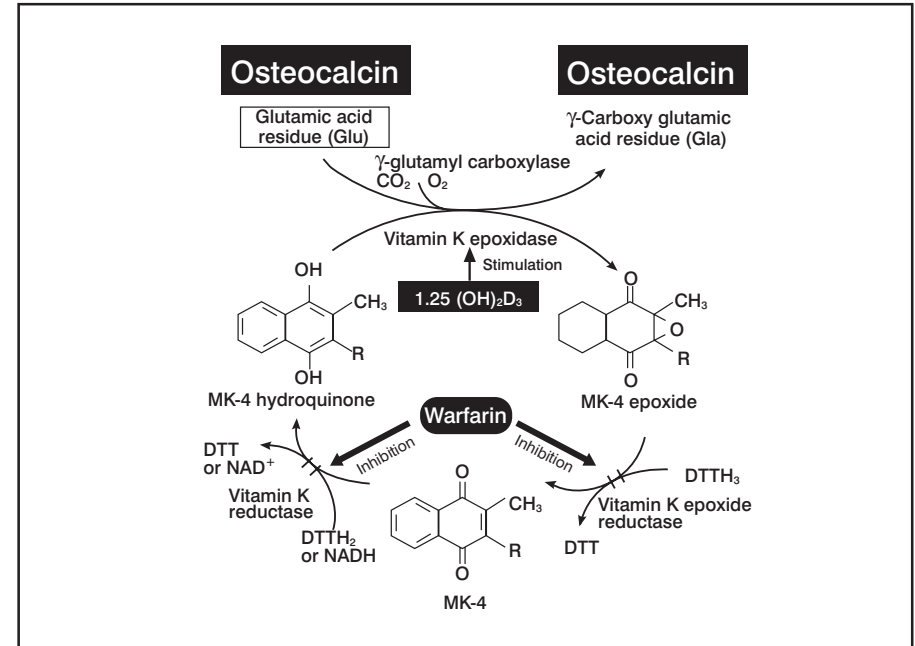
ผลที่ได้เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการขาดวิตามินเคทำให้ **cumulative calcium balance** ลดลง โดยไปลดการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้ และการเสริม **MK-4** สามารถแก้ไขปัญหานี้ได้

มีรายงานว่า menatetrenone (MK-4) ร่วมกับ 1,25-(OH) $_2$ D_3 กระตุ้นให้เกิด mineralization และเพิ่ม osteocalcin ที่มี γ -carboxyglutamic acid (Gla) ใน cultured human osteoblasts

N.Miyake และคณะ (2001)¹³ ต้องการศึกษาว่า MK-4 ที่ถูก metabolized ในเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ทำหน้าที่เป็น cofactor ของ γ -glutamyl carboxylase จากการศึกษานี้ใน cultured human osteoblasts จากการศึกษานี้ในเซลล์ที่แยกมาจาก cultured human osteoblasts พบมีการเปลี่ยนแปลงจาก MK-4 ไปเป็น MK-4 2,3-epoxide (epoxide) และจาก epoxide ไปเป็น MK-4

การศึกษานี้ต้องการดูผลของ 1,25-(OH)₂D₃ และ warfarin ต่อวงจรของวิตามินเคใน cultured osteoblasts โดยการเติม 1 nM 1,25-(OH)₂D₃ หรือ 25 μ M warfarin เข้าไปใน cultured osteoblasts พบว่า MK-4 ถูกเปลี่ยนเป็น epoxide เพิ่มขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงจาก epoxide ไปเป็น MK-4 ถูกยับยั้งโดยการเติม warfarin (2.5-25 μ M) เข้าไปใน cultured human osteoblasts ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนนี้ไม่ถูกยับยั้ง โดย 1,25-(OH)₂D₃ เพื่อจะอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ ทำการศึกษานี้ใน cell-free assay system โดย incubate osteoblast microsomes กับ 10 μ M epoxide ที่มีและไม่มีการเติม warfarin และ 1,25-(OH)₂D₃ ผลการศึกษานี้พบว่า epoxide reductase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ ตัวหนึ่งในวงจรของวิตามินเคถูกยับยั้งลงอย่างมากโดย warfarin (2.5-25 μ M) ในขณะที่ 1,25-(OH)₂D₃ (0.1-1 nM) ไม่มีผลต่อเอ็นไซม์ตัวนี้ นอกจากนี้ถึงแม้จะให้ 1,25-(OH)₂D₃ ในขนาด 1 nM กับเซลล์สร้างกระดูกก่อนก็ไม่มีผลในการยับยั้งฤทธิ์ของ epoxide reductase แต่อย่างไร แต่พบว่าฤทธิ์ของ epoxidase ซึ่งก็คือ γ -glutamyl carboxylase จะถูกกระตุ้นโดยการให้ 1,25-(OH)₂D₃ ในขนาด 1 nM กับเซลล์สร้างกระดูกก่อน

ผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าวงจรการเปลี่ยนแปลงของวิตามินเคสามารถเกิดขึ้นได้ในเซลล์สร้างกระดูกเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในตับในช่วง post-translation โดยพบว่า การเกิด mineralization เกิดจากการทำงานร่วมกันของวิตามินดีและวิตามินเค2 (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 วงจรของ MK-4 ที่เชื่อว่าจะพบในเซลล์สร้างกระดูก โดยพบว่ามีลักษณะที่คล้ายกับที่พบในตับ จากการศึกษานี้พบว่า 1,25-(OH)₂D₃ เป็นตัวกระตุ้นฤทธิ์ของ γ -glutamyl carboxylase (epoxidase) (คัดลอกจาก จาก Miyake N, Hoshi K, Sano Y, Kikuchi K, Tadano K, Koshihara Y. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote vitamin K₂ metabolism in human osteoblasts. Osteoporos Int 2001)

Yoshiko Iwasaki และคณะ (2002)¹⁴ พบว่าปัญหาหนึ่งที่มักพบในนักบินอวกาศคือการสูญเสียมวลกระดูกในช่วงที่อยู่ในอวกาศเป็นเวลานาน การศึกษานี้ต้องการดูผลของการใช้ยา vitamin K₂ ต่อความผิดปกติของกระดูกในหนูที่ถูกจับทางห้อยอยู่กลางอากาศ ซึ่งเป็นการเลียนแบบนักบินอวกาศ ในลักษณะนี้จะพบมีการเพิ่มการสลายกระดูกและลดการสร้างกระดูกทำให้มีการสูญเสียกระดูกอย่างต่อเนื่องใน 4 สัปดาห์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูกในมนุษย์ระหว่างอยู่ในอวกาศ โดยพบว่ามี

การลดลงของ BMD อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบมีการลดลงของ mineral apposition rate (MAR), มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูกต่อ bone perimeter (N.Oc/B.Pm) มี การเพิ่ม osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS) และสิ่งเหล่านี้สามารถป้องกัน ได้โดยรับประทาน vitamin K₂ (menatetrenone, 22 mg/kg body weight) และจากการศึกษาโดย microfocuss computed tomography (CT) และ node-strut analyses พบว่าทั้งโครงสร้างและปริมาตรของ trabecular bone สามารถรักษาให้อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับปกติได้โดยการรับประทาน vitamin K₂ จากผลการศึกษานี้พอจะบอกได้ว่า vitamin K₂ สามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกและสามารถคงสถานะของโครงสร้างปกติของ trabecular structure ได้ในระหว่างที่อยู่ในอวกาศ

การศึกษาทางคลินิกของ MK-4

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น พอจะบอกได้ว่า menatetrenone มีความสามารถป้องกันการสลายกระดูกและเพิ่มคุณภาพของกระดูกได้ ต่อไปนี้จะเป็นการศึกษาในทางคลินิกเพื่อพิสูจน์ว่า menatetrenone สามารถป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนและเพิ่มคุณภาพของกระดูกได้ในมนุษย์

Hajime Orimo และคณะ (1998)¹⁵ ต้องการประเมินประสิทธิผลของ menatetrenone ต่อ cortical bone mineral density และความปลอดภัยของยา ทำการศึกษาแบบ double-blind placebo controlled นาน 24 สัปดาห์ ศึกษาในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนจำนวน 80 ราย แบ่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มควบคุมจำนวน 41 ราย และกลุ่มรักษา (ใช้ยา menatetrenone ในรูปแบบ Hard capsule ขนาด 90 mg/day) จำนวน 39 ราย การประเมิน bone density ใช้ X-ray film ของ right second

metacarpal bone ในท่า AP ใช้วิธี microdensity เปรียบเทียบความหนาแน่นกับ reference aluminum step wedge

ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มวิตามินเคสามารถเพิ่มค่า BMD เมื่อเทียบกับก่อนรักษาได้ 2.20%±2.48% ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมลดลง -7.31%±3.65% เมื่อเทียบกับก่อนรักษา (p=0.037, K₂ vs placebo) ค่า urinary excretion of γ -carboxyglutamic acid (Gla) ในกลุ่มรักษาเพิ่มขึ้นจาก 72.61±4.08 nmole/mg creatinine ในช่วงก่อนรักษาไปเป็น 88.36±5.35 ในสัปดาห์ที่ 24 ของการรักษา (p=0.008) ขณะที่ในกลุ่มควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ urinary Gla excretion ในกรณีของ urinary calcium/creatinine ratio ในกลุ่มรักษาลดลงจาก 0.137±0.018 ไปเป็น 0.118±0.016 ในขณะที่กลุ่มควบคุมกลับเพิ่มขึ้นจาก 0.153±0.018 ไปเป็น 0.189±0.029 (p=0.028, K₂ vs placebo) ส่วนผลข้างเคียง พบเพียงเล็กน้อย

โดยสรุป menatetrenone ในรูปแบบ Hard capsule ขนาด 90 mg/day สามารถคงความหนาแน่นของ peripheral cortical bone และปลอดภัยในการรักษาโรคกระดูกพรุน

Yoshinori Tsukamoto และคณะ (2000)¹⁶ ทำการศึกษาตรวจวัดหาการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มข้นของวิตามินเค 2 (menaquinone-7, MK-7) ในคนที่มีสุขภาพปกติ และรับประทาน natto โดยศึกษาในนรีเวชอาสาสมัครจำนวน 8 คน โดยให้คนทั้ง 8 รับประทาน natto ที่มีส่วนผสมของ MK-7 แตกต่างกัน จำนวน 3 ครั้ง โดยห่างกันครั้งละ 7 วัน ดังต่อไปนี้

- Regular natto ประกอบด้วย MK-7 ในปริมาณ 775 μ g/100 g (MK-7 x 1)
- Reinforced natto ประกอบด้วย MK-7 ในปริมาณ 1,298 μ g/100 g (MK-7 x 1.5)
- Reinforced natto ประกอบด้วย MK-7 ในปริมาณ 1,765 μ g/100 g (MK-7 x 2)

ผลการศึกษาพบว่าระดับของ MK-7 และ γ -carboxylated osteocalcin ในกระแสเลือดภายหลังรับประทาน natto เพิ่มขึ้น (MK-7 1,298 or 1,765 μ g/100 g) ระดับของ serum undercarboxylated osteocalcin ลดลงอย่างชัดเจนในคนที่รับประทาน MK-7 ในปริมาณ 1,765 μ g/100 g

จากการศึกษาในคนหนุ่มสาวที่มีสุขภาพแข็งแรงจำนวน 134 ราย (บุรุษจำนวน 85 ราย และสตรีจำนวน 39 ราย) โดยพิจารณาความถี่ของการรับประทาน natto 3 กลุ่มคือ

1. ไม่รับประทาน natto
2. รับประทาน natto เป็นบางเวลา(เดือนละสองสามครั้ง)
3. รับประทานเป็นประจำ (สัปดาห์ละสองสามครั้ง)

ทั้งหมดรับประทาน MK-7 ในปริมาณปกติ (775 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) ผลการตรวจวัดระดับของ MK-7 และ γ -carboxylated osteocalcin ในบุรุษที่รับประทาน natto เป็นบางเวลา และเป็นประจำ มีระดับสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับประทานอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาที่ได้นี้หมายความว่า การรับประทาน natto สามารถเพิ่มระดับของ MK-7 และ γ -carboxylated osteocalcin ในคนปกติได้

Masataka Shiraki และคณะ (2000)¹⁷ ทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่าการรักษาด้วย vitamin K₂ (menatetrenone) สามารถป้องกันอุบัติการณ์กระดูกหักใหม่จากโรคกระดูกพรุนได้ โดยศึกษาในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนจำนวน 241 ราย ผู้ป่วยจะถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคกระดูกพรุนเมื่อค่า lumbar BMD มีค่าต่ำกว่า young adult mean 70% หรือมี nontraumatic vertebral fracture ตั้งแต่ 1 ปล้องขึ้นไปร่วมกับ lumbar BMD <80% ของ young adult mean ทำการศึกษาแบบ randomized open label study เป็นเวลา 2 ปี แบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเรียกกลุ่มควบคุม ได้รับ elementary calcium 150 mg/day จำนวน 121 ราย และกลุ่มที่สองเรียกกลุ่มรักษาได้รับ menatetrenone 45 mg/day และ elementary calcium 150 mg/day รับประทานทุกวัน ติดตามผลเป็นเวลา 2 ปี โดยตรวจวัดค่า lumbar BMD ด้วยเครื่อง DXA ที่ 6, 12 และ 24 เดือน ส่วนการประเมินกระดูกสันหลังหักให้ถ่ายภาพรังสีของ thoracic and lumbar spine ทั้ง AP and lateral ก่อนรักษา 1 ปีและ 2 ปีหลังรักษา และติดตามการเกิดกระดูกหักใหม่ ตรวจวัดค่า Glu-osteocalcin (ucOC) และ menaquinone-4 level ในวันสิ้นสุดการรักษา ส่วนค่า bone marker total osteocalcin และ urine deoxypyridinoline ตรวจวัดก่อนและหลังให้การรักษา

ผลการศึกษาพบว่า อุบัติการณ์กระดูกหักในช่วงสองปีในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มรักษาอย่างมีนัยสำคัญ (chi-square = 10.935; p=0.0273) และพบว่าในกลุ่มควบคุมมีการลดลงของค่า lumbar spine BMD ในช่วง 6,12 และ 24 เดือนเมื่อเทียบกับก่อนรักษา ดังนี้คือ -1.8 \pm 0.6%, -2.4 \pm 0.7% และ -3.3 \pm 0.8% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มรักษาเป็น 1.4 \pm 0.7%, -0.1 \pm 0.6% และ -0.5 \pm 1.0% ตามลำดับ และการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่มรักษาต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.001 for 6 months, p=0.0153 for 12 months, and p=0.0339 for 24 months) สำหรับค่า serum Glu-osteocalcin ในวันสิ้นสุดการรักษาในกลุ่มรักษาต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.0001) ส่วนค่า total osteocalcin ในกระแสเลือดของกลุ่มรักษาในเดือนที่ 24 เพิ่มขึ้นจากก่อนรักษา มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.0081) ในขณะที่ในกลุ่มรักษา ค่า urinary deoxypyridinoline ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นได้ว่าการใช้ยา **menatetrenone** สามารถป้องกันอุบัติการณ์ของกระดูกหักใหม่ได้ ถึงแม้จะไม่พบการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกสันหลังอย่างมีนัยสำคัญก็ตามนอกจากนี้วิตามินเคยังช่วยเพิ่ม γ -carboxylation ต่อโมเลกุลของ **osteocalcin**

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการใช้ยากลุ่ม glucocorticoid สามารถทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้โดยขัดขวางการสร้างกระดูก แต่ผลของ glucocorticoid ต่อการสลายกระดูกยังไม่เป็นที่ชัดเจน K.Yonemura และคณะ (2000)¹⁸ ต้องการพิสูจน์ว่าการใช้วิตามินเค ซึ่งเป็นยาที่ช่วยส่งเสริมการสร้างกระดูก สามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกที่ถูกกระตุ้นโดย prednisolone โดยทำการศึกษาแบบ randomized, prospective, controlled study ในผู้ป่วยจำนวน 20 รายที่เป็นโรค chronic glomerulonephritis ได้รับการรักษาด้วยยา prednisolone ผู้ป่วยทุกรายเริ่มให้ยา prednisolone ในขนาด 0.8 mg/kg body weight/day (maximum of 40 mg) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และลดลงเหลือ 20 mg/day ในอีกประมาณ 6 สัปดาห์ต่อไป แบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่มโดยกลุ่มแรกมี 10 รายได้รับ prednisolone เพียงอย่างเดียว ในขณะที่กลุ่มที่สองจำนวน 10 รายเช่นกันได้รับ prednisolone ร่วมกับ menatetrenone (15 mg) วันละ 3 เวลา การประเมินผลทำโดยวัดความหนาแน่นของกระดูกบริเวณ lumbar spine โดย DXA

และตรวจวัดค่า biochemical markers of bone metabolism ของทั้งเลือดและปัสสาวะ โดยการตรวจก่อนและ 10 สัปดาห์ภายหลังได้รับยาในทั้งสองกลุ่ม พบว่าในกลุ่มแรกค่า BMD ของกระดูกสันหลังลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก $1.14 \pm 0.12 \text{ g/cm}^2$ ไปเป็น $1.10 \pm 0.11 \text{ g/cm}^2$ ($p=0.0029$) ค่า serum intact osteocalcin และ procollagen type I C-peptide (PICP) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการสร้างกระดูกลดลงอย่างมาก (ลดลงจาก 5.2 ± 2.8 ไปเป็น $1.0 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$; $p=0.0014$ และ 90.4 ± 31.7 ไปเป็น $67.6 \pm 15.2 \text{ ng/ml}$; $p=0.0194$ ตามลำดับ) ส่วนค่า deoxypyridinoline ในปัสสาวะ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การสลายกระดูกก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (จาก 6.1 ± 1.8 ไปเป็น $4.9 \pm 1.3 \text{ nM/mM creatinine}$; $p=0.0233$) ในกลุ่มที่สองพบว่าค่า BMD ไม่ลดลง (1.09 ± 0.09 ไปเป็น $1.07 \pm 0.07 \text{ g/cm}^2$, $p=0.153$) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า PICP ไม่ลดลงเช่นกัน (จาก 93.1 ± 38.1 ไปเป็น $67.9 \pm 15.8 \text{ ng/ml}$; $p=0.076$) แต่พบว่าค่า serum intact osteocalcin และ deoxypyridinoline ในปัสสาวะยังคงลดลงอยู่ (จาก 4.8 ± 2.8 ไปเป็น $0.8 \pm 1.7 \text{ ng/ml}$; $p=0.008$ และ 6.0 ± 2.5 ไปเป็น $4.3 \pm 1.0 \text{ nM/mM creatinine}$; $p=0.007$ ตามลำดับ)

จากผลการศึกษาที่ได้นี้พออธิบายได้ว่าการรักษาด้วยยา prednisolone จะทำให้ค่า BMD ของกระดูกสันหลังลดลงซึ่งเกิดจากการยับยั้งการสร้างกระดูกแต่ไม่พบการเพิ่มการสลายกระดูก ในขณะที่หากให้ร่วมกับ menatetrenone สามารถป้องกันการลดลงของ BMD และของ PICP ได้ แต่กลับไม่สามารถหยุดยั้งการลดลงของ serum intact osteocalcin ที่เกิดจากยา prednisolone ได้ ซึ่งการที่เกิดความไม่สอดคล้องกันเช่นนี้เชื่อว่าค่า intact osteocalcin น่าจะเป็นตัววัดการสร้างกระดูกที่ไม่ไวเพียงพอ

สรุปว่าการรักษาด้วยยา prednisolone จะทำให้ค่า BMD ของกระดูกสันหลังลดลง โดยไปยับยั้งการสร้างกระดูก และเมื่อให้ยา menatetrenone ร่วมด้วยสามารถป้องกันสิ่งนี้ได้

Jun Iwamoto และคณะ (2000)¹⁹ ต้องการประเมินผลของการใช้วิตามินดี3 และวิตามินเค2 ต่อค่า BMD ของกระดูกสันหลังในสตรีภายหลังหมดประจำเดือนและเป็นโรคกระดูกพรุน โดยทำการศึกษาในสตรีที่เป็นโรคกระดูกพรุนจำนวน 92 รายหมดประจำเดือนนานกว่า 5 ปี ช่วงอายุตั้งแต่ 55-81 ปี แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มโดยวิธีสุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 เรียกกลุ่ม D จำนวน 29 ราย ให้วิตามินดี3 อย่างเดียว ($1-\alpha$ (OH) D_3 $0.75 \mu\text{g/day}$)

กลุ่มที่ 2 เรียกกลุ่ม K จำนวน 22 ราย ให้วิตามินเค 2 อย่างเดียว (menatetrenone, 45 mg/day)

กลุ่มที่ 3 เรียกกลุ่ม DK จำนวน 21 ราย ให้วิตามินดี3 และ วิตามินเค2

กลุ่มที่ 4 เรียกกลุ่ม C จำนวน 20 ราย ให้แคลเซียมเพียงอย่างเดียว (calcium lactate, 2g/day)

วัดค่า BMD ของ lumbar spine (L2-L4) โดย dual energy X-ray absorptiometry ในปีที่ 0, 1 และ 2

ผลการศึกษา ไม่พบความแตกต่างกันของอายุ BMI, จำนวนปีภายหลังหมดประจำเดือน และค่า BMD เบื้องต้นในทั้งสี่กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ

จากการวิเคราะห์โดย ANOVA with repeated measurements พบการลดลงของค่า BMD ในกลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$)

จากการวิเคราะห์โดย Two-way ANOVA with repeated measurements พบมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของค่า BMD ในกลุ่ม D และกลุ่ม K เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ($p<0.05$ and $p<0.001$ ตามลำดับ) และพบการเพิ่มขึ้นของค่า BMD อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม DK เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, D, และ K ($p<0.0001$, $p<0.05$ and $p<0.01$ ตามลำดับ)

จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการใช้วิตามินดี หรือวิตามินเค กับผู้ป่วยเป็นเวลา 2 ปีสามารถเพิ่มมวลกระดูกของกระดูกสันหลังในสตรีภายหลังหมดประจำเดือนร่วมกับเป็นโรคกระดูกพรุนได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การให้แคลเซียมเพียงอย่างเดียวกลับทำให้ค่า BMD ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน และหากให้วิตามินดีร่วมกับวิตามินเคสามารถเพิ่มค่ามวลกระดูกของกระดูกสันหลังขึ้นได้มากกว่าทั้งสามกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ

แต่เป้าหมายของการรักษาโรคกระดูกพรุนที่แท้จริงคือป้องกันการกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุน แต่จากการศึกษานี้ไม่สามารถประเมินอุบัติการณ์ของกระดูกสันหลังหักได้ ซึ่งควรจะมีการศึกษาใหม่ที่ใหญ่มากขึ้น เพื่อดูถึงประสิทธิผลของการใช้วิตามินดีร่วมกับวิตามินเคต่ออุบัติการณ์ของกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุน

ศจ.นพ.ณรงค์ บุญยรัตเวชและคณะ (2001)²⁰ ทำการศึกษาถึงประสิทธิผลและผลข้างเคียงของวิตามินเค2 ต่อระดับของ undercarboxylated osteocalcin และค่ามวลกระดูกในสตรีไทยหลังหมดประจำเดือน โดยศึกษาในสตรีไทยที่หมดประจำเดือนอย่างน้อย 6 ปี และค่า BMD ที่บริเวณ distal end of radius T-score ต้องมีค่าต่ำกว่า -2.5 ลงไป แบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกจำนวน 40 รายได้รับ elemental calcium 800 mg/day ในรูป calcium carbonate และกลุ่มที่สองได้รับ elemental calcium 800 mg/day ร่วมกับ menatetrenone ขนาด 45 mg/day จำนวน 43 ราย ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาโดย menatetrenone มีค่า ucOC ลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่สองแต่ยังไม่มีความสำคัญ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 3 โดยลดลง 49.19% (p=0.0001) เดือนที่หกลดลง 60.16% (p=0.0001) และเดือนที่สิบสองลดลง 87.08% (p=0.0001) เมื่อเทียบกับก่อนได้รับยา ทั้งสองกลุ่มไม่พบการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกสะโพกอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่หกและเดือนที่สิบสอง แต่กลุ่มที่ได้รับ menatetrenone พบมีการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกของกระดูกสันหลัง 0.6% และพบการลดลงของการสลายกระดูกมากถึง 58.84% (p=0.0001) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแคลเซียมเพียงอย่างเดียว เมื่อให้ menatetrenone กับกลุ่มที่ได้รับแคลเซียมเพียงอย่างเดียวเมื่อสิ้นสุดเดือนที่หก พบว่ามีการลดลงของค่า ucOC ในลักษณะเดียวกับกลุ่มที่เคยได้รับ menatetrenone สำหรับผลข้างเคียงพบมีผู้ป่วยเพียงสองรายที่เกิดผลข้างเคียงคือมี mild skin rash ซึ่งสามารถหายได้เองเมื่อหยุดยา

Takami Miki และคณะ (2003)²¹ ต้องการศึกษารูปแบบผลในระยะเวลาสั้นของ menaquinone 4 (MK4 or menatetrenone) ต่อ undercarboxylated osteocalcin ในกระแสเลือดของสตรีสูงอายุที่เป็นโรคกระดูกพรุน โดยทำการศึกษาในสตรีสูงอายุที่เป็นโรคกระดูกพรุน และมีกระดูกสันหลังหักจำนวน 20 ราย (ค่า BMD ของ lumbar spine มี T-score < -1.5) ช่วงอายุตั้งแต่ 71-81 ปี (เฉลี่ย 75.8 ปี) ถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มแบบสุ่ม กลุ่มแรกได้รับ MK4 ในขนาด 45 mg/day และแคลเซียม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะแคลเซียม 2 สัปดาห์เช่นกัน

ระดับของ serum intact osteocalcin (OC) and undercarboxylated osteocalcin (ucOC) วัดโดยวิธี immunoradiometric assay and enzyme immunoassay ตามลำดับ โดยวัดในวันแรกที่เข้าโครงการ วันที่ 7 และวันที่ 14 ตามลำดับ

พบว่าในช่วงเริ่มเข้าโครงการกลุ่มผู้สูงอายุทั้งสองกลุ่มมีค่า baseline data อันได้แก่ อายุ น้ำหนัก ระดับของ phyloquinone, menaquinone 4, menaquinone 7, OC and ucOC รวมทั้งค่า BMD ของ lumbar spine and distal radius ในทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน

ในช่วงสิ้นสุดโครงการกลุ่มที่ได้รับ MK4 มีระดับของ MK4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจาก 0.2±0.1 (mean±SE) pg/ml ไปเป็น 15.09±5.62 pg/ml (p<0.04) และระดับของ ucOC ลดลงจาก 2.8±0.93 ng/ml ไปเป็น 1.76±0.56 ng/ml (p<0.05) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระดับของ serum OC ในทั้งสองกลุ่มไม่มีความเปลี่ยนแปลงตลอดโครงการ

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม MK4 สามารถลดระดับ ucOC ภายในสองสัปดาห์ โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ total OC แสดงว่าตัว ucOC ที่ลดลงในกลุ่มนี้ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น carboxylated OC

สรุปได้ว่า การได้รับ MK4 สามารถลดระดับของ undercarboxylated osteocalcin ในกระแสเลือดได้ภายในเวลาเพียง 2 สัปดาห์

สรุป

จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่าผู้สูงอายุมีแนวโน้มขาดวิตามินเค และเป็นปัจจัยเสี่ยงหนึ่งต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน การเสริมวิตามินเคทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์สามารถพิสูจน์ได้ว่าวิตามินเคสามารถลดการสลายของกระดูก เพิ่มคุณภาพของกระดูกและสามารถลดอุบัติการณ์ของกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุนได้

เอกสารอ้างอิง

1. Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995; 345(8944):229-34.
2. Suttie JW. Vitamin K. Stipanuk MH, editor. *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2000: 568-83.
3. Gerald F. Combs Jr. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 2nd edition. San Diego, California: Academic press, 1998.
4. Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone gla protein) in elderly women. *J Bone Miner Res* 1991; 6(11):1211-6.
5. Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993; 91(4):1769-74.
6. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med* 1992; 327(23):1637-42.
7. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3):719-24.
8. Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 1998; 62(4):286-9.
9. Sugiyama T, Kawai S. Carboxylation of osteocalcin may be related to bone quality: a possible mechanism of bone fracture prevention by vitamin K. *J Bone Miner Metab* 2001; 19(3):146-9.
10. Akiyama Y, Hara K, Ohkawa I, Tajima T. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats. *Jpn J Pharmacol* 1993; 62(2):145-53.
11. Hara K, Akiyama Y, Tajima T, Shiraki M. Menatetrenone inhibits bone resorption partly through inhibition of PGE2 synthesis in vitro. *J Bone Miner Res* 1993; 8(5):535-42.
12. Tomiuga T, Kobayashi M, Nakajima Y et al. Effects of menatetrenone on the decrease in calcium balance induced by vitamin K-deficient diet and sodium loading in rats. *Jpn J Pharmacol* 1994; 65(1):35-43.
13. Miyake N, Hoshi K, Sano Y, Kikuchi K, Tadano K, Koshihara Y. 1,25-dihydroxyvitamin D3 promote vitamin K2 metabolism in human osteoblasts. *Osteoporos Int* 2001; 12(12):680-7.
14. Iwasaki Y, Yamato H, Murayama H et al. Maintenance of trabecular structure and bone volume by vitamin K(2) in mature rats with long-term tail suspension. *J Bone Miner Metab* 2002; 20(4):216-22.
15. Orimo H, Shiraki M, Tomita A, Morii H, Fujita T, Ohata M. Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: A double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Metab* 1998; 16:106-12.
16. Tsukamoto Y, Ichise H, Kakuda H, Yamaguchi M. Intake of fermented soybean (natto) increases circulating vitamin K2 (menaquinone-7) and gamma-carboxylated osteocalcin concentration in normal individuals. *J Bone Miner Metab* 2000; 18(4):216-22.
17. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000; 15(3):515-21.
18. Yonemura K, Kimura M, Miyaji T, Hishida A. Short-term effect of vitamin K administration on prednisolone-induced loss of bone mineral density in patients with chronic glomerulonephritis. *Calcif Tissue Int* 2000; 66(2):123-8.
19. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effect of combined administration of vitamin D3 and vitamin K2 on bone mineral density of the lumbar spine in postmenopausal women with osteoporosis. *J Orthop Sci* 2000; 5(6):546-51.
20. Bunyaratavej N, Penkitti P, Kittimanon N, Boonsangsom P, Bonjongsat A, Yuno S. Efficacy and safety of Menatetrenone-4 postmenopausal Thai women. *J Med Assoc Thai* 2001; 84 Suppl 2:S553-9.
21. Miki T, Nakatsuka K, Naka H et al. Vitamin K(2) (menaquinone 4) reduces serum undercarboxylated osteocalcin level as early as 2 weeks in elderly women with established osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2003; 21(3):161-5.

