Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie
(Prof. Dr. med. W. Lehmann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Rolle von Vitamin K2 in der Osteoporose-Diagnostik – Etablierung neuer Messparameter

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Luzia Maria Ingenlath
aus
Berlin

Göttingen 2025

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuerin:	Prof. Dr. med. H. Siggelkow
Ko-Betreuer:	Prof. Dr. med. D. Saul

Prüfungskommission

Referentin:	Prof. Dr. med. H. Siggelkow
Ko-Referent*in:	Prof. Dr. med. D. Saul
Drittreferent*in:	Prof. Dr. med. D. Raddatz

Datum der mündlichen Prüfung:	12.11.2025

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel **„Die Rolle von Vitamin K2 in der Osteoporose-Diagnostik – Etablierung neuer Messparameter“** eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **IV**
Abbildungsverzeichnis ..... **VI**
Tabellenverzeichnis ..... **VII**
Abkürzungsverzeichnis ..... **VIII**
1 Einleitung **1**
1.1 Messparameter 1
1.1.1 Vitamin K 1
1.1.2 Osteocalcin 7
1.2 Präanalytik 11
1.3 Osteoporose 12
1.3.1 Definition der Osteoporose 12
1.3.2 Epidemiologie der Osteoporose 13
1.3.3 Frakturrisikofaktoren der Osteoporose 13
1.3.4 Klinische Bedeutung der Osteoporose 14
1.3.5 Diagnostik der Osteoporose 14
1.3.6 Therapie der Osteoporose 15
1.4 Ziele der Arbeit 16
2 Material und Methoden **17**
2.1 Studiendesign 17
2.2 Anzahl der Patienten und Zeitraum der Studie 17
2.3 Vorgehen bei der Datenerhebung 17
2.4 Auswertung der Daten 17
2.5 Klinische Messdaten 18
2.5.1 Basisdaten 18
2.5.2 Biometrische Daten 18
2.5.3 Zeitpunkte der Messtermine 18
2.5.4 Allgemeine und spezielle Vitamin K-Laborparameter 19
2.5.5 Medikation 20
2.5.6 Vitamin K2-Substitution 21
2.5.7 Frakturen 22
2.5.8 DXA-Messung 22
2.6 Messmethoden der Vitamin K2-relevanten Laborparameter 23
2.6.1 Allgemeine Messmethoden des Vitamin K-Status 23
2.6.2 LC-MS/MS-Bioanalyse für Vitamin K-Messung 24

2.6.3 CLIA-Bioanalyse für Osteocalcin-Messung 26
2.7 Statistische Methoden 27
3 Ergebnisse 29
3.1 Gesamtkollektiv 29
3.1.1 Datenlage für die erhobenen Parameter 30
3.1.2 Beschreibung des Gesamtkollektivs 31
3.2 „Nicht-substituiertes Verlaufskollektiv“ mit Laborwerten vom 1. und 2. Messtermin 38
3.3 „Neu-substituiertes Kollektiv“ 40
3.3.1 Biometrische Daten des „Neu-substituierten Kollektivs“ 40
3.3.2 Medikation der Patientinnen im „Neu-substituierten Kollektiv“ 40
3.3.3 Frakturen der Patientinnen im „Neu-substituierten Kollektiv“ 40
3.3.4 Laborwerte vom 1. und 2. Messtermin des „Neu-substituierten Kollektivs“ 41
3.3.5 DXA-Messungen des „Neu-substituierten Kollektivs“ 42
3.4 Einfluss spezifischer Osteoporose-Therapie auf Vitamin K2-relevante Parameter 43
3.5 Verlauf der Vitamin K2-relevanten Parameter mit und ohne Vitamin K2-Substitution 46
3.6 Korrelationen der Laborwerte des Gesamtkollektivs 47
3.7 Einflussgrößen auf die Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter 50
3.7.1 Einnahme sonstiger Medikation 50
3.7.2 Alter 51
3.7.3 BMI 51
3.8 Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit der Knochendichte 52
3.9 Zusammenhang der Vitamin K2-relevanten Parameter und Frakturen 57
4 Diskussion 59
5 Zusammenfassung 71
6 Literaturverzeichnis 73

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel prominenter Vitamin K-Derivate....1

Abbildung 2: Redoxzyklus Vitamin K am Beispiel des Osteocalcins....2

Abbildung 3: Untergruppen des Patientenkollektivs aufgeteilt in 1. und 2. Messtermin sowie mit und ohne Vitamin K2-Substitution....30

Abbildung 4: Biometrische Daten des Gesamtkollektivs....32

Abbildung 5: Allgemeine Medikation im Gesamtkollektiv....33

Abbildung 6: Spezielle Osteoporosemedikation im Gesamtkollektiv....34

Abbildung 7: Frakturen im Gesamtkollektiv....35

Abbildung 8: Höhe des Vitamin K2-MK7-Serumspiegels mit und ohne Vitamin K2-Substitution beim 1. Messtermin....37

Abbildung 9: Frakturen der Patientinnen im „Neu-substituierten Kollektiv“ (n=6)....41

Abbildung 10: Messwerte von carboxyliertem und uncarboxyliertem Osteocalcin bei Einnahme osteoporosespezifischer Medikation zum 1. MT im Gesamtkollektiv (n=100) im Vergleich....44

Abbildung 11: Höhe der Serumspiegel von Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7 bei Einnahme osteoporosespezifischer Medikation zum 1. MT im Gesamtkollektiv im Vergleich....45

Abbildung 12: Vergleich der Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter zum 1. und 2. Messtermin des „Nicht-substituierten Verlaufskollektivs“ und des „Neu-substituierten Kollektivs“....46

Abbildung 13: Streudiagramme mit linearer Regression von (A) cOsteocalcin und ucOsteocalcin (n=55), (B) cOsteocalcin und APKNO (n=70) und (C) Vitamin K1 und Vitamin K2-MK4 (n=146)....49

Abbildung 14: Streudiagramm ohne signifikanten linearen Zusammenhang von nichtcarboxyliertem Osteocalcin und Vitamin K2-MK7 (n=30)....49

Abbildung 15: Höhe der Vitamin K2-MK4-Spiegel mit und ohne Einnahme von PPI im Vergleich....50

Abbildung 16: Streudiagramm mit linearer Regression von Vitamin K1 und dem Alter der Patienten....51

Abbildung 17: Streudiagramm mit linearer Regression von Vitamin K2-MK7 und dem BMI....52

Abbildung 18: Quartilevergleich von Vitamin K1 und Höhe des Z-Score des gesamten linken Femurs zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100)....55

Abbildung 19: Vergleich der Einnahme osteoporosespezifischer Therapie und Höhe des Z-Scores des rechten Femurhalses zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100)....56

Abbildung 20: cOsteocalcin-Spiegel bei Patienten mit und ohne Fraktur zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100)....57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basisdiagnostik Osteoporose (DVO 2023) 15
Tabelle 2: Laboruntersuchungen bei Osteoporose 19
Tabelle 3: Normwerte der verwendeten Laborparameter 20
Tabelle 4: Medikation der Patienten im Gesamtkollektiv 21
Tabelle 5: Bestimmungsmethode Vitamin K1 25
Tabelle 6: Bestimmungsmethode Vitamin K2 26
Tabelle 7: Datenlage der analysierten Parameter und dazugehörige Anzahl der Patienten (n) 30
Tabelle 8: Biometrische Daten des Gesamtkollektivs 31
Tabelle 9: Laborwerte vom 1. Messtermin im Gesamtkollektiv 35
Tabelle 10: Knochendichtemessungen des Gesamtkollektivs 38
Tabelle 11: Laborwerte vom 1. und 2. MT des „Nicht-substituierten Verlaufskollektivs“ 39
Tabelle 12: Biometrische Daten des „Neu-substituierten Kollektivs“ 40
Tabelle 13: Laborwerte vom 1. und 2. MT des „Neu-substituierten Kollektivs“ 42
Tabelle 14: Knochendichtemessungen des „Neu-substituierten Kollektivs“ 43
Tabelle 15: Gruppenvergleich bei spezieller Osteoporose-Therapie für carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin 44
Tabelle 16: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter und der alkalischen Knochenphosphatase 48
Tabelle 17: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit dem BMI 51
Tabelle 18: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit den T-Scores der DXA im Gesamtkollektiv 53
Tabelle 19: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit den Z-Scores der DXA und dem TBS im Gesamtkollektiv 53
Tabelle 20: Lineare Regression der signifikanten Ergebnisse für die Vitamin K2-relevanten Parameter mit den Z-Scores 54
Tabelle 21: Quartile von VK1, VK2-MK7, cOC, ucOC und APKNO im Gesamtkollektiv 54

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
AP	alkalische Phosphatase
APKNO	alkalische Knochenphoshatase
Bglap	*bone gamma-carboxyglutamate protein*
BMD	*bone mineral density*
BMI	*body mass index*
cOC	carboxyliertes Osteocalcin
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
DXA	*Dual Energy X-ray Absorptiometry*
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GGCX	Gamma-Glutamyl-Carboxylasen
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
Gla-	Gamma-Carboxyglutamat-Rest
Glu-	Glutamat-Rest
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HbA1c	Hämoglobin-A1c
HDL	High-Density Lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HWZ	Halbwertszeit
korr.	korrigiert
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LDL	Low-Density Lipoprotein
LWS	Lendenwirbelsäule
MGP	*matrix gla protein*
MK	Menachinon-Unterform
MRM	*multipe reaction monitoring*
MT	Messtermin
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
NOAK	neue orale Antikoagulatien

OC	Osteocalcin
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RKI	Robert Koch-Institut
TBS	*trabecular bone score*
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
ucOC	uncarboxyliertes Osteocalcin
VK	Vitamin K
VKD	Vitamin K abhängige (Proteine)
WHO	World Health Organization
WS	Wirbelsäule

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Studie soll die Rolle von Vitamin K2 in der Osteoporose-Diagnostik dargestellt und analysiert werden. Dafür werden zunächst die untersuchten Messparameter, dann die Präanalytik und die Osteoporose als Erkrankungsbild beschrieben. Schließlich werden die Ziele der der Arbeit vorgestellt.

1.1 Messparameter

Bei den untersuchten Vitamin K2-relevanten Parametern handelt es sich um Vitamin K1, Vitamin K2 (mit den Unterformen Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7) sowie carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin.

1.1.1 Vitamin K

Vitamin K ist keine einheitliche Substanz, sondern eine Gruppe eng verwandter Verbindungen, wobei die einzelnen Substanzen „Menadion“ als gemeinsamen Grundkörper haben, sich aber anhand ihrer Seitenketten unterscheiden (Shearer 1995). Vitamin K gehört zusammen mit den Vitaminen A, D und E zu den fettlöslichen Vitaminen. Die bekanntesten Vertreter sind Vitamin K1 (Phyllochinon, andere Schreibweise *Phylloquinon*) und verschiedene Derivate von Vitamin K2 (Menachinon, andere Schreibweise *Menaquinon*), siehe Abbildung 1.

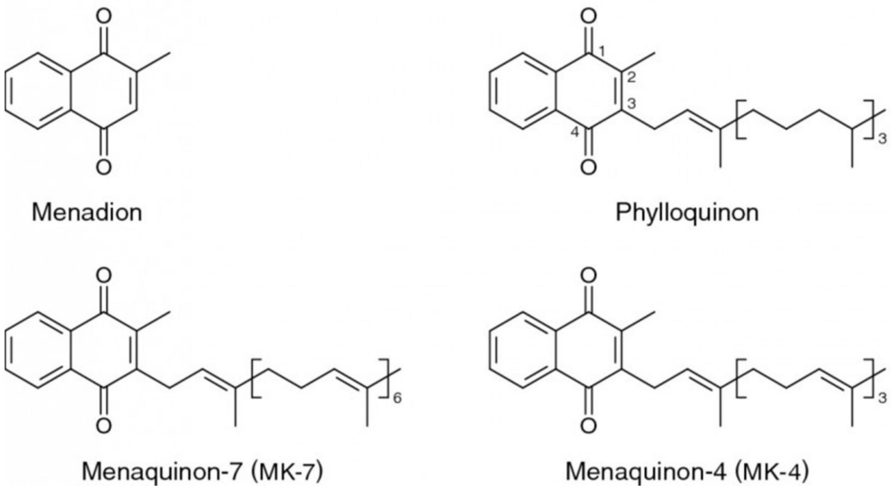

Abbildung 1: Strukturformel prominenter Vitamin K-Derivate.

1.1.1.1 Physiologie und Funktion von Vitamin K

Vitamin K dient im menschlichen Körper als essenzieller Co-Faktor von Gamma-Glutamyl-Carboxylasen (GGCX) bei der Gamma-Carboxylierung verschiedener Proteine, wodurch die Proteine aktiviert werden (Uotila und Suttie 1982; Vermeer 1990).

Bei dem bei der Gamma-Carboxylierung stattfindende Redoxzyklus, dargestellt in Abbildung 2, spendet das reduzierte Vitamin K (Hydrochinon) in Gegenwart von CO2 (Kohlenstoffdioxid) ein Elektronenpaar an die GGCX, um das Zielprotein zu carboxylieren. Das resultierende oxidierte Vitamin K wird durch die Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKOR) wieder reduziert (Vermeer 1990). Dieses Recycling, das im ER (endoplasmatischen Retikulum) stattfindet, bewahrt die biologische Aktivität des Vitamin K, da nur sehr wenig im Körper gespeichert wird (Oldenburg et al. 2008). Vitamin K-Antagonisten wie Phenprocoumon oder Warfarin hemmen die Regeneration des in der Reaktion verbrauchten Vitamin K und führen so zu einem funktionellen Vitamin K-Mangel (Booth et al. 2013; Theuwissen et al. 2014; Marles et al. 2017). Es wurde gezeigt, dass Vitamin K2-MK7 fast dreimal stärker als Vitamin K1 der Wirkung von Vitamin K-Antagonisten entgegenwirkt und somit das Risiko für pharmakodynamische Interaktionen mit Vitamin K-Antagonisten bei K2-MK7 deutlich höher als bei K1 ist (Schurgers et al. 2006). Zusätzlich hat Vitamin K2 im Vergleich zu Vitamin K1 eine höhere Affinität zur GGCX und ist somit der bevorzugte Cofaktor für die Carboxylierung (Buitenhuis et al. 1990).

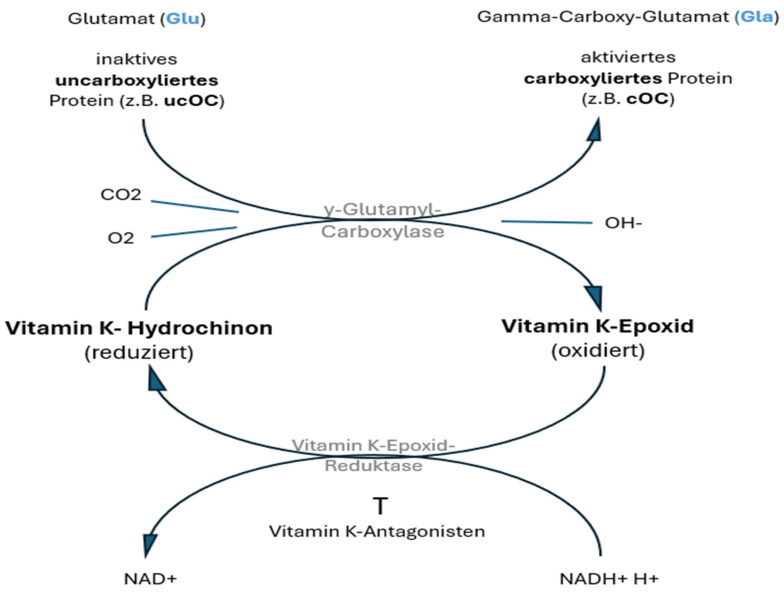

Abbildung 2: Redoxzyklus Vitamin K am Beispiel des Osteocalcins. Geändert nach (Kneiseler et al. 2012; Gröber und Kisters 2015).

Die Vitamin K-abhängigen Proteine (VKD-Proteine), die mit Hilfe der GGCX carboxyliert werden, haben eine 45-Aminosäuren umfassende Gla-Domäne (Gamma-Carboxyglutamat-Rest) gemein, weshalb sie als Gla-Proteine bezeichnet werden (Suttie 1980). Diese Domäne wird von einem anfänglich vorliegenden Glutamat-Rest (Glu) während der Carboxylierung in einen Gla-Reste umgewandelt. Das Vorhandensein mehrerer Gla-Reste in einem Protein ermöglicht es den Gla-Proteinen, eine kalziumabhängige Konformation anzunehmen, die die Bindung an eine Membranoberfläche oder die Bindung an Kalzium im Hydroxylapatit ermöglicht (Price et al. 1976; Wen et al. 2018).

Die Forschung über die Funktion und Anzahl der VKD-Proteine schreitet kontinuierlich voran. Wo 2004 von Berkner und Runge 14 bis dahin bekannte Proteine präsentiert wurden, sind die heute bekannten 17 VKD-Proteine in einer aktuelleren Übersichtsarbeit von Simes anschaulich dargestellt. Hierbei wurden sie anhand ihres Syntheseortes in zwei Gruppen eingeteilt, die hepatischen und die extrahepatischen Proteine. Zur Gruppe der hepatischen VKD-Proteine gehören die gerinnungsfördernden Faktoren II, VII, IX, X und das Protein S, das zusätzlich antiinflammatorisch und am Knochenstoffwechsel beteiligt ist. Ebenfalls dazugehörig sind das gerinnungshemmende Protein C, welches ergänzend antiapoptotisch wirkt, sowie das antikoagulatorische Protein Z. Die Gruppe der extrahepatischen VKD-Proteine ist inhomogen. Es zählen das Knochenprotein Osteocalcin und der Inhibitor der Gefäßkalzifizierung und Angiogenesemodulator MGP (*matrix gla protein*), aber auch das zell-zyklusstimmulierende Protein Gas6 (*growth arrest specific protein 6*), das Gefäßverkalkungs-hemmende und antiinflammatorische GRP (*gla-rich protein*), das Zell-Matrix-Interaktionen- und Angiogenese-regulierende Periostin in den Isoformen 1 – 4 und dessen Subtyp PLF (*periostin-like-factor*) sowie vier Membranproteine namens PRGP1/2 (*prolin-rich gla protein*) und TMG3/4 (*transmembrane gla protein*) dazu, welche für die Signaltransduktion essentiell sind (Berkner und Runge 2004; Simes et al. 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit steht vor allem die Funktion der VKD-Proteine für den Knochen-stoffwechsel im Vordergrund, die bereits 1985 von Price und Williamson beobachtet wurden (Price und Williamson 1985). Die bis heute verstandenen Wirkmechanismen von Vitamin K auf den Knochenstoffwechsel werden in diversen Übersichtsarbeiten dargestellt. Dabei reicht die Funktion von Vitamin K unter anderem von der Stimulation der Osteoblasten-Differenzierung und Erhöhung des Niveaus einiger Knochenaufbaumarker (z. B. alkalische Phosphatase) bis zu der Verhinderung der Knochenresorption durch seine antikatabolen Aktivitäten, die Verringerung der Osteoklasten-Differenzierung und die Hemmung der Osteoblasten-Apoptose (Akbari und

Rasouli-Ghahroudi 2018; Stock und Schett 2021).

Während carboxyliertes Osteocalcin den Einbau von Calcium in die Knochenmatrix fördert und damit den Knochenstoffwechsel unterstützt, wirkt das Vitamin-K-abhängige carboxylierte MGP der Gefäßkalzifizierung sowie altersbedingten Verschleißerscheinungen der Arterien entgegen und schützt die Blutgefäße vor einer Calcium-Überladung (Farzaneh-Far et al. 2000; Vermeer et al. 2005). Somit wirkt es präventiv gegen Arteriosklerose und koronare Herzkrankheit (Geleijnse et al. 2004). Auch an der Regulation des Calciumgehalts im Gewebe (Booth 2009), Zellzyklusregulation über Stimulation des Cyklin D1 und Zellproliferation (Kushner et al. 2005; Tsujioka et al. 2006) sowie der Entzündungsreaktion (Schett et al. 2006; Shea et al. 2008) ist Vitamin K beteiligt. Zudem konnte in Studien ein beim Menschen bestehender Zusammenhang zwischen niedrigen K1-Spiegeln und Morbus Alzheimer und einer beeinträchtigten Gedächtnisleistung gezeigt werden (Presse et al. 2008).

In verschiedenen, vorrangig japanischen Studien und Metaanalysen, konnte gezeigt werden, dass eine hohe Zufuhr von Vitamin K2 den Serum-Spiegel des uncarboxylierten Osteocalcins signifikant senkt, die Knochendichte der LWS (Lendenwirbelsäule) geringfügig erhöht und die Inzidenz von Frakturen (hauptsächlich von Wirbelbrüchen) reduziert werden kann (Shiraki et al. 2000; Miki et al. 2003; Iwamoto 2014; Hu et al. 2021; Ma et al. 2022; Zhou et al. 2022). Zhou et al. beschrieben unter Vitamin K2-Substitution teilweise unerwünschte gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Bauchschmerzen, welche jedoch nicht schwerwiegend waren (Zhou et al. 2022). In einer Metaanalyse von Su et al. wurden 18 Studien zur Frakturrate identifiziert, jedoch konnte bei widersprüchlichen Ergebnissen eine signifikante Fraktursenkung nicht nachgewiesen werden (Su et al. 2019). Zum Zusammenhang der Veränderung der Knochendichte unter Vitamin K2-Substitution zeigten Rønn et al., dass bei postmenopausalen Frauen mit Osteopenie keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die BMD *(bone mineral density)* messbar waren, unabhängig davon, ob die Patientinnen täglich über drei Jahre Vitamin K2-MK7 oder Placebo erhielten (Rønn et al. 2021). Eine Metaanalyse von Salma et al. aus dem Jahr 2022 beschreibt, dass sich die femorale BMD nicht signifikant unter Substitution von Vitamin K verbessert (95% CI, $p = 0{,}08$), die Odds Ratio (OR) für Frakturen unter Vitamin K-Substitution im Vergleich zur Kontrollgruppe aber niedriger war (Salma et al. 2022).

1.1.1.2 Verteilung von Vitamin K

Nach der Triage-Theorie wird Vitamin K bei suboptimaler Versorgung bevorzugt an die Leber abgegeben, um die für das kurzfristige Überleben wichtigen Proteine der Gerinnung zu carboxylieren. Erst wenn der Bedarf der Leber gedeckt ist, wirkt Vitamin K auch extrahepatisch. Dementsprechend zeigt sich ein Vitamin K-Mangel zunächst extrahepatisch und ist bei langfristiger Unterversorgung mit Erkrankungen wie Osteoporose, kardiovaskulären Erkrankungen, chronischer Nierenerkrankung, rheumatoider Arthritis und Krebs assoziiert (McCann und Ames 2009; Halder et al. 2019; Simes et al. 2020).
Beide Formen, sowohl K1 als auch K2, tragen zum Vitamin K-Status im Gewebe bei und werden dann im Zielgewebe oxidiert beziehungsweise reduziert. Dafür werden alle Vitamin K-Unterformen von intestinalen Enterozyten des Dünndarms aufgenommen und von Lymphkapillaren über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf abgegeben (Shearer et al. 2012). Über Lipoproteine erfolgt der Serumtransport dieser lipophilen Verbindungen zu ihren Zielgeweben. Dabei akkumuliert Vitamin K1 bevorzugt in der Leber, während Vitamin K2 ein weiter verbreitetes Verteilungsmuster aufweist. Grund dafür ist die Assoziation mit verschiedenen Lipoproteinpartikeln. Vitamin K1 wird vorwiegend von der tricylglyceridreichen Lipoproteinfraktion (TGRLP) gebunden und zur Leber, Vitamin K2 v.a. von Low-Density Lipoprotein (LDL) und High-Density Lipoprotein (HDL) in diverse Gewebe transportiert. Dies könnte möglicherweise eine Erklärung für das unterschiedliche Verteilungsprofil von Vitamin K2 sein und deutet auf einen relativ großen Einfluss des Vitamin K2 auf den extrahepatischen Vitamin K-Status hin (Schurgers und Vermeer 2002; Shearer und Newman 2008a). In einer japanischen Studie von 2008 wurde gezeigt, wie Vitamin K1 während der intestinalen Absorption zu einem Zwischenprodukt modifiziert, über ein bisher unbekanntes Transportsystem zu peripheren Geweben transportiert und dort in Vitamin K2-MK4 umgewandelt wird (Okano et al. 2008).

1.1.1.3 Unterscheidung verschiedener Vitamin K-Derivate

Trotz ähnlicher Struktur unterscheiden sich die natürlichen Vitamin K-Formen beispielsweise in Bezug auf ihre Pharmakokinetik und Speicherung. Die langkettigen Menachinone, einschließlich MK7, sind hydrophober und haben längere Halbwertszeiten (HWZ). MK7 scheint die am besten absorbierte Form von Vitamin K zu sein (Schurgers und Vermeer 2000). Obwohl K1 der Haupttyp (>90%) von Vitamin K in der Nahrung ist, wird es im Organismus nur schlecht gespeichert (Simes et al. 2020).
Vitamin K1 (Phyllochinon) ist eine Verbindung, die in allen photosynthetischen Pflanzen

vorkommt. Pflanzen, welche hohe Konzentration an Chlorophyll und damit eine dunklere Blattfarbe aufweisen, haben auch höhere Konzentrationen an Vitamin K1 (Booth et al. 1994). Phyllochinon wird vor allem über die Nahrung aufgenommen und hat vorrangig einen Einfluss auf die Blutgerinnung (Furie und Furie 1988; Vermeer 1990).
Vitamin K2 wird zum großen Teil von Darmbakterien produziert, entsteht jedoch auch bei der Fermentation von Lebensmitteln beispielsweise bei Käse und Sauerkraut (Shearer 1995; Schurgers und Vermeer 2002). Vitamin K2 liegt in verschiedenen Varianten vor. Diese werden nach der Anzahl der Isoprenoid-Einheiten der Seitenkette als MK4 bis MK13 (am besten untersucht MK4 und MK7) bezeichnet und unterscheiden sich u.a. in ihrer Pharmakokinetik. Vitamin K2 ist vor allem an der Carboxylierung von Osteocalcin und der Regulierung der extrazellulären Matrixmineralisation von MGP beteiligt (Vermeer et al. 2005)

1.1.1.4 Pharmakokinetik der Vitamin K-Derivate

Schurgers et al. beschrieben 2006 die unterschiedliche Pharmakokinetik von Vitamin K1 im Vergleich zu Vitamin K2-MK7. Unter Substitution der gemeinsam verabreichten Vitamin K-Varianten in ansteigenden Dosen zwischen 0 und 500 µg wurde die Kinetik beobachtet. Die Serumkonzentration sowohl von Vitamin K1 als auch von K2-MK7 erreichte hier etwa vier Stunden nach der Einnahme der Vitamin K-Substitution seinen Höhepunkt (Schurgers et al. 2006), laut Sato et al. sei der Höhepunkt von Vitamin K2 sechs Stunden nach Einnahme messbar (Sato et al. 2012). Darauf folgt ein steiler Abfall der Serumkonzentrationen und dann eine zweite Phase nach 8 – 96 Stunden, in der K1 auf den Ausgangswert zurückgeht, MK7 jedoch bis zu vier Tage oder länger stabil bleibt. Daraus lassen sich die unterschiedlichen Halbwertzeiten der beiden Derivate schließen, welche bei MK7 (68 Stunden) deutlich länger ist, als bei Vitamin K1 (1 – 2 Stunden) (Sato et al. 2012). Zudem akkumuliert MK7 während der ersten zwei Wochen, bis ein Plateau-Niveau von etwa 6 µg/l erreicht ist. Sowohl Vitamin K1 als auch Vitamin K2 zeigten nach drei Tagen einen statistisch signifikanten Anstieg der Osteocalcin-Carboxylierung, aber nur bei MK7 stieg das Verhältnis von zirkulierendem carboxyliertem Osteocalcin zu uncarboxyliertem Osteocalcin weiter an (Sato et al. 2020) .
Bei vergleichbarer Zufuhr ist der Endspiegel von MK7 7 – 8 mal höher als der von K1, was darauf hindeutet, dass eine tägliche Einnahme von 25 µg/Tag MK7 wirksamer ist als jene von 100 µg/Tag Vitamin K1 (Schurgers et al. 2006).
Bei den Menachinonen hat MK4 im Vergleich zu MK7 eine schlechtere Bioverfügbarkeit

und eine geringere HWZ, weshalb für die tägliche Substitution MK7 bevorzugt wird. Den maximalen Serumspiegel erreicht MK7 je nach Studie vier bis sechs Stunden nach Einnahme. Bei MK4 zeigt sich nach dessen Einnahme keine erhöhte Serumkonzentration und der maximale Serumspiegel ist zeitlich nicht eindeutig festzulegen (Schurgers und Vermeer 2002; Sato et al. 2012).

1.1.1.5 Dosierung der Vitamin K-Derivate

Eine genaue Dosierung der Vitamin K-Substitution ist nicht einheitlich definiert. Die European Food Safety Authority legt eine adäquate Zufuhr von Vitamin K1 für Erwachsene mit 70 µg täglich fest. In Großbritannien wird die tägliche Aufnahme von Vitamin K1 nur aus Nahrungsquellen auf etwa 36 – 43 µg geschätzt (EFSA 2008). Die deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt eine tägliche Vitamin K-Aufnahme von 60 – 80 µg (DGE 2021) .Das *US-Pharmacopeial Convention Safety Evaluation of Menaquinone-7* hält eine Vitamin K2-Zufuhr von 120 µg täglich für erwachsene Männer und von 90 µg täglich für erwachsene Frauen für angemessen. Da selbst Dosierungen von 2000 mg/kg Körpergewicht für 30 Tage nicht toxisch waren, scheint die Vitamin K-Substitution bei Erwachsenen sicher zu sein. In den USA werden Präparate zwischen 50 und 600 µg Vitamin K2 vermarktet.

1.1.2 Osteocalcin

1.1.2.1 Einordnung

Osteocalcin (OC, auch bekannt als BGP [*bone gla protein*]) ist das wichtigste nicht-kollagene Hydroxylapatit-bindende Protein, das von Osteoblasten gebildet wird (Brown et al. 1984; Hauschka et al. 1989). Der Name Osteocalcin leitet sich von der Calcium-Affinität (Hauschka und Carr 1982) und der Häufigkeit dieses Proteins im Knochengewebe (Hauschka et al. 1989) ab. Es fördert die Mineralisation im Knochen und hemmt dessen Abbau. Insgesamt stellt es mit ca. 25% einen beträchtlichen Anteil der nicht kollagenen EZM (extrazellulären Matrix) im Knochen dar. Es hat sich gezeigt, dass zirkulierendes Osteocalcin ein empfindlicher Indikator für den Knochenumsatz bei Patienten mit verschiedenen metabolischen Knochenerkrankungen ist (Brown et al. 1984).

In den 1970er Jahren wurde Osteocalcin erstmals aus Tierknochen extrahiert und als Calcium-bindend und 3 γ-Gla-Reste enthaltend beschrieben (Hauschka et al. 1975; Nelsestuen et al. 1975; Price et al. 1976). Osteocalcin enthält 49 Aminosäurereste, wobei

sich die zu carboxylierenden Gla-Aminosäurereste an den Positionen 21, 24 und 27 befinden. OC wird als Präpromolekül synthetisiert und in den allgemeinen Kreislauf sezerniert (Hauschka et al. 1989; Price 1989). Die Synthese und Carboxylierung von Osteocalcin wird von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D reguliert (Price 1988).

1.1.2.2 Physiologie von Osteocalcin

Osteocalcin kann in carboxylierter („cOsteocalcin") oder in nicht-/ uncarboxylierter („ucOsteocalcin") Form vorliegen (Calvo et al. 1996). Durch die Carboxylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, die den α-helicalen Teil des Proteins stabilisiert und eine größere Affinität für Calcium und Hydroxylapatit verleiht (Hauschka und Carr 1982). Wenn Osteocalcin unter Beteiligung von Vitamin K2 vollständig carboxyliert ist (alle 3 Glutamylreste, abgekürzt als cOC oder Gla-OC), wird es in den Blutkreislauf abgegeben oder mit Calcium in die extrazelluläre Matrix des Knochens eingelagert (Price und Baukol 1980). Damit fungiert Osteocalcin als Marker des Knochenzellstoffwechsels (Calvo et al. 1996). Aufgrund von Decarboxylierung oder geringer Aktivität von GGCX liegt ein Teil des Osteocalcins in unter-/bzw. uncarboxylierter Form vor (bis zu zwei Glutamylreste, genannt uncarboxyliertes OC, abgekürzt als ucOC oder Glu-OC) (Lee et al. 2000). Uncarboxyliertes Osteocalcin kann nicht an den Knochen binden, was zu einem Austritt ins Blut führt (Price und Nishimoto 1980). Das Vorliegen von zu hohen Konzentrationen von uncarboxyliertem Osteocalcin kann bei Vitamin K-Mangel im Serum nachgewiesen werden. Jedoch liegt Osteocalcin auch bei ausreichendem oder erhöhtem Vitamin K-Spiegel nie vollständig carboxyliert vor (Calvo et al. 1996). Carboxyliertes Osteocalcin fördert durch den Einbau von Calcium in den Knochen dessen Mineralisation, damit die Festigkeit.

1.1.2.3 Fluktuation der Osteocalcin-Messwerte

Der Osteocalcin-Spiegel folgt einer zirkadianen Rhythmik mit seinem Höhepunkt in den frühen Morgenstunden und dem Tiefpunkt zur Mittagszeit (Gundberg et al. 1985) sowie einem Rhythmus während der Schwangerschaft, bei der der Osteocalcinspiegel während des ersten und zweiten Trimesters sinkt, aber kurz vor der Entbindung auf Normalwerte zurück geht (Cole et al. 1987). Während des Menstruationszyklus zeigen sich keine OC-Schwankungen (Tarallo et al. 1990). Das Serum-Osteocalcin ist bei Kindern höher als bei Erwachsenen, mit Spitzenwerten in der Pubertät (Cole et al. 1985; Delmas et al. 1987). Bei Erwachsenen sind die Osteocalcin-Werte stabil, beginnen aber bei Männern nach dem 60.

Lebensjahr linear anzusteigen. Bei Frauen ist ein exponentieller Anstieg während der Menopause sichtbar, der mit einem Anstieg der Knochenumsatzrate korreliert (del Pino et al. 1991). Bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose sind die Serumspiegel von Osteocalcin normal, niedrig oder hoch (Price et al. 1980; Brown et al. 1984). Diese unterschiedliche Reaktion wurde auf die Variabilität der Knochenbildungsrate bei der Osteoporose zurückgeführt (Calvo et al. 1996). Bereits in den 1980er Jahren wurden Studien zu Osteocalcin und Vitamin K bei Frauen mit Osteoporose durchgeführt. Dort wurde gezeigt, dass uncarboxyliertes Osteocalcin bei postmenopausalen Frauen höher als bei prämenopausalen Frauen war. Wenn den postmenopausalen Frauen Vitamin K-Supplemente verabreicht wurden, konnten normale Carboxylierungsraten wiederhergestellt werden (Knapen et al. 1989).

1.1.2.4 Skeletale und extraskeletale Wirkungen von Osteocalcin

Im Blutkreislauf ist Osteocalcin sowohl in der carboxylierten als auch in der uncarboxylierten Form nachweisbar. Welche Rolle Osteocalcin im Körper spielt und wie vielseitig es wirken kann, ist schon lange Gegenstand früherer und aktueller Forschung.
1996 zeigten Ducy und Karsenty erstmalig an Osteocalcin-defizienten (OC-/-) Mäusen, dass dessen Phänotypen durch eine höhere Knochenmasse und Knochen von verbesserter funktioneller Qualität gekennzeichnet ist. Die Mäuse zeigten eine Zunahme der trabekulären und kortikalen Knochenmasse durch die verstärkte Knochenbildung, ohne die Knochenresorption zu beeinträchtigen (Ducy et al. 1996). Bei Bailey et al. zeigte sich kein Unterschied in der kortikalen Dicke zwischen Wildtyp und den OC-defizienten Mäusen (Bailey et al. 2017). In einer weiteren Studie wurde eine OC-defiziente Ratte erzeugt, bei der die trabekuläre, aber nicht die kortikale Knochenmasse größer war als die bei Wildtyp-Ratten, gegensätzlich zu den vorherigen Studien (Lambert et al. 2016). Außerdem schien Osteocalcin im Studiendesign von Ducy und Karsenty als Hormon zur Regulierung des Glukosestoffwechsels, der Testosteronsynthese und der Muskelmasse zu wirken. Zusätzlich zeigten die Mäuse dort Fettleibigkeit, die hinweisend für die direkte Verbindung zwischen dem Skelett und dem Energiestoffwechsel sein sollte (Ducy et al. 1996).
Jüngere Forschungsarbeiten haben die Theorie, dass der Knochen als ein endokrines Organ fungiert, weiter untersucht. In einer Studie von 2007 von Lee et al. konnte erstmals gezeigt werden, dass nur die ucOC-Form eine hormonelle Funktion bei der Regulation der Glukosehomöostase und des Energiestoffwechsels hat, indem es die Insulin- und Adiponektin-Expression in den β-Zellen bzw. Adipozyten erhöht. Somit scheint ucOC die

Glukosetoleranz zu verbessern (Lee et al. 2007; Ferron et al. 2008). Gleichzeitig soll es die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und die Kognition durch Modulation der Neurotransmittersynthese beeinflussen (Oury et al. 2013). Zudem scheint Osteocalcin als Regulator der männlichen Fruchtbarkeit zu wirken, was zu kleineren Fortpflanzungsorganen und niedrigerem zirkulierendem Testosteron in den OC-defizienten Mäusen führt (Oury et al. 2011). Auch die Aufrechterhaltung der Muskelmasse bei Alterung wurde bei Mäusen dem uncarboxylierten Osteocalcin als weitere Funktion zugeschrieben (Mera et al. 2016). Bei Studien mit OC-defizienten Ratten (Verlust der carboxylierten und uncarboxylierten Osteocalcin-Form) zeigten sich jedoch keine erhöhten Glukosespiegel, keine Fettleibigkeit, keine Insulinresistenz oder verminderte männliche Fertilität (Lambert et al. 2016). Diese Daten stehen im Gegensatz zu der Rolle von OC im Knochen, bei dem die carboxylierte Form von Osteocalcin dem Protein Funktionalität verleiht (Booth 2009). Dass nur die uncarboxylierte OC-Form die Glukosehomöostase reguliert, würde bedeuten, dass eine hohe Zufuhr von Vitamin K für die Glukosehomöostase nachteilig wäre (Booth 2009). Hierzu sind jedoch in der Literatur keine Daten vorliegend und es zeigt die Notwendigkeit weiterer Forschung. 2020 veröffentlichte PLOS-Genetics zwei Arbeiten, die sich mit der Rolle von Osteocalcin anhand von OC-Knockout-Mausmodellen beschäftigt haben.

In der Studie von Moriishi et al. von 2020 kamen die Autoren zu folgendem Ergebnis: An den OC-defizienten Mäuse zeigte sich, dass Osteocalcin nicht für die Knochenbildung erforderlich, jedoch für eine optimale Knochenqualität und -festigkeit unerlässlich ist. Die Ausrichtung der Apatit-Kristalle, die sich normalerweise parallel zu den Kollagenfasern verhält, ist bei den defizienten Mäusen gestört, was zu einer desorganisierten Mineralisierung und reduzierten Knochenfestigkeit führt. Die Kollagenfasern an sich sind jedoch bei den Knockout-Mäusen normal ausgerichtet. Außerdem kamen die Wissenschaftler zu dem Ergebnis, dass der Glukosestoffwechsel, die Testosteronsynthese und die Muskelmasse in den OC-defizienten Mäusen normal waren. Im Gegensatz zu früheren Behauptungen konnte nicht gezeigt werden, dass OC als Hormon zur Steuerung des Glukosestoffwechsels, der Testosteronsynthese und der Muskelmasse wirkt (Moriishi et al. 2020).

Auch bei der Forschergruppe von Diegel et al. kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Die hier untersuchten OC-defizienten Knockout-Mäuse, die durch *CRISPR/Cas9*-vermitteltes Gen-Editing erzeugt wurden, hatten eine signifikant höhere Kollagenreife und ein erhöhtes Karbonat/Mineral-Verhältnis, was darauf hindeutet, dass Osteocalcin an der

Mineralreifung und dem Knochenumbau beteiligt ist. Die Knockout-Mäuse wiesen kein zirkulierendes Osteocalcin auf, hatten aber eine normale Knochenmasse sowie normale Blutglukosespiegel und eine normale männliche Fruchtbarkeit (Diegel et al. 2020).
Dass diese Widersprüche bei Studien von Osteocalcin aufgetaucht sind, ist interessant und zeigt die Komplexität des Status von Osteocalcin. Erstens hat Osteocalcin unterschiedliche Grade der Carboxylierung. Es gibt drei Glutaminreste und ihr Carboxylierungsstatus kann unterschiedliche physiologische Funktionen haben. Zudem haben die meisten früheren Studien nicht zwischen den Formen von OC unterschieden. Zusätzlich gibt es erhebliche Unterschiede zwischen dem Maus- und dem menschlichen Osteocalcin-Genlokus. Menschen, ebenso wie Ratten, haben ein einziges OC-Gen, während es bei Mäusen zwei benachbarte OC-Gene gibt, Bglap (*bone gamma-carboxyglutamate protein*) und Bglap2 (Ducy et al. 1996; Lambert et al. 2016). Dies erschwert die Interpretation der Ergebnisse aus dem Osteocalcin-defizienten Mausmodell und wirft die Möglichkeit auf, dass die Daten aus dem Mausmodell nicht für menschliche Erkrankungen anwendbar sind (Booth et al. 2013). Bis heute spielen genetische Studien beim Menschen keine Rolle für die Physiologie des Osteocalcins (Diegel et al. 2020).

1.2 Präanalytik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vitamin K1 und K2 mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode bestimmt, die sich aus Flüssigchromatographie (LC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) zusammensetzt. Dieses Verfahren, welches für die Vitamin K2-Messung von *amedes MVZ wagnerstibbe* verifiziert und neu etabliert wurde, wird im Materialteil dieser Dissertation detaillierter beschrieben.
Für die Analyse der Vitamin K2- relevanten Laborparameter wurde zunächst eine Nüchtern-Blutentnahme im Endokrinologikum Göttingen durchgeführt, das eingefrorene Serum wurde anschließend im Labor von *amedes MVZ wagnerstibbe* Göttingen innerhalb von ein bis drei Tagen analysiert. Die Normwerte, mit denen das Labor *amedes MVZ wagnerstibbe* arbeitet, wurden vom *MVZ Labor Dr. Limbach Heidelberg* übernommen, wo der Referenzbereich inhouse ermittelt wurde. Schon präanalytisch zeigt die Vitamin K2-Messung Schwierigkeiten. Vitamin K2 ist ein sehr instabiles Molekül, weshalb es bereits am Ort der Blutentnahme zentrifugiert und eingefroren werden muss, um dann ins Labor übermittelt zu werden (Suhara et al. 2005; Tsugawa et al. 2006). Auch starke Spiegelschwankungen und unterschiedlich lange Halbwertzeiten der Vitamin K2-

Unterformen (1h bei MK4 und 72h bei MK7) machen die Diagnostik komplex. Zusätzlich geht Vitamin K2 als fettlösliches Vitamin schnell ins Gewebe, wodurch der Blutspiegel nur die tagesaktuelle Zufuhr und nicht den Gewebespeicher erfassen kann (Shearer und Newman 2008a). Gegensätzlich dazu wird uncarboxyliertes Osteocalcin als stabiler Biomarker für die Vitamin K2-Versorgung des Gewebes beschrieben. Denn häufig ist bei Mangelzuständen ein erhöhtes ucOC messbar, während Vitamin K2 im Blut nicht sichtbar erniedrigt ist. Somit spiegelt ucOC die Vitamin K2-Versorgung des Organismus mit den aktuellen Messmethoden besser wider als die eigentliche Vitamin K2-Messung (Calvo et al. 1996; Shea und Booth 2016; Palermo et al. 2017). Zudem ist der Biomarker ucOC in Vollblut oder Serum bis 48h bei Raumtemperatur stabil und somit präanalytisch leichter in der Handhabung (Lombardi et al. 2012).

1.3 Osteoporose

Bei dem Patientenkollektiv, welches für dieses Forschungsprojekt verwendet wurde, handelt es sich um Patienten mit Osteoporose aus dem Endokrinologikum in Göttingen. Deshalb wird folgend die Osteoporose als Erkrankung beschrieben und eingeordnet.

1.3.1 Definition der Osteoporose

Osteoporose ist eine Erkrankung, die durch eine Verringerung der Menge des Knochengewebes und der Verschlechterung der Knochenmikrostruktur charakterisiert ist, was zu einem allgemeinen Verlust der Knochenfestigkeit und einem höheren Frakturrisiko führt (Consensus Development Conference 1993).

Nach der Definition der WHO aus dem Jahr 1994 liegt eine Osteoporose dann vor, wenn der Knochenmineralgehalt in der Knochendichtemessung mittels DXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry)* an der Lendenwirbelsäule und/oder am proximalen Femur (Gesamtareal oder Schenkelhals) um < –2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert einer jungen 20 – 29-jährigen Frau abweicht. Diese Standardabweichung wird als T-Score bezeichnet. Die Definition gilt auch für Männer ab dem 50. Lebensjahr (WHO 2007). Sind bereits Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, liegt eine manifeste Osteoporose vor (DVO 2014).

Anhand der Ätiologie kann man die Osteoporose in eine primäre und sekundäre Form unter-teilen. Die primäre Form hat eine bekannte Ursache und macht ca. 90% aller Osteoporosen aus. Sie wird unterteilt in die postmenopausale Osteoporose (Typ I), die

senile Osteoporose (Typ II) und in eine idiopathische juvenile Form. Sekundäre Osteoporosen können bei endokrinen und metabolischen Erkrankungen sowie durch medikamentöse oder iatrogene Auslöser entstehen. Eine weitere Unterteilung der Osteoporose kann nach dem Knochenstoffwechsel getroffen werden. So gibt es die high-turnover-Osteoporose mit hoher Knochenabbaurate, und die low-turnover-Osteoporose mit einem geringen Knochenumsatz (Bernstein et al. 2003).

1.3.2 Epidemiologie der Osteoporose

Laut RKI lag die Prävalenz für Osteoporose 2017 bei postmenopausalen Frauen im Alter von 45 bis 64 Jahren bei etwa 4,4%. Sie stieg im Alter von mehr als 65 Jahren signifikant auf 24,0% an. Bei den Männern betrug die Prävalenz einer erniedrigten Knochendichte am Schenkelhals im Alter von 45 bis 64 Jahren 2,9% und stieg im Alter von mehr als 65 Jahren auf 5,6% an (Robert Koch-Institut 2017). Prävalenzschätzungen zur Osteoporose variieren jedoch nach Art und Quelle der Datenerhebung und nach Studiendesign. In der *SCOPE*-Studie von 2021 zeigte sich beim Vergleich der europäischen Länder eine Prävalenz der Osteoporose in Deutschland in der Gesamtpopulation von 6,1%. In der Gruppe der über 60-jährigen lag sie bei 22,6% bei Frauen und bei 6,6% bei Männern (Kanis et al. 2021). Osteoporose-assoziierte Frakturen nehmen bei Frauen nach dem 50. Lebensjahr und bei Männern nach dem 60. Lebensjahr deutlich zu (Hadji et al. 2020).

1.3.3 Frakturrisikofaktoren der Osteoporose

Die Frakturrisikofaktoren können unterschieden werden in allgemeine und spezielle Risikofaktoren. Zu den allgemeinen Risikofaktoren gehören unter anderem hohes Alter, weibliches Geschlecht, niedrigtraumatische Frakturen (sowohl vertebral als auch nicht vertebral, die auch familiär gehäuft auftreten können), Immobilität, Rauchen, chronisch obstruktive Atemwegserkrankung (COPD), Untergewicht, Hyponatriämie, Kalzium-/Folsäure-/Vitamin D- und Vitamin B12-Mangel und hoher Alkoholkonsum. Zu den speziellen Risikofaktoren gehören Grunderkrankungen aus den Fachbereichen Endokrinologie, Rheumatologie, Gastroenterologie und Neurologie/Psychiatrie. Als weiterer wichtiger Risikofaktor gilt die Einnahme einiger Medikamente (DVO 2023). Um sekundäre Faktoren für eine Osteoporose auszuschließen, werden neben zahlreichen anderen Risikofaktoren auch Parameter der Ernährung untersucht.

1.3.4 Klinische Bedeutung der Osteoporose

Osteoporotische Frakturen können an jeder Stelle des Skeletts auftreten. Die vorrangigen Lokalisationen sind die Wirbelsäule, die Hüfte (proximaler Femur), der Humerus und der distale Unterarm (Melton 1991). Die Frakturen führen bei den Patienten zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität. Die Beschwerden und die Morbidität der Osteoporose werden durch diese Frakturen verursacht, die mit Schmerzen, einer Abnahme der körperlichen und sozialen Funktion und des Wohlbefindens verbunden sind (Lips und van Schoor 2005). In einer Studie zeigten postmenopausale Frauen mit osteoporotischen Frakturen signifikante Verschlechterungen der körperlichen Funktion und des emotionalen Status drei Jahre nach Frakturbeginn im Vergleich zu Frauen ohne Frakturvorfällen (Silverman et al. 2012).

1.3.5 Diagnostik der Osteoporose

In der Leitlinie des DVO (Dachverband Osteologie e.V.) wird eine Basisdiagnostik bei postmenopausalen Frauen und Männern ab dem 50. Lebensjahr abhängig vom Frakturrisikofaktorenprofil empfohlen. Die empfohlene Basisdiagnostik besteht aus Anamnese mit Erfassung von erwähnten Frakturrisikofaktoren und klinischem Befund mit Timed Up and Go-Test, einer DXA-Knochendichtemessung, einem Basislabor sowie ggf. einer bildgebenden Diagnostik bei klinischen Hinweisen auf osteoporotische Wirbelkörperfrakturen (DVO 2023). Die Knochendichtemessung spielt eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von Personen mit mehreren Risikofaktoren, um ihr Frakturrisiko vorherzusagen und präventive Maßnahmen einzuleiten (Swedish Council on Health Technology Assessment 2003). Ziel des Basislabors ist die Prüfung der wichtigsten laborchemisch erfassbaren Risikofaktoren und sekundären Osteoporosen und differentialdiagnostisch in Frage kommenden anderen Osteopathien (DVO 2023).
Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Basisdiagnostik, welche in der Leitlinie des DVO aus dem Jahr 2023 empfohlen wird.

Tabelle 1: Basisdiagnostik Osteoporose (DVO 2023)

Anamnese und klinische Beurteilung	- Beginn der Menopause - Verlust von Körperhöhe - Knochenbruchereignisse (v.a. Wirbelkörperfrakturen) - Sturzrisikountersuchung - Hinweise für sekundäre Osteoporose/Malignom - Beurteilung von Muskelkraft u. Koordination ab dem 70. Lebensjahr - Medikamentenanamnese
Labordiagnostik	- Blutbild - Entzündungsparameter (Blutsenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein) - Proteine und Elektrolyte (Kreatinin, Calcium, alkalische Phosphatase, Phosphat, Vitamin D, Gamma-Glutamyl-Transferase) - Kreatinin-Clearance (glomeruläre Filtrationsrate [GFR]) - Hormondiagnostik (Thyreoidea-stimulierendes Hormon) - Serum-Eiweißelektrophorese - Ggf. Testosteron (bei Männern) - Ggf. Knochenumbaumarker
Apparative Diagnostik	- DXA (LWS, Femur gesamt, Femurhals, ggf. Unterarm), ggf. TBS *(trabecular bone score)* - Röntgen Wirbelsäule in 2 Ebenen oder LVA (*lateral vertebral assessement)*

1.3.6 Therapie der Osteoporose

Die Osteoporose-Therapie besteht aus Basismaßnahmen zur Frakturprophylaxe (v.a. Lebensstilumstellung) und medikamentöser Therapie. Im Rahmen der medikamentösen Therapie wird standardmäßig die Supplementierung von Calcium und Vitamin D empfohlen. Eine Therapieindikation für eine osteoanabole medikamentöse Therapie ergibt sich anhand eines Risikomodells und Risikorechners. Diese basieren auf einem geschätzten, behandelbaren 3-Jahres-Frakturrisiko von durchschnittlich ≥ 5% für vertebrale und

Femur-Frakturen. Bei Vorliegen von starken oder irreversiblen bzw. drohenden Risikofaktoren wird eine medikamentöse Therapie auch dann empfohlen, wenn das Risiko zwischen 3 – 5% für drei Jahre liegt (DVO 2023).

1.4 Ziele der Arbeit

Bei diesem Projekt handelt sich um eine retrospektive Analyse bereits durchgeführter Laboruntersuchungen. Untersucht werden sollen in diesem Zusammenhang die Laborparameter Vitamin K1, Vitamin K2 (K2-MK4: kurzwirksame Form, K2-MK7: langwirksame Form) sowie carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin.

Diese Parameter wurden in den Jahren 2019/2020 im MVZ Endokrinologikum Göttingen bei einem Kollektiv von 100 Osteoporosepatienten zusätzlich zur Standarddiagnostik veranlasst und im Labor des *amedes MVZ wagnerstibbe* bestimmt.

Mit dieser Dissertation soll die Frage beantwortet werden, wie sich die Vitamin K2-Versorgung des hier betrachteten Osteoporose-Kollektivs darstellt, auch im Vergleich zu anderen Studienkollektiven in der Literatur, die sich mit dem Vitamin K2-Status bei Osteoporose-Patienten befassen.

Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass niedrige Werte für Vitamin K2-MK7 mit der Höhe des uncarboxylierten Osteocalcins korrelieren und das durch die anschließende Vitamin K2 Substitution das uncarboxylierte Osteocalcin absinkt.

Zudem soll untersucht werden, inwiefern die Etablierung der Messung von Vitamin K1, Vitamin K2 (MK4 und MK7), carboxyliertem Osteocalcin und uncarboxyliertem Osteocalcin eine sinnvolle Ergänzung der Standard-Diagnostik von Osteoporose-Patienten sein kann. Ein weiteres Ziel ist es darzustellen, von welchen anderen Messparametern die Vitamin K2-relevanten Parameter beeinflusst werden und ob eine Substitution von 100 µg/l Vitamin K2-MK7 täglich anhand der Messergebnisse in unserem Kollektiv eine sinnvolle Ergänzung in der Osteoporose-Therapie sein kann.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

In der explorativen Studie wurden die Daten von Osteoporose-Patienten aus dem Endokrinologikum Göttingen verwendet und durch die Ethikkomission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (18/2/07). Die Patienten wurden zur Abklärung einer Osteoporose von externen medizinischen Fachbereichen an die endokrinologische Ambulanz überwiesen. Die hiesige Anamnese- und Befunderhebung erfolgte nach einem standardisierten Ablauf. Da die Messung der Vitamin K2-Parameter in Deutschland keine Leistung der gesetzlichen Krankenkassen ist, schließt die Studie nur jene Patienten ein, die die Kosten der speziellen Laboruntersuchungen der Vitamin K2-relevanten Parameter selbst getragen haben.

2.2 Anzahl der Patienten und Zeitraum der Studie

Es wurden die Daten von 100 Osteoporose-Patienten, die im Zeitraum von Januar 2019 bis April 2020 im Endokrinologikum vorstellig waren, retrospektiv analysiert.

2.3 Vorgehen bei der Datenerhebung

Der Zugang zu den Daten wurde durch die Informationstechnik des Endokrinologikums Göttingen ermöglicht. Von einigen Patienten lagen Einwilligungserklärungen für die Zustimmung zur Datenverwendung für medizinische Forschung vor. Bei einigen hat diese Einwilligungserklärung gefehlt. Die postalische Rückfrage diesbezüglich haben nicht alle Patienten beantwortet.

2.4 Auswertung der Daten

Zur Auswertung wurden Basisdaten (wie Alter und BMI *[body mass index]*), Laboruntersuchungen, Medikamentenauflistungen, Knochendichtemessungen mittels DXA, Arztbriefe sowie von den Patienten ausgefüllte spezielle Osteoporose-Fragebögen gesichtet und verwendet. Alle Patienten erhielten bei Erstuntersuchung im Endokrinologikum einen Fragebogen zur Symptomatik, der vor der klinischen Untersuchung ausgefüllt und anschließend mit dem betreuenden Arzt besprochen wurde.

Die Fragebögen beinhalteten Fragen über Erstmanifestation der Osteoporose, Frakturereignisse in der Vorgeschichte sowie Grunderkrankungen der Patienten und deren Familienanamnese.
Zum Akquirieren der Patientendaten wurden die Programme *Moviestar* und *Medistar* der *CompuMedicalGroup* (CGM), die im Endokrinologikum für die Dokumentation dienen, verwendet. Nach einer Einführung in die verwendeten Programme wurde mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Patientendaten eine Excel-Tabelle erstellt. In der Excel-Tabelle wurde zum Zweck der Pseudonymisierung jedem Patienten eine Nummer von 1 bis 100 zugeordnet und mit dem Geburtsdatum und dem Geschlecht zusammen codiert. Nach Fertigstellen der Tabelle erfolgte eine stichpunktartige Kontrolle der erhobenen Daten. Bei sichtbaren Ausreißern wurde nachkontrolliert. Anschließend wurden die Daten anonymisiert und konnten in *SPSS* transferiert werden.

2.5 Klinische Messdaten

Folgende Messdaten wurden bei jedem Patienten zum 1. Messtermin erhoben: Basisdaten, Biometrische Daten, Zeitpunkte der Messtermine, Laboruntersuchungen, Medikation, Vitamin K2-Substitution, Frakturen und eine DXA-Messung.
Diese Messdaten, die im Rahmen der Studie verwendet wurden, werden nachstehend ausführlicher dargestellt.

2.5.1 Basisdaten

Als Basisparameter wurden das Geschlecht, das zu dem Zeitpunkt der Datenerhebung aktuelle Alter sowie das Alter der Patienten bei Erstvorstellung im Endokrinologikum verwendet.

2.5.2 Biometrische Daten

Als biometrische Daten wurden die aktuellen Angaben zu Körpergröße (in Zentimeter [cm]), Körpergewicht (in Kilogramm [kg]) und dem BMI (Körpergewicht in kg/ [Größe in m]^2) verwendet.

2.5.3 Zeitpunkte der Messtermine

Es wurden die Zeitpunkte der Labor-Messtermine im untersuchten Zeitraum bestimmt und wie folgt codiert: 1. Messtermin = 1, Verlaufslabor nach 3 Monaten = 2, Verlaufslabor

nach 6 Monaten = 3, Verlaufslabor nach 9 Monaten = 4, Verlaufslabor nach 12 Monaten = 5. Bei einigen Patienten lag dabei nur eine Messung zum 1. Messtermin (im Verlauf 1. MT genannt) vor, bei anderen waren es zusätzlich ein oder mehrere Verlaufsmessungen (2. Messtermin, im Verlauf 2. MT genannt). Bei jedem Messtermin mit der Bezeichnung „Verlaufslabor" wurde die erneute Laboruntersuchung sowie die zu diesem Zeitpunkt aktuelle Medikation für die Studie verwendet. Alle anderen Messparameter des einzelnen Patienten wurden vom 1. Messtermin übernommen.

2.5.4 Allgemeine und spezielle Vitamin K-Laborparameter

Die Parameter, die im Speziellen in dieser Studie untersucht werden sollten, waren Vitamin K1, Vitamin K2 (MK4 und MK7), carboxyliertes Osteocalcin und uncarboxyliertes Osteocalcin. Sie werden folgend als Vitamin K2-relevante Parameter bezeichnet. Die im Rahmen der Diagnostik durchgeführten Laboruntersuchungen werden in der folgenden Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Laboruntersuchungen bei Osteoporose

Spezielle Analytik	Vitamin K1, Vitamin K2 (MK4, MK7), carboxyliertes Osteocalcin, uncarboxyliertes Osteocalcin
Allgemeine Laborparameter	GGT (Gamma-Glutamyl-Transferase), GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), AP, Kreatinin, GFR, Homocystein, ß-Carotin, PTH, Albumin
Osteoporose spezifische Parameter	Vitamin D, Calcium (auch Albumin-korrigiert), alkalische Knochenphosphatase

Die Normwerte, die für die einzelnen Laborparameter standardmäßig im Endokrinologikum verwendet werden, zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Normwerte der verwendeten Laborparameter

Laborparameter	Normwerte
Vitamin K1 (ng/l)	110 – 1150
Vitamin K2-MK4 (µg/l)	0,1 – 0,86
Vitamin K2-MK7 (µg/l)	0,1 – 0,82
cOsteocalcin (µg/l)	4,0 – 12,0
ucOsteocalcin (µg/l)	0,6 – 3,30
Alkalische Knochen-Phosphatase (µg/l)	Prämenop.: <27,0; Postmenop.: <27,1
Vitamin D 25 (nmol/l)	50 – 118
AP (U/l)	35 – 104
GPT (U/I)	<35
GOT (U/I)	<35
GGT (U/I)	<40
Parathormon (pmol/l)	1,7 – 6,89
Albumin (g/l)	35,0 – 52,0
Calcium korrigiert (mmol/l)	2,0 – 2,6
Calcium (mmol/l)	2,0 – 2,6
GFR (ml/min)	>60
Kreatinin (mg/dl)	<0,9
Homocystein (µmol/l)	<13
ß-Carotin (µg/l)	150 – 1250

2.5.5 Medikation

Von allen Patienten wurde die aktuelle Medikation zum Zeitpunkt des 1. Messtermins dargestellt. Dabei wurde unterschieden in Osteoporose-spezifische Medikation und jene, die wegen anderer Grunderkrankungen verordnet wurde. Die untenstehende Tabelle 4 zeigt, welche Medikation in dieser Studie dargestellt wurde. Abgesehen von Vitamin D wurde bei allen Medikamenten nur die dichotome Verschlüsselung ja=1 und nein=0 verwendet und keine Dosierung dargestellt. Bei Vitamin D wurde die tägliche Dosierung in IE dokumentiert.

Tabelle 4: Medikation der Patienten im Gesamtkollektiv

Osteoporose spezifische Medikation	Vitamin D, Calcium, Bisphosphonate, Teriparatid, Denosumab, Raloxifen, Ibandronsäure, Zoledronsäure, Risedronsäure
Sonstige Medikation	Marcumar, Thrombozytenaggregationshemmer (ASS, Prasugrel), Neue orale Antikoagulantien (Rivaroxaban, Apixaban, Dabigatran), Diuretika (Schleifendiuretika, Thiazide, Kalium sparende Diuretika), Protonenpumpeninhibitoren

2.5.6 Vitamin K2-Substitution

Bei der Vitamin K2-Substitution wurde die Codierung ja=1 und nein=0 verwendet. Bei der Verschlüsselung ja=1 wurde die tägliche Dosierung in µg dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Dosierungen sehr inhomogen waren und es war teilweise nicht nachvollziehbar, wie diese festgelegt wurden. Dabei variierte die tägliche Dosierung zwischen den einzelnen Patienten zwischen 90 – 500 µg. Deshalb wurde bestimmt, dass nicht anhand der einzelnen Dosierungen, sondern nur mit der anfänglichen Codierung Vitamin K-Substitution ja=1 oder nein=0 differenziert wurde.

Die inhomogenen Substitutionsdosierungen zwischen den Patienten ergeben sich, da einige Patienten schon in der Vorgeschichte mit eigener, nicht einheitlicher Dosierung Vitamin K2 eingenommen haben. Die Dosierung, die die Patienten im Endokrinologikum verordnet bekommen haben, betrug 100 µg. Diese Dosierung sollte im Verlauf und im Rahmen dieser Studie hinterfragt und evaluiert werden, da sich nur nach Empfehlungen gerichtet wurde und es bisher keine eigene Erfahrung dazu gab.

2.5.6.1 Gruppierung nach Vitamin K2-Substitution

Das Gesamtkollektiv besteht aus 100 Patienten. Neun Patienten davon waren bereits zum 1. Messtermin mit Vitamin K2 substituiert. Von den 91 Patienten, die zum 1. Messtermin nicht mit Vitamin K2 substituiert wurden, lagen von 32 Patienten auch Daten zum 2. Messtermin vor. Dabei ist ein Kollektiv von 26 Patienten auch im Verlauf nicht substituiert worden, im Verlauf bezeichnet als „Nicht-substituiertes Kollektiv“. Sechs Patienten wurden bei hohen ucOC-Werten im Verlauf mit 100 µg Vitamin K2 täglich substituiert und werden als „Neu-substituiertes Kollektiv“ beschrieben. Die Aufteilung der Patienten wurde im Ergebnisteil dieser Arbeit grafisch dargestellt.

2.5.7 Frakturen

Die Informationen über vorliegende Frakturen konnten aus den Patientenfragebögen gewonnen werden. Dabei haben die Patienten eingetragen, welche Frakturen in welchem Lebensalter auftraten. Für die Analyse wurden die Frakturen in drei Fraktionen aufgeteilt. Die erste enthält alle Patienten, die Frakturen aufweisen, nicht aufgeteilt nach körperlicher Lokalisierung. Die zweite und dritte Fraktion dient zur Unterscheidung der Lokalisation der Frakturen. Sie beinhalten jene Patienten, die vertebrale Frakturen, beziehungsweise nicht vertebrale Frakturen erlitten haben. Dabei können Patienten auch sowohl zur zweiten als auch zur dritten Fraktion gehören, wenn sie vertebrale und nicht vertebrale Frakturen gehabt haben. Bei allen drei Gruppen wurde nicht die exakte Anzahl an Frakturen dargestellt, sondern nach der dichotomen Fragestellung, die mit „ja“ oder „nein“ zu beantworten war, eingeteilt.

2.5.8 DXA-Messung

Die Knochendichtemessung ist eine international anerkannte Methode zur Beurteilung des Frakturrisikos im Rahmen der Osteoporose-Diagnostik. Die DXA ist heute Goldstandard der Knochendichtemessungen (DVO 2023). Die DXA-Messungen des Patientenkollektivs erfolgten größtenteils im Endokrinologikum Göttingen, teilweise jedoch auch in auswertigen Einrichtungen. Das Gerät zur Messung der Knochendichte mittels DXA war im Endokrinologikum Göttingen das Lunar Prodigy GE. Die Strahlenbelastung wird bei diesem Gerät vom Hersteller als äußerst gering und mit der natürlichen Hintergrundstrahlung vergleichbar angegeben. Bei einer durchschnittlichen Scandauer von 30 Sekunden liegt sie bei 0,037 mSv (Messung an Hüfte und Wirbelsäue). Zu den Geräten anderer Zentren liegen keine näheren Informationen vor.

Es wurden T-Scores und Z-Scores verwendet. Der T-Score ist definiert als Abweichung eines Messwertes vom Mittelwert 30-jähriger, gesunder Patienten, also Abweichung von der "*peak bone mass*". Der Z-Score ist definiert als Abweichung eines Messwertes vom Mittelwert von alters- und geschlechtsangepassten gesunden Personen. Dabei können folgende Formeln zur Berechnung verwendet werden:

Z-Score= P-MV / SDV **T-Score= P-MG / SDG**

(P= BMD des Patienten; MV= Mittelwert einer Vergleichsgruppe vergleichbaren Alters und Geschlechts; SDV= Standardabweichung vom Mittelwert vergleichbaren Alters und Geschlechts; MG = Mittelwert einer Vergleichsgruppe von gesunden 30-40-jährigen Patienten; SDG= Standardabweichung vom Mittelwert gesunder 30-40-jähriger Patienten)

Da die Patienten des Kollektivs fast ausschließlich über 50 Jahre alt waren, ist vorrangig der T-Score von Bedeutung.
Von jedem Patienten wurde, die zum Zeitpunkt der Studie aktuelle Knochendichtemessung verwendet. Zusätzlich dazu wurde bei den meisten Patienten auch eine Messung der Knochenqualität mittels TBS durchgeführt und für die Analysen dieser Arbeit verwendet. Diese Methode beurteilt dreidimensionale Parameter, wie z.B. die Verteilung und Anzahl der Trabekel und die Dichte der Knochenverbindungen, womit unabhängig von der BMD das Frakturrisiko vorhergesagt werden kann (Pothuaud et al. 2008).

2.6 Messmethoden der Vitamin K2-relevanten Laborparameter

2.6.1 Allgemeine Messmethoden des Vitamin K-Status

Für die direkte Messung von Vitamin K-Unterformen in biologischen Proben wurden mehrere Verfahren entwickelt. In einer Übersichtsarbeit von Fusaro et al. wurden die bekannten Messmethoden dargestellt. Zur direkten Messung von Vitamin K sind die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV- oder elektrochemischer Detektion ältere Messvarianten, welche eine geringe Empfindlichkeit und Selektivität bieten. Die HPLC mit Fluoreszenzdetektion gilt als Methode der Wahl zur Messung von Vitamin-K-Subtypen. Die LC-MS (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie) ist eine neuere Methode und bietet im Vergleich zu den anderen Techniken eine höhere Empfindlichkeit und Selektivität. In letzter Zeit wurden unterschiedliche LC-MS-Methoden zur Identifizierung von Vitamin K-Unterformen entwickelt. (Fusaro et al. 2017). Suhara et al. erarbeiteten im Rahmen einer japanischen Studie ein Modell einer LC-APCI-MS/MS für die Messung der Vitamin K-Plasmaspiegel, die sich durch hohe Empfindlichkeit und Selektivität auszeichnet, aber für Routineanalysen zu langwierig und aufwendig (morgendliche Blutentnahme nach 12-stündiger Nüchtern-Phase) ist. Dabei steht APCI für *atmospheric pressure chemical ionization* (Suhara et al. 2005; Tsugawa et al. 2006). Karl et al. erarbeiteten die HPLC-Massenspektrometrie mit chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (LC-APCI-MS) für die gleichzeitige Quantifizierung von elf Vitamin K-Unterformen in biologischen Proben wie Serum, Fäkalien und Lebensmittelen (Karl et al. 2014).
Da eine direkte Messung des Vitamin K schwierig und häufig ungenau ist, wurde die Messung von uncarboxyliertem Osteocalcin als eine indirekte Methode zur Evaluierung des Vitamin K Status beschrieben (Calvo et al. 1996; Palermo et al. 2017). Jedoch hat auch die

Osteocalcin-Messung ihre Einschränkungen, da sie zum Beispiel von Parathormon beeinflusst wird. So soll bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus ein erhöhter Serum-Osteocalcin-Wert messbar sein, ohne dass automatisch ein Vitamin K-Mangel vorliegen muss (Torres et al. 1989).

2.6.2 LC-MS/MS-Bioanalyse für Vitamin K-Messung

In der hier durchgeführten Studie wurden die Vitamin K-Laborparameter mittels LC-MS/MS analysiert. Darunter versteht man die Verbindung von Hochleistungs-Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS). Dabei dient die Flüssigchromatographie zur Auftrennung und die Massenspektrometrie zur Identifikation und Quantifizierung einzelner reiner, ionischer Substanzen ebenso wie Substanzgemischen. Dadurch können sowohl Rückschlüsse auf die Summenformel als auch auf die Häufigkeit der einzelnen analysierten Ionen gezogen werden. Es können auch kleinste Mengen löslicher Substanzen analysiert werden. Die LC-MS/MS wird zunehmend als Alternative oder ergänzende Technik zu beispielsweise dem ELISA (Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay) für die Analyse von Proteinen und Peptiden eingesetzt (Bults et al. 2019).

2.6.2.1 Bestimmungsmethode Vitamin K1

Die Vitamin K1-Analytik beruht auf einem bereits bekannten Verfahren. Vor Beginn der Analytik werden drei Seren – eins vom Patienten, die anderen beiden sind Kalibrator-/und Kontrollserum – mit Vitamin K1-^{13}C6 versetzt. Als nächstes wird eine Proteinfällung mit anschließender flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt. Die Trennung geschieht an einer Reversed-Phase-Säule mit einem Methanol-/ entmineralisiertem Wasser/ 0,1% Ameisensäure-Gradienten (Flussrate 0,6 ml/min) mit anschließender positiver Ionisation. Danach folgt die MS/MS-Detektion und das MRM *(multipe reaction monitoring)*. Die Auswertung erfolgt über drei MS/MS-Massenübergänge. Die folgende Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Vitamin K1-Analytik.

Tabelle 5: Bestimmungsmethode Vitamin K1

Vitamin K1 **Materialbedarf:** mind. 400 µl Serum/Plasma lichtgeschützt (Aluminium-Folie) **Ansatz**: 200 µl **Laufzeit Analyse**: 3,5 min
Messbereich: 10 – 100.000 ng/l **Nachweisgrenze**: 6 ng/l **Cut off**: 50 ng/l **Referenzbereich:** 110 – 1150 ng/l

2.6.2.2 Bestimmungsmethode Vitamin K2

Die Messmethodik des Vitamin K2 ist deutlich aufwendiger als die bereits länger etablierte Vitamin K1-Messung, denn das Serum enthält Substanzen, die die massenspektrometrische MK-7-Detektion durch Signalunterdrückung (Ionensuppression) fast unmöglich machen. Diese Substanzen müssen vorher vom Analyten (MK7) abgetrennt werden. Die Messungen sind wegen der nötigen Probenvorbereitung und des Umbaus der LC-MS/MS-Anlage sehr zeitaufwendig und wurden vom *amedes MVZ wagnerstibbe* in dieser Form etabliert.
Vor Beginn der Analytik werden drei Seren – eins vom Patienten, die anderen beiden sind Kalibrator-/und Kontrollserum – mit Vitamin K2 (MK4) -d7 und Vitamin K2 (MK7) -^{13}C6 versetzt. Als nächstes wird eine Proteinfällung mit anschließender flüssig-flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion durchgeführt. Danach folgt die fraktionierte Elution. Die Trennung geschieht an einer Reversed-Phase-Säule mit einem Methanol-/ entmineralisiertem Wasser/ 0,1% Ameisensäure-Gradienten (Flussrate 0,6 ml/min) mit anschließender positiver Ionisation. Hinterher folgt die MS/MS-Detektion und das MRM. Die Auswertung erfolgt über 2 interne Isotopen-Standards und mindestens zwei MS/MS-Massenübergänge. Die folgende Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Vitamin K2-Analytik.

Tabelle 6: Bestimmungsmethode Vitamin K2

Vitamin K2-MK4/7			
Materialbedarf:	mind. 500 µl Serum/Plasma lichtgeschützt (Aluminium-Folie), gefroren		
Ansatz:	200 µl 3x wöchentlich	**Laufzeit Analyse**: 4,5 min	
Vitamin K2-MK4			
Messbereich:	0,02 – 100 µg/l	**Nachweisgrenze**: 0,012 µg/l	**Cut off**: 0,10 µg/l
Referenzbereich:	0,10 – 0,86 µg/l		
Vitamin K2-MK7			
Messbereich:	0,02 – 100 µg/l	**Nachweisgrenze**: 0,018 µg/l	**Cut off**: 0,10 µg/l
Referenzbereich:	0,10 – 0,82 µg/l		

2.6.3 CLIA-Bioanalyse für Osteocalcin-Messung

Die Messung sowohl des carboxylierten als auch des uncarboxylierten Osteocalcins im Serum erfolgte mittels LIAISON® Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) der Firma DiaSorin. Es handelt sich um einen direkten 2-Site-Chemilumineszenz-Immunoassay nach der Sandwich-Methode. Auf eine feste Phase wird ein affinitätschromatographisch gereinigter Maus-Antikörper gegen das synthetische humane Osteocalcin aufgetragen. Mit einem Isoluminolderivat wird der zweite affinitätschromatographisch gereinigte Maus-Antikörper konjugiert. Osteocalcin bindet während der Inkubation an die feste Phase und wird dann durch den Isoluminol-konjugierten Antikörper gebunden. Das ungebundene Material wird nach der Inkubation durch einen Spülzyklus entfernt. Anschließend wird eine Blitz-Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst, indem die Starter-Reagenzien hinzugefügt werden. Durch einen Fotovervielfacher wird das Lichtsignal als relative Lichteinheiten (RLU, *Relative Light Units*) gemessen. Es ist proportional zur Konzentration der Osteocalcin-Zustandsformen in den gemessenen Proben.

2.7 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS in Absprache mit der Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen durchgeführt. Es handelt sich in dieser Studie vorrangig um nicht parametrische Analysen, da die meisten verwendeten Parameter nicht normalverteilt waren.

Zur Beschreibung des Gesamtkollektivs wurde die deskriptive Statistik verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben. Zum Vergleich, ob Unterschiede bei den Laborwerten zwischen Männern und Frauen vorliegen wurde ein Levene-Test der Varianzengleichheit mit anschließendem t-Test für die Mittelwertgleichheit durchgeführt. Ein Einfluss der Einnahme der verschiedenen Gruppen spezieller Osteoporosemedikation auf die Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter wurde mittels Kruskal-Wallis mit posthoc paarweisem Vergleich (Bonferroni) getestet. Zur Korrelation der fünf Vitamin K2-relevanten Laborparameter untereinander wurde eine Pearson-Korrelation mit anschließender linearer Regression angewendet, um nach signifikanten Zusammenhängen zu untersuchen. Der Vergleich von Vitamin K2-relevanten Parametern im Verlauf bei der Substitutionsgruppe und jenen, die keine Substitution erhalten haben, wurde mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests sowie eines Wilcoxon-Vorzeichentests „one-tailed“ dargestellt. Für die Einnahme von sonstiger Medikation wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Für den BMI erfolgte eine Pearson-Korrelation mit linearer Regression zur Untersuchung von Zusammenhängen mit den Vitamin K2-relevanten Parametern. Für die Analyse des Zusammenhangs der analysierten Parameter mit den Knochendichtemessungen wurden die Laborparameter Vitamin K1, Vitamin K2-MK7, carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin in Quartile eingeteilt. Diese Parameter wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests für unabhängige Stichproben verglichen. Da bei den Parameter Vitamin K2-MK4 die Laborwerte sehr nah beieinanderlagen und so die einzelnen Quartilengruppen kein differenziertes Ergebnis zugelassen hätten, wurde ein Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zweier Gruppen durchgeführt. Nach der Pearson-Korrelation der fünf Parameter mit den Parametern Z-/T-Score und TBS der DXA-Messung ergaben sich zuerst signifikante Ergebnisse, bei welchen eine Bonferroni-Korrektur angeschlossen wurde. Für die weiterhin signifikanten Ergebnisse wurde eine lineare Regression mit erweiterter Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Es wurde eine anschließende Alterskorrektur für den T-Score durchgeführt. Bezüglich eines Zusammenhanges von Laborwerten und dem Vorliegen von Frakturen wurde ein Levene-Test der Varianzengleichheit mit anschließendem t-Test für die

Mittelwertgleichheit durchgeführt. Für die Frakturen wurde mittels Kreuztabelle getestet, ob sich Unterschiede im Vorliegen von Frakturen bei Einnahme spezieller Osteoporosemedikation zeigen.

Für die Signifikanzprüfung aller Tests dient der p-Wert. Dieser wurde zu einem Niveau von 5% getestet und ist wie folgt definiert:

$p \leq 0{,}001$ = hochsignifikant ***

$p \leq 0{,}01$ = sehr signifikant **

$p \leq 0{,}05$ = signifikant *

$p < 0{,}1$ = Tendenz zur Signifikanz

$p > 0{,}05$ = nicht signifikant

Im Folgenden wurden signifikante p-Werte **($p \leq 0{,}05$)** markiert und grafisch mit der jeweils beistehenden Anzahl an Markierungen (*) versehen.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtkollektiv

Das Gesamtkollektiv wurde zum 1. Messtermin bestimmt und besteht aus 100 Patienten, die im Zeitraum von Januar 2019 bis April 2020 im Endokrinologikum in Göttingen behandelt wurden.

Es wird im Rahmen dieser Studie als Ausgangspunkt für verschiedene Analysen und Vergleiche verwendet und beinhaltet diverse Untergruppen, die im Folgenden beschrieben werden. Da die Messung der Vitamin K2-relevanten Parameter aktuell nicht von gesetzlichen Krankenkassen übernommen wird, ist das zur Verfügung stehende Patientenkollektiv vergleichsweise klein.

Vom Gesamtkollektiv (n=100) ausgehend hatten 91 Patienten beim 1. Messtermin keine Vitamin K2-Substitution. Neun Patienten erhielten bereits am 1. Messtermin Vitamin K2. Dabei war die Substitution nicht von Ärzten des Endokrinologikums empfohlen worden, sondern die Patienten haben dies selbst- oder anderweitig verordnet eingenommen. Hierbei war die Dosierung der Vitamin K2-Substitution nicht einheitlich und beruhte auf der Eigenanamnese der Patienten, was die Vergleichbarkeit erschwert. Die tägliche Zufuhr schwankte in diesem Kollektiv zwischen 90 – 500 µg Vitamin K2. Dieses Kollektiv wird im Rahmen dieser Studie wegen der herabgesetzten Vergleichbarkeit nur am Rande betrachtet.

Von den 91 Patienten, die am 1. Messtermin keine Vitamin K2-Substitution erhielten, waren von 32 Patienten auch Daten zum 2. Messtermin vorhanden (29%). Dabei waren 26 Patienten zum 2. MT nicht mit Vitamin K behandelt worden („Nicht-substituiertes Kollektiv“). Sechs weitere Patientinnen hatten beim 1. MT auffallend hohe ucOC-Werte, weshalb sie unter Annahme der Ausgangshypothese folgend mit Vitamin K2 substituiert wurden und eine erneute Messung der Laborparameter zum 2. MT stattgefunden hat, um die Verläufe der Laborparameter darzustellen. Dieses Kollektiv wird als „Neu-substituiertes Kollektiv“ bezeichnet. Dabei wurde eine einheitliche tägliche Einnahme von 100 µg Vitamin K2 angeordnet.

Die Aufteilung der Patienten ist in der folgenden Abbildung 3 farblich dargestellt.

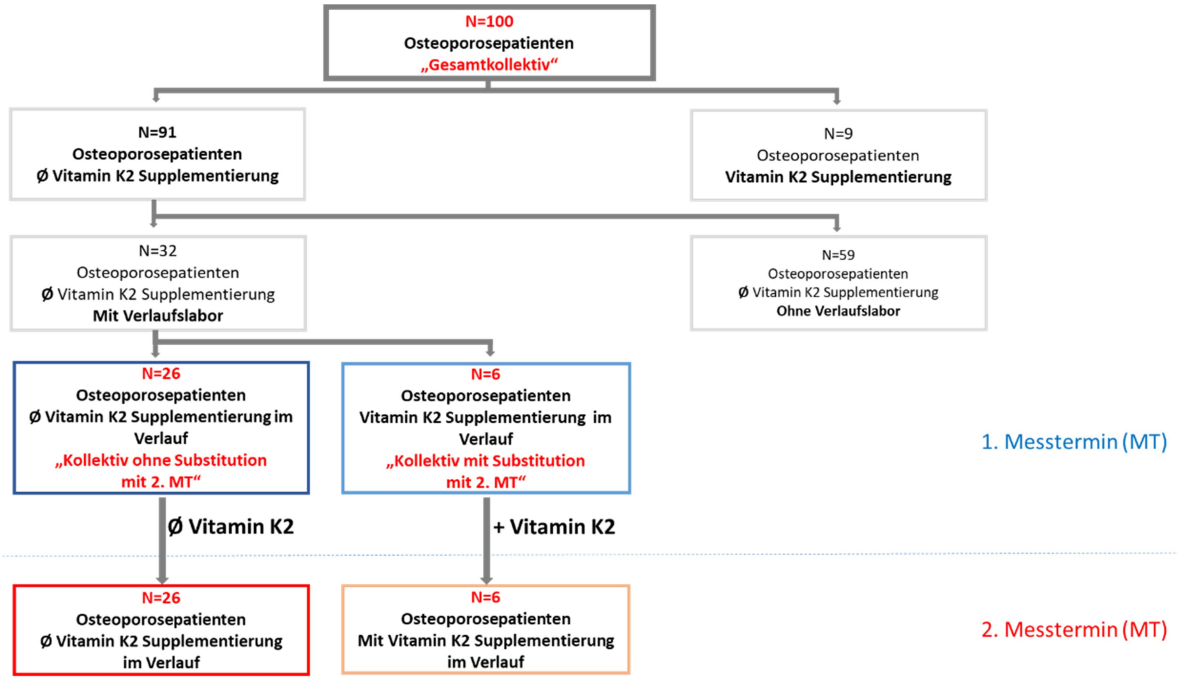

Abbildung 3: Untergruppen des Patientenkollektivs aufgeteilt in 1. und 2. Messtermin sowie mit und ohne Vitamin K2-Substitution. N=Anzahl der Patienten der jeweiligen Betrachtungsgruppe.

3.1.1 Datenlage für die erhobenen Parameter

Einen Überblick über die Datenlage für die erhobenen Parameter gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Datenlage der analysierten Parameter und dazugehörige Anzahl der Patienten (n)

Variable	Anzahl der Patienten (n)
Alter, Biometrische Daten	100
Vitamin K1 (ng/l)	100
Vitamin K2-MK4 (µg/l)	100
Vitamin K2-MK7 (µg/l)	100
cOsteocalcin (µg/l)	100
ucOsteocalcin (µg/l)	100
Alkalische Phosphatase Knochen (µg/l)	100
Vitamin D 25 (nmol/l)	100
Alle zusätzlich gemessenen Laborparameter	31-100
DXA-Messung	98
Frakturen in der Anamnese	100
Medikamentenanamnese	100

Die überwiegende Anzahl der Daten aus der Gruppe der zusätzlich gemessenen Laborparameter, zu denen Leber- und Nierenfunktionsparameter sowie Stoffwechselparameter gehören, sind zu 100% vorhanden gewesen. Für den Leberparameter GOT waren nur von wenigen Patienten Daten vorhanden (n=31).

3.1.2 Beschreibung des Gesamtkollektivs

Im Folgenden wird das Gesamtkollektiv (n=100) genauer beschrieben. Dabei wurden die Ergebnisse der ärztlichen Untersuchungen verwendet, sowie bei der Frage nach Frakturen auf anamnestische Angaben der Patienten zurückgegriffen.

3.1.2.1 Geschlecht der Patienten

Bei den analysierten 100 Patienten handelt es sich um 84 Frauen und 16 Männer.

3.1.2.2 Alter der Patienten

Das Patientenkollektiv war im Mittel 64,2 Jahre alt mit einer SD von ±9,5 Jahren (Range: 42 – 80). Aufgeteilt nach dem Geschlecht zeigte sich, dass die Männer mit durchschnittlich 62,1 Jahren (SD±9,0; Range: 42 – 80) jünger waren, als die Frauen im Durchschnitt mit 64,9 Jahren (SD±9,5; Range: 43 – 80). Die Frauen waren zum größten Teil (n=79, 94%) über 50 Jahre alt und haben anamnestisch ihre Menopause erreicht. Bei den restlichen fünf Frauen, die das 50. Lebensjahr noch nicht vollendet haben, liegen keine Angaben zur Menopause vor. Insgesamt wurde das weibliche Kollektiv als postmenopausal betrachtet.

3.1.2.3 Biometrische Daten

Zur Beschreibung des Gesamtkollektivs wurden die Größe, das Gewicht und der BMI ermittelt. Die Daten wurden auch für Männer und Frauen getrennt aufgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Biometrische Daten des Gesamtkollektivs

	Gesamt (n=100)	**Frauen (n=84)**	**Männer (n=16)**	**p**
	MW±SD	MW±SD	MW±SD	
Größe (cm)	165,2±7,7	163,4±6,3	174,6±7,8	**<0,001**
Gewicht (kg)	65,5±13,2	63,0±11,2	79,1±15,2	**<0,001**
BMI (kg/m²)	23,9±4,2	23,6±3,9	25,9±5,3	**0,04**

Darstellung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (SD), Anzahl der Patienten (n) unterschieden in Frauen und Männer; Mann-Whitney-U-Test.

Im Mittel lagen die Frauen mit ihrem BMI mit 23,6±3,9 im Normbereich, die Männer waren im Durchschnitt mit einem BMI von 25,9±5,3 übergewichtig.

Im Einzelnen zeigte sich, in Abbildung 4 grafisch dargestellt, folgende Aufteilung: Bei den Frauen waren drei (3,6%) Patientinnen untergewichtig (BMI <18,5), 57 (67,9%) hatten ein Normalgewicht (BMI 18,5 – 24,9), 18 (21,4%) waren übergewichtig (BMI 25,0 – 29,9) und sechs (7,1%) adipös (BMI 30,0 – 34,9). Bei den Männern war ein Mann (6,3%) untergewichtig, sechs (37,5%) im Normalgewicht, fünf (31,3%) übergewichtig und vier (25%) adipös.

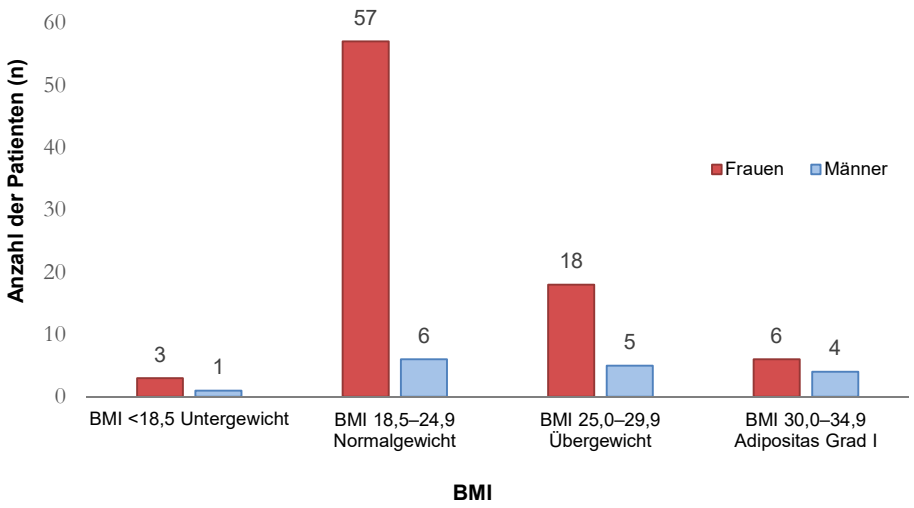

Abbildung 4: Biometrische Daten des Gesamtkollektivs. Aufteilung nach BMI und Geschlecht.

3.1.2.4 Medikation des Gesamtkollektivs

Die Patienten des Gesamtkollektivs wurden hinsichtlich ihrer allgemeinen Medikation (Abbildung 5) charakterisiert. Dazu zählen Medikamente, die keine spezifischen Osteoporose-Medikamente sind, aber für den Verlauf der Osteoporose relevant sein können. Es wurde nicht zwischen Männern und Frauen unterschieden. Teilweise haben die Patienten auch noch anderweitige Medikamente (z.B. Blutdruck- und Herzmedikation, Analgetika, Nahrungsergänzungsmittel und weitere) eingenommen, die jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in diese Studie aufgenommen worden sind.

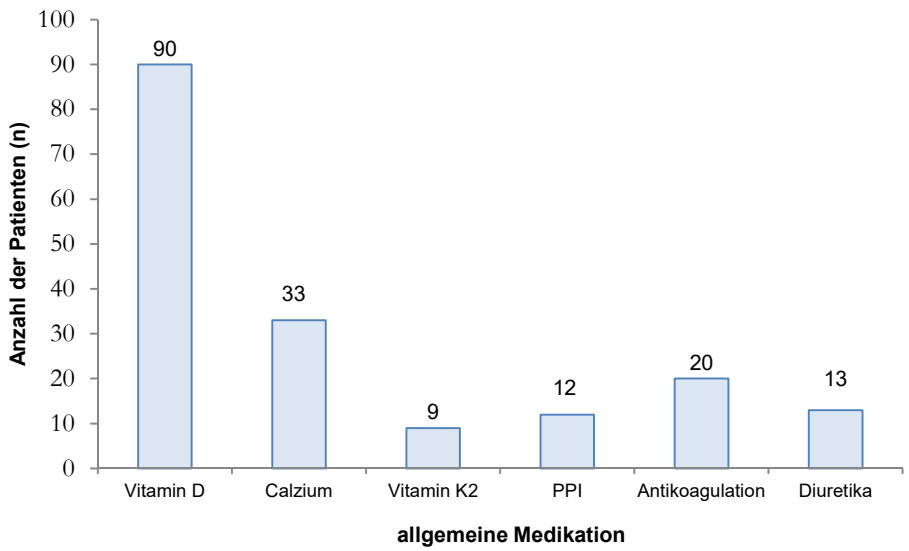

Abbildung 5: Allgemeine Medikation im Gesamtkollektiv. PPI=Protonenpumpeninhibitor, n=Anzahl der Patienten.

Abbildung 5 stellt grafisch dar, dass 90% täglich Vitamin D und 33% der Patienten täglich Calcium eingenommen haben. Die neun Patienten, welche schon vorher anderweitig mit Vitamin K2 substituiert wurden, sind ebenfalls gezeigt. 12 Patienten erhielten zum Studienzeitpunkt eine tägliche Medikation mit PPI (Protonenpumpeninhibitoren). Insgesamt 20 Patienten nahmen eine Antikoagulation ein, davon 13 Patienten ASS in antikoagulatorischer Dosierung, sechs Patienten ein NOAK (neue orale Antikoagulantien) und ein Patient Marcumar. Bei den von den 13 Patienten eingenommenen Diuretika handelt es sich um eine Gruppe verschiedener Wirkstoffe (z.B. Schleifendiuretika, Thiazide und kaliumsparende Diuretika) mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, wie der Hemmung von Transportprozessen an unterschiedlichen Bereichen im Tubulussystem der Niere, wobei insgesamt die Diurese gefördert wird.

Neben der allgemeinen Medikation ist in Abbildung 6 die Verteilung der Osteoporose-spezifischen Medikation im Gesamtkollektiv dargestellt.

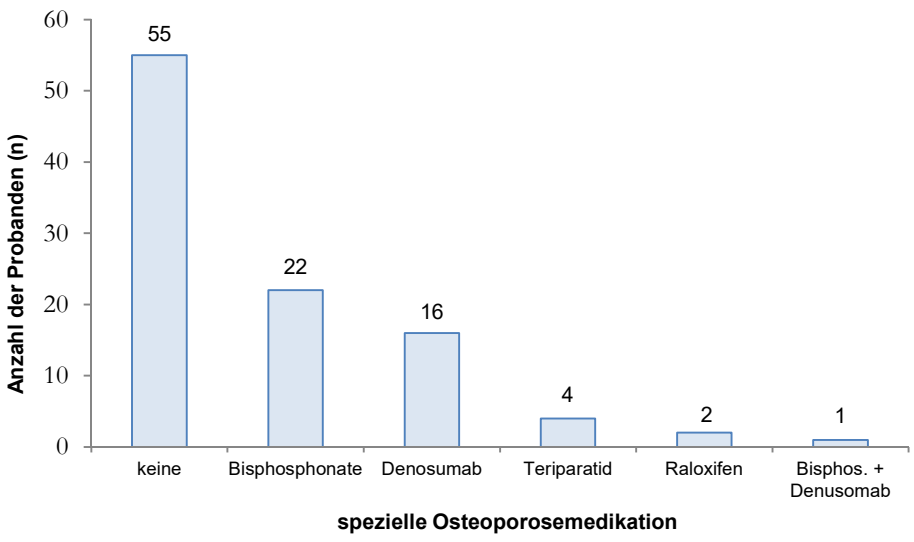

Abbildung 6: Spezielle Osteoporosemedikation im Gesamtkollektiv. (n)=Anzahl der Patienten.

Es zeigt sich, dass zwar alle Patienten an Osteoporose erkrankt sind und 45% des Kollektivs zum Zeitpunkt der Studie eine spezifische Medikation zur Behandlung der Osteoporose einnehmen. Die von den meisten Patienten eingenommenen Wirkstoffe sind Bisphosphonate (22%) sowie Denosumab (16%). Dabei handelt es sich bei den Bisphosphonaten um eine Gruppe zusammengefasster Wirkstoffe, bestehend aus Ibandronsäure (n=10, 45,5%), Alendronsäure (n=8, 36,4%) und Zoledronsäure (n=4, 18,2%). Teriparatid als rekombinantes Fragment des Parathormons nehmen vier Patienten des Gesamtkollektivs regelmäßig ein. Raloxifen und die nacheinander eingenommenen Wirkstoffkombination aus initial einem Bisphosphonat und im Anschluss Denosumab wird jeweils nur von einem Patienten aus dem Kollektiv zum Datenzeitraum als Medikation beschrieben.

3.1.2.5 Frakturen im Gesamtkollektiv

Da Vitamin K durch die Carboxylierung des Knochenstoffwechselmarkers Osteocalcin einen Einfluss auf die Knochenstabilität hat, welche bei Osteoporose erniedrigt ist, wurde das verwendete Kollektiv hinsichtlich der Frakturrate untersucht. Dabei wurde die Anzahl an Patienten mit Frakturen im Gesamtkollektiv analysiert. Abbildung 7 zeigt, dass 60% der Studienteilnehmer anamnestisch im Laufe ihres Lebens mindestens eine, einige Patienten auch mehrere Frakturen erlitten haben. Hierbei wurde jedoch nicht die genaue Anzahl an Frakturen dargestellt, sondern nur, ob Frakturen bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung vorlagen oder nicht.

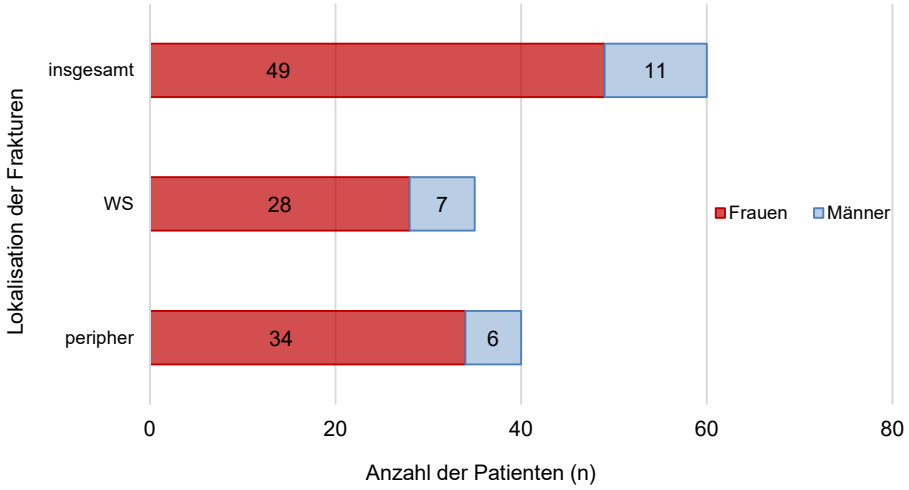

Abbildung 7: Frakturen im Gesamtkollektiv. Unterschieden nach dem Geschlecht und unterteilt nach Anzahl der Patienten (n) mit Frakturen insgesamt und Lokalisation in Wirbelsäule (WS) und peripher.

3.1.2.6 Laborwerte vom 1. Messtermin des Gesamtkollektivs

Nachdem das Kollektiv im Allgemeinen beschrieben und dargestellt wurde, sind für die Ausgangshypothese zur Veränderung der Vitamin K2-relevanten Laborparameter bei unterschiedlichen Vitamin K-Spiegeln im Besonderen die Laborwerte der verschiedenen Messtermine von Relevanz. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Laborwerte, die beim 1. Messtermin im Gesamtkollektiv erhoben wurden. Die Tabelle ist aufgeteilt in die Vitamin K2-relevanten Parameter, danach folgen Parameter des Knochenstoffwechsels, Leber- und Nierenwerte sowie Stoffwechselparameter. Es wurde sowohl das Gesamtkollektiv dargestellt als auch eine Unterteilung nach dem Geschlecht vorgenommen.

Tabelle 9: Laborwerte vom 1. Messtermin im Gesamtkollektiv

	Normwerte	**Gesamt**	**Frauen**	**Männer**	**p**
		MW±SD (n)	MW±SD (n)	MW ±SD (n)	
VK1 (ng/l)	110-1150	696,7±682,7 (100)	694,7±675,5 (84)	707,6±741,9 (16)	0,81
VK2- MK4 (µg/l)	0,1-0,86	0,2±0,1 (100)	0,2±0,1 (84)	0,2±0,1 (16)	0,93
VK2- MK7 (µg/l)	0,1-0,82	1,9±4,4 (100)	2,1±4,8 (84)	1,1±0,8 (16)	0,42
cOC (µg/l)	4,0-12,0	16,7±9,9 (100)	17,6±10,3 (84)	12,5±5,2 (16)	**0,01**

	Normwerte	Gesamt	Frauen	Männer	p
ucOC (µg/l)	0,6-3,3	3,2±2,2 (100)	3,3±2,2 (84)	3,0±2,3 (16)	0,48
APKNO (µg/l)	<27,0	17,9±9,1 (100)	18,0±9,5 (84)	17,4±7,0 (16)	0,65
Vitamin D 25 (nmol/l)	50 – 118	80,8±18,3 (100)	81,3±17,4 (84)	78,6±22,8 (16)	0,45
Parathormon (pmol/l)	1,7 - 6,89	4,7±1,5 (100)	4,5±1,4 (84)	5,3±1,6 (16)	**0,03**
Calcium korr. (mmol/l)	2,0-2,6	2,3±0,1 (100)	2,3±0,1 (84)	2,3±0,1 (16)	0,97
Calcium (mmol/l)	2,0-2,6	2,4±0,1 (100)	2,4±0,1 (84)	2,4±0,1 (16)	0,62
AP (U/l)	35-104	73,1±24,9 (100)	71,8±26,1 (84)	68,7±17,9 (16)	0,62
GPT (U/I)	<35	22,4±13,1 (31)	19,9±7,9 (2)	32,8±23,7 (6)	0,95
GOT (U/I)	<35	27,5±31,3 (99)	27,9±33,9 (83)	25,5±10,4 (16)	0,80
GGT (U/I)	<40	27,2±21,7 (99)	26,1±20,1 (83)	33,0±28,9 (16)	0,21
Albumin (g/l)	35,0-52,0	43,6±2,7 (100)	43,7±2,5 (84)	42,9±3,5 (16)	0,14
GFR (ml/min)	>60	78,5±17,6 (99)	77,0±17,1 (83)	86,3±18,9 (16)	0,10
Kreatinin (mg/dl)	<0,9	0,8±0,2 (99)	0,8±0,2 (83)	1,0±0,3 (16)	**>0,01**
Homocystein (µmol/l)	<13	11,5±8,1 (100)	11,6±8,7 (84)	11,2±3,4 (16)	0,92
ß-Carotin (µg/l)	150-1250	773,2±332,8 (49)	538,2±343,4 (41)	669,9±395,9 (8)	0,37

Darstellung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des Gesamtkollektivs und aufgeteilt nach dem Geschlecht, p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) für Vergleich zwischen den Geschlechtern. AP-Knochen= alkalische Knochenphosphatase, Calcium korr.=Calcium-Albumin korrigiert.

Es zeigte sich, dass die Messwerte cOsteocalcin und Vitamin K2-MK7 durchschnittlich über der Norm lagen. Nach Aufteilung des Gesamtkollektivs am 1. MT in jene Patienten ohne (n=91) und mit (n=9) Vitamin K2-Substitution zeigten sich signifikant höhere Vitamin K2-MK7 Werte unter Vitamin K2-Substituition **(p<0,001**; Abbildung 8). Vitamin

K1, Vitamin K2-MK4 und uncarboxyliertes Osteocalcin lagen im Durchschnitt aller Patienten im Normbereich.

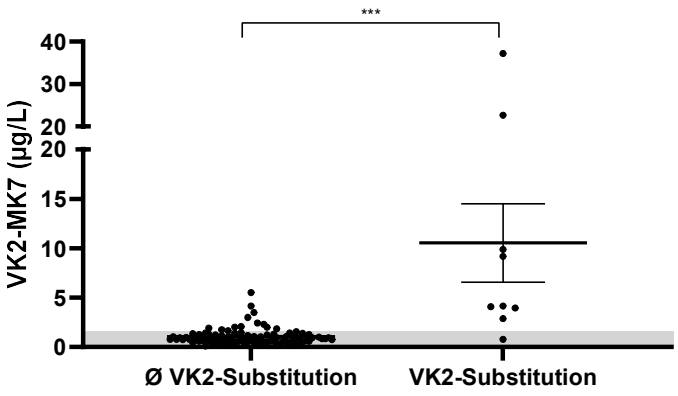

Abbildung 8: Höhe des Vitamin K2-MK7-Serumspiegels mit und ohne Vitamin K2-Substitution beim 1. Messtermin. Grau: Normbereich Vitamin K2-MK7: 0,1-0,82 µg/l.

Der t-Test der Mittelwertgleichheit ergab einen signifikanten Unterschied der Laborwerte cOsteocalcin (**p=0,008**), Parathormon **(p=0,029)** und Kreatinin **(p=0,003)** verglichen zwischen den Geschlechtern.

3.1.2.7 DXA- Messungen des Gesamtkollektivs

Nachdem die Laborwerte im Gesamtkollektiv dargestellt und verglichen wurden, werden folgend die Ergebnisse der Knochendichtemessungen des Gesamtkollektivs gezeigt.

Von insgesamt 98 Patienten lagen DXA-Messungen vor. Dabei wurden bei 84 Patienten diese im Endokrinologikum Göttingen durchgeführt, bei 14 Patienten erfolgte die Messung auswärtig. Es wurden die Messungen aller Patienten, unabhängig davon, mit welchem Messgerät die Messungen durchgeführt wurden, für den T-Score und Z-Score gemeinsam ausgewertet. Bei zwei Patienten lag keine Knochendichtemessung zum Zeitpunkt der Studie vor. Die folgenden Ergebnisse sind grafisch in Tabelle 10 dargestellt.

Die Patienten hatten im Mittel an der Wirbelsäule einen T Score von -1,9. Dieser Wert entspricht einer Osteopenie, da bei einer Osteoporose der T-Score als < -2,5 SD definiert ist. Es zeigte sich, dass der T-Score der Frauen im Mittel mit -2,0 niedriger war als der der Männer mit -1,6. Dafür hatten die Männer niedrigere T-Scores als die Frauen im gesamten linken Femur sowie dem rechten Femurhals. Zu berücksichtigen ist, dass die Männer mit 62,1 Jahren (SD±9,0; Range: 42 – 80) im Durchschnitt etwas jünger waren als die Frauen mit 64,9 Jahren (SD±9,5; Range: 43 – 80) durchschnittlich.

Tabelle 10: Knochendichtemessungen des Gesamtkollektivs

	Gesamt	Frauen	Männer	p
	MW±SD (n)	MW±SD (n)	MW±SD (n)	
WS T-Score	-1,9±1,6 (96)	-2,0±1,5 (83)	-1,6±1,9 (14)	0,37
WS Z-Score	-0,6±1,5 (94)	-0,4±1,5 (82)	-1,3±1,6 (13)	**0,05**
Femur li T-Score	-1,8±1,0 (86)	-1,8±1,0 (74)	-1,9±0,8 (12)	0,59
Femur li Z-Score	-0,6±0,9 (86)	-0,5±0,9 (74)	-1,1±0,9 (12)	**0,03**
Femurhals li T-Score	-1,9±0,7 (87)	-1,8±0,7 (74)	-2,2±0,7 (13)	0,08
Femurhals li Z-Score	-0,4±0,9 (86)	-0,3±0,7 (74)	-1,2±1,2(12)	**<0,001**
Femur re T-Score	-1,8±1,0 (84)	-1,8±0,9 (70)	-1,5±1,5(14)	0,40
Femur re Z-Score	-0,6±1,0 (82)	-0,5±0,9 (70)	-0,9±1,7(12)	0,45
Femurhals re T-Score	-1,8±0,8 (81)	-1,8±0,8 (70)	-2,1±0,9(11)	0,21
Femurhals re Z-Score	-0,4±0,9 (81)	-0,2±0,8 (70)	-1,1±0,9(11)	**0,003**
TBS	1,2±0,1 (84)	1,2±0,1 (74)	1,3±0,1(10)	**0,005**

Darstellung von T-Score, Z-Score, „trabecular bone score“ (TBS), Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des Gesamtkollektivs, t-Test für Vergleich zwischen den Geschlechtern (p-Wert), li=links, re=rechts.

3.2 „Nicht-substituiertes Verlaufskollektiv“ mit Laborwerten vom 1. und 2. Messtermin

Von 26 nicht mit Vitamin K2 substituierten Patienten des Gesamtkollektivs lagen Daten zum 1. und 2. Messtermin vor. Diese Patientengruppe wurde weder zum ersten noch zum zweiten Messtermin mit Vitamin K2 substituiert.

Um zu beschreiben, inwieweit sich die Laborwerte vom 1. und 2. Messtermin unterscheiden, ohne dass eine Vitamin K2-Supplementierung durchgeführt wurde, werden die Daten in Tabelle 11 vorgestellt. Es wurde keine signifikante Änderung erwartet, da an der Medikation der Patienten im Verlauf der Messtermine keine Änderung vorgenommen wurde. Für Osteocalcin und die alkalische Knochenphosphatase wurden die Labore von den fünf Patienten verwendet, die zu keinem Zeitpunkt Vitamin K2 substituiert haben und keine Osteoporose-spezifische Medikation eingenommen haben.

Tabelle 11: Laborwerte vom 1. und 2. MT des „Nicht-substituierten Verlaufskollektivs“

	Normwerte	**n**	**1. MT**	**2. MT**	**p**
			MW±SD	MW±SD	
Vitamin K1 (ng/l)	110-1150	26	627,8±556,3	551,4±354,4	0,92
Vitamin K2 MK4(µg/l)	0,1-0,86	26	0,2±0,1	0,1±0,1	0,10
Vitamin K2 MK7(µg/l)	0,1-0,82	26	1,1±0,8	1,2±1,4	0,08
cOsteocalcin (µg/l)	4,0-12,0	8	16,5±4,4	14,1±8,7	0,9
ucOsteocalcin (µg/l)	0,6-3,3	8	2,1±0,9	1,7±0,7	0,42
APKNO (µg/l)	<27,0	8	26,5±18,3	21,3±9,5	0,69
Vitamin D 25 (nmol/l)	50 – 118	26	76,8±23,5	84,8±19,6	**0,002**
Parathormon (pmol/l)	1,7 - 6,89	26	4,4±1,8	4,7±2,9	0,68
Calcium korr. (mmol/l)	2,0-2,6	26	2,3±0,1	2,4±0,1	0,21
Calcium (mmol/l)	2,0-2,6	26	2,4±0,1	2,4±0,1	0,23
AP (U/l)	35-104	26	76,7±33,4	70,8±24,1	0,19
GPT (U/I)	<35	2/1	33,0±25,5	27±0	0,18
GOT (U/I)	<35	26	27,2±9,1	25,4±7,3	0,23
GGT (U/I)	<40	26	31,3±27,0	28,5±24,8	0,18
Albumin (g/l)	35,0-52,0	26	42,9±2,7	42,8±2,1	0,71
GFR (ml/min)	>60	26	70,7±17,8	70,8±17,4	0,66
Kreatinin (mg/dl)	<0,9	26	0,8±0,2	0,8±0,2	0,89
Homocystein (µmol/l)	<13	26	13,9±14,3	11,5±4,8	0,40
ß-Carotin (µg/l)	150-1250	11/5	830,9±319,3	762,6-±269,8	0,20

Darstellung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des „Nicht-substituierten Verlaufskollektivs“ zum 1. Messtermin und zum 2. Messtermin, Anzahl der Patienten (n).

An der Höhe der messbaren Serumspiegel der Vitamin K2-relevanten Parameter hat sich im Verlauf vom ersten zum zweiten Messtermin keine signifikante Änderung gezeigt. Interessanterweise ergaben sich signifikant höhere Vitamin D-Werte **(p=0,002)** beim 2. Messtermin, ohne dass wissentliche Änderungen an der Vitamin D-Zufuhr der Patienten vorlagen. Insgesamt wurden 22 von den 26 Patienten über beide Messtermine vorrangig in den Wintermonaten Vitamin D supplementiert.

3.3 „Neu-substituiertes Kollektiv“

Unter den 100 Patienten des Gesamtkollektivs sind sechs Patientinnen, die zum ersten Messtermin keine Vitamin K2-Substitution erhalten haben, auf Grund pathologischer erhöhter ucOsteocalcin-Werte im Verlauf substituiert wurden und beim zweiten Messtermin dementsprechend als substituiert gelten. Folgend wird dieses Kollektiv anhand der gleichen Parameter wie das Gesamtkollektiv näher beschrieben. Dieses Kollektiv besteht ausschließlich aus postmenopausalen Frauen.

3.3.1 Biometrische Daten des „Neu-substituierten Kollektivs“

Die Patientinnen des „Neu-substituierten Kollektivs“ waren im Durchschnitt 65 Jahre alt mit einer SD von ±10,8 und einer Range von 47 – 80 Jahren. Somit sind sie hinsichtlich des Alters vergleichbar mit dem Gesamtkollektiv. Sie lagen sowohl mit ihrer Körpergröße als auch mit dem Gewicht und dem BMI im Normbereich und unterscheiden sich nicht vom Gesamtkollektiv (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 12: Biometrische Daten des „Neu-substituierten Kollektivs“

	MW±SD (n=6)
Gewicht	66,2±8,9
Größe	166,6±4,0
BMI	23,8±2,6

Darstellung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (SD), Anzahl der Patientinnen (n).

3.3.2 Medikation der Patientinnen im „Neu-substituierten Kollektiv“

Vergleichbar zum Gesamtkollektiv wurde auch im „Neu-substituierten Kollektiv“ die Medikation betrachtet. Die Auswertung hat gezeigt, dass alle Patientinnen des „Neu-substituierten Kollektivs“ zum ersten Messtermin Vitamin D (n=6) eingenommen haben. Calcium oder Teriparatid hat keine Patientin verordnet bekommen (n=0), eine Therapie mit Bisphosphonaten (n=2) und Denosumab (n=2) wurde bei jeweils zwei Patientinnen durchgeführt. Bei ebenfalls zwei Patientinnen zählten Protonenpumpeninhibitoren (n=2) zur Medikation.

3.3.3 Frakturen der Patientinnen im „Neu-substituierten Kollektiv“

Bei den Frakturen im „Neu-substituierten Kollektiv“ zeigte sich, dass von den sechs Patientinnen insgesamt vier mindestens eine Fraktur erlitten hatten. Bei der Hälfte der

Patientinnen (n=3) war die Fraktur im Bereich der Wirbelsäule lokalisiert, bei zwei Patientinnen in peripheren Knochen. Eine der sechs Patientinnen hatte Frakturen sowohl an der Wirbelsäule als auch peripher (siehe Abbildung 9).

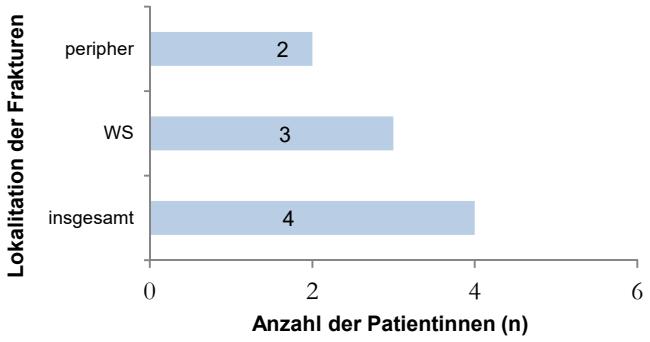

Abbildung 9: Frakturen der Patientinnen im „Neu-substituierten Kollektiv“ (n=6). Unterteilt nach Anzahl der Patientinnen mit Frakturen insgesamt und Lokalisation in Wirbelsäule und peripher.

3.3.4 Laborwerte vom 1. und 2. Messtermin des „Neu-substituierten Kollektivs“

Die Analyse der Vitamin K2-relevanten Parameter am 1. Messtermin dieses im Verlauf mit Vitamin K2 substituierten Kollektivs hat gezeigt, dass im Mittel die ucOsteocalcin-Werte über der Norm lagen, weshalb anschließend eine Vitamin K2-Substitution durchgeführt und damit angestrebt wurde, dass das ucOC unter Substitution wieder auf Normwerte sinken würde. In Tabelle 13 wird gezeigt, dass auch die Werte für Vitamin K2-MK7 sowie das carboxylierte Osteocalcin und das uncarboxylierte Osteocalcin zum 1. Messtermin in diesem Kollektiv im Mittel über der Norm lagen.

Tabelle 13: Laborwerte vom 1. und 2. MT des „Neu-substituierten Kollektivs“

	Normwerte	n	1. MT	2. MT	P
			MW±SD	MW±SD	
Vitamin K1 (ng/l)	110-1150	6	566,5±389,5	992,3±1475	0,92
Vitamin K2-MK4 (µg/l)	0,1-0,86	6	0,1±0,0	0,1±0,0	0,10
Vitamin K2-MK7 (µg/l)	0,1-0,82	6	1,0±0,8	5,0±3,7	0,08
cOsteocalcin (µg/l)	4,0-12,0	3	22,0±9,5	27,3±17,1	0,83
ucOsteocalcin (µg/l)	0,6-3,3	3	5,2±1,8	3,6±1,7	0,26
APKNO (µg/l)	<27,0	3	17,2±6,8	16,6±5,2	0,83
Vitamin D 25 (nmol/l)	50 – 118	6	71,8±24,0	87,5±6,0	0,17
Parathormon (pmol/l)	1,7 - 6,89	6	5,0±1,2	5,0±1,0	0,35
Calcium korr. (mmol/l)	2,0-2,6	6	2,4±0,1	2,3±0,1	0,32
Calcium (mmol/l)	2,0-2,6	6	2,4±0,1	2,5±0,1	0,56
AP (U/l)	35-104	6	71,7±35,8	67,8±35,0	0,18
GPT (U/I)	<35	2/0	22,5±9,2	-	-
GOT (U/I)	<35	6	29,8±18,9	28,2±17,7	0,10
GGT (U/I)	<40	6	27,5±24,3	26,7±21,4	0,60
Albumin (g/l)	35,0-52,0	6	44,1±2,7	44,6±2,2	0,25
GFR (ml/min)	>60	6	80,7±12,7	81,5±20,1	0,89
Kreatinin (mg/dl)	<0,9	6	0,8±0,1	0,8±0,2	1,0
Homocystein (µmol/l)	<13	6	12,2±2,6	12,3±3,1	0,53
ß-Carotin (µg/l)	150-1250	3/1	499,0±101,4	919,0	-

Darstellung von Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des „Neu-substituierten Kollektivs“ zum 1. Messtermin und 2. Messtermin, Anzahl der Patientinnen (n), Wilcoxon-Vorzeichentest, two-tailed.

3.3.5 DXA-Messungen des „Neu-substituierten Kollektivs“

Von allen sechs Patientinnen des „Neu-substituierten Kollektivs“ lagen DXA-Messungen vor (vgl. Tabelle 14). Bei der Auswertung der Knochendichtemessungen ergab sich ein mittlerer T-Score an der Wirbelsäule von -2,7 SD. Die T-Scores der peripheren Messungen an der Hüfte lagen im Mittel zwischen -1,8 SD und -1,4 SD. Somit scheinen die Hüftknochen der Patientinnen eine stabilere Substanz aufzuweisen als die Wirbelsäule.

Tabelle 14: Knochendichtemessungen des „Neu-substituierten Kollektivs“

	n	MW± SD
WS T-Score	6	-2,3±1,0
WS Z-Score	6	-1,2±1,1
Femur li T-Score	6	-1,8±0,9
Femur li Z-Score	6	-0,7±0,8
Femurhals li T-Score	5	-1,4±0,8
Femurhals li Z-Score	5	-0,4±0,9
Femur re T-Score	6	-1,5±0,9
Femur re Z-Score	6	-0,5±1,0
Femurhals re T-Score	6	-1,5±1,1
Femurhals re Z-Score	6	-0,3±1,1
TBS	5	1,2±0,1

Darstellung von „trabecular bone score“ (TBS), T-Score, Z-Score, Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) des „Neu-substituierten Kollektivs“.

3.4 Einfluss spezifischer Osteoporose-Therapie auf Vitamin K2-relevante Parameter

Nach der Beschreibung der Kollektive wurde zunächst analysiert, ob die Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter von der Einnahme Osteoporose-spezifischer Therapie beeinflusst wird, weil diese auch einen Einfluss die Knochendichte hat.

Da es sich im Gesamtkollektiv um Osteoporosepatienten handelte, die teilweise mit Osteoporose-spezifischer Therapie behandelt wurden, wurde verglichen, ob unter Einnahme der spezifischen Osteoporose-Therapie die Vitamin K2-relevanten Laborparameter signifikant verändert waren im Vergleich zu Patienten, die diese Therapie nicht einnehmen. Es zeigte sich, dass Osteoporose-spezifische Therapie sowohl die Höhe des Serumspiegels des carboxylierten als auch des uncarboxylierten Osteocalcins signifikant beeinflusst, dargestellt in Abbildung 10.

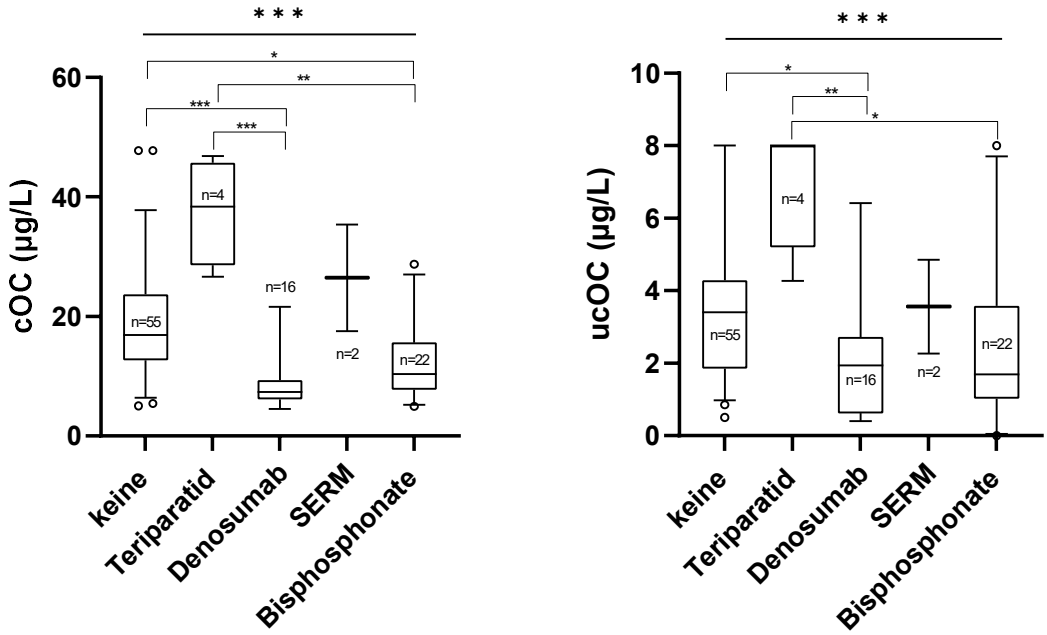

Abbildung 10: Messwerte von carboxyliertem und uncarboxyliertem Osteocalcin bei Einnahme osteoporosespezifischer Medikation zum 1. MT im Gesamtkollektiv (n=100) im Vergleich. *** p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001** Kruskal-Wallis mit posthoc paarweisem Vergleich (Bonferroni).

In der durchgeführten Gruppenvergleichsanalyse (Kruskal-Wallis) für nicht-normalverteilte Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Höhe der beiden Osteocalcin-Unterformen über alle verwendeten Medikamenten-Gruppen **(p<0,001)**. Bei der anschließenden Post-hoc Analyse wurden immer zwei Gruppen untereinander verglichen. Abbildung 13 zeigt die paarweisen Vergleiche (mit Bonferroni-Korrektur) bei den signifikanten Ergebnissen bei carboxyliertem und uncarboxyliertem Osteocalcin. Dabei stellten sich signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen Medikamenten-Gruppen heraus (Tabelle 15).

Tabelle 15: Gruppenvergleich bei spezieller Osteoporose-Therapie für carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin

	cOsteocalcin	**ucOsteocalcin**
	p	p
Denosumab-keine	**0,000*****	**0,082***
Denosumab-Teriparatid	**0,000*****	**0,005****
Bisphosphonate-keine	**0,022***	0,156
Bisphosphonate-Teriparatid	**0,005****	**0,009***

Zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100), signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen mit **p<0,001*****.

Bei Einnahme von Bisphosphonaten oder Denosumab zeigten sich signifikant niedrigere Osteocalcin-Messwerte im Vergleich zu Patienten, die diese Medikamente nicht einnehmen. Passend zum klinischen Eindruck zeigen die Daten, dass jene Patienten, welche mit Teriparatid behandelt werden, nicht-signifikant höhere Osteocalcin-Serumspiegel haben als Patienten, die keine spezifische Osteoporose-Medikation einnehmen. Wenn mittels Mann-Whitney-U-Test die Höhe des uncarboxylierten Osteocalcins mit und ohne Einnahme von Bisphosphonaten einzeln getestet wird, zeigen sich signifikant erniedrigte ucOC-Messwerte unter Bisphosphonat-Einnahme (**p=0,007**).

Ein signifikanter Einfluss der Einnahme spezifischer Osteoporose-Medikamente auf die Höhe der Serumspiegel von Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7 (Abbildung 11) stellte sich nicht heraus. Folglich verändert die Einnahme von Osteoporose-spezifischer Therapie die Höhe von Vitamin K1 und K2 nicht.

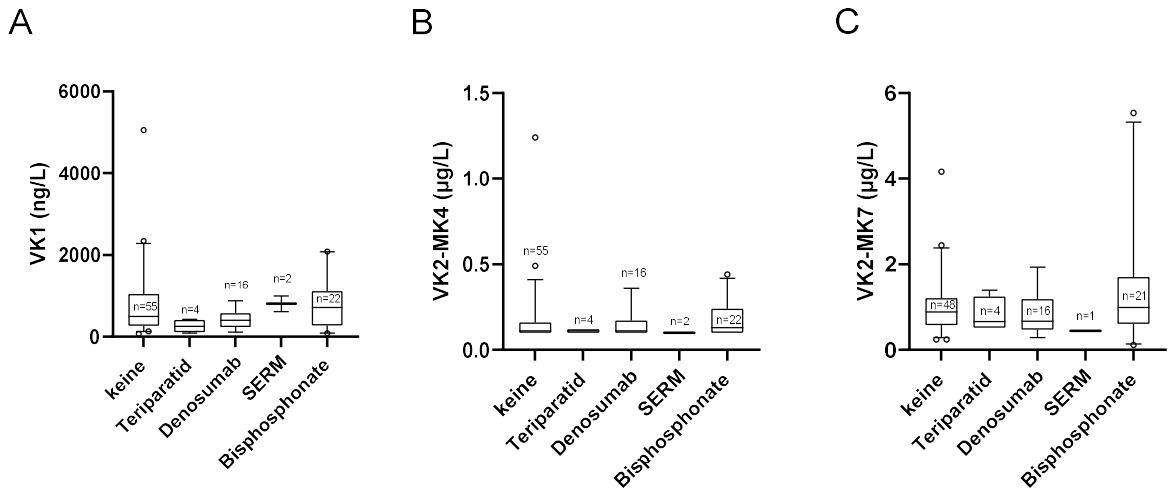

Abbildung 11: Höhe der Serumspiegel von Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7 bei Einnahme osteoporosespezifischer Medikation zum 1. MT im Gesamtkollektiv im Vergleich. N=100 bei Vitamin K1 und Vitamin K2-MK4 und im Gesamtkollektiv ohne die 9 bereits Substituierten mit n=91 bei Vitamin K2-MK7.

Auf Grund dieser Ergebnisse konnten im Verlauf für die Analysen mit Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7 alle 100 Patienten verwendet werden, für Untersuchungen mit Osteocalcin in den beiden Unterformen nur jene 55 Patienten, die keine knochenwirksame spezifische Osteoporose-Medikation einnehmen.

3.5 Verlauf der Vitamin K2-relevanten Parameter mit und ohne Vitamin K2-Substitution

Nachdem zuvor die Laborergebnisse der Gruppen einzeln betrachtet wurden, wurde untersucht, wie sich die gemessenen Vitamin K2-relevanten Parameter in den Kollektiven darstellen, unterscheiden und zu den Normwerten verhalten. Im Folgenden wird in Abbildung 12 eine Gegenüberstellung der Höhe der gemessenen Vitamin K2-relevanten Parameter des „Nicht-substituierten Verlaufskollektivs“ (n=26) und des „Neu-Substituierten Kollektivs“ (n=6) für Vitamin K1 und K2 gezeigt. Für Osteocalcin wurden die Patienten mit Osteoporose-spezifischer Medikation ausgeschlossen. Es blieben zum 1. MT acht und zum 2. MT drei Patienten für diese Analyse.

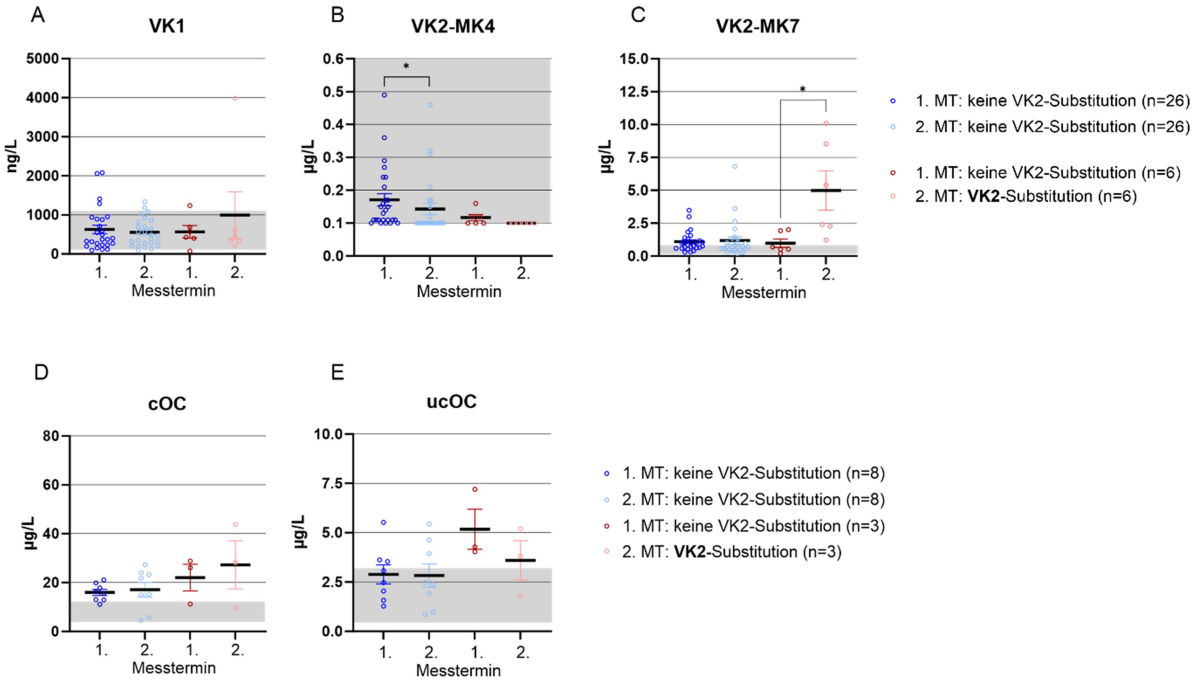

Abbildung 12: Vergleich der Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter zum 1. und 2. Messtermin des „Nicht-substituierten Verlaufskollektivs“ und des „Neu-substituierten Kollektivs“. „Nicht-substituiertes Verlaufskollektiv“ – in blau dargestellt – und „neu-substituiertes Kollektiv“ – in rot dargestellt. In grau sind die Normwerte der gemessenen Parameter hinterlegt: **(A)** VK1:110-1150 ng/l, **(B)** VK2-MK4: 0,1-0,86 µg/l, **(C)** VK2-MK7: 0,1-0,82 µg/l, **(D)** cOC: 4,0-12,0 µg/l, **(E)** ucOC: 0,6-3,3 µg/l. *p<0,05 Wilcoxon paarweiser Vergleich, one-tailed.

Unter der Annahme, dass unter Vitamin K2-Substitution die Messwerte für Vitamin K2 ansteigen, wurde ein Wilcoxon-Vorzeichentest „one-tailed“ angewandt. Aus Abbildung 12 C lässt sich entnehmen, dass die Substitution von Vitamin K2 zu einer signifikanten Erhöhung **(p<0,05)** der messbaren Vitamin K2-MK7-Serumspiegel führt. Ein Absinken der ucOC-Werte ist unter Vitamin K2-Substitution im Verlauf vom 1. zum 2. Messtermin

sichtbar, dieses Ergebnis ist aber nicht signifikant (p=0,35) (Abbildung 12 E).
Das gemessene Vitamin K2-MK4 war im „Nicht-substituierten Kollektiv“ beim 2. Messtermin signifikant niedriger **(p=0,045)** als beim 1. MT. Da sich die Höhe des Vitamin K2-MK7 nicht ändert und die Messung des Vitamin K2-MK4 bei sehr kurzer Halbwertszeit nur einen geringen wissenschaftlichen Nutzen aufweist, wird dieses Ergebnis nur am Rande erwähnt.

3.6 Korrelationen der Laborwerte des Gesamtkollektivs

Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass niedrigere Werte für das länger wirksame Vitamin K2-MK7 mit einem erhöhten uncarboxylierten Osteocalcin korrelieren und dass durch die anschließende Vitamin K2-Aufnahme die entsprechenden Werte beeinflusst werden können. Auch ein Zusammenhang der Serumspiegel des carboxylierten und des uncarboxylierten Osteocalcins wurde erwartet.
Es wurden die Vitamin K2-relevanten Parameter (Vitamin K1, Vitamin K2-MK4/MK7, carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin) und zusätzlich der Parameter alkalische Knochenphosphatase (APKNO), als Marker für den Knochenstoffwechsel, miteinander korreliert (Pearson Korrelation; Tabelle 16). Dafür wurden alle Labore (sowohl vom 1. als auch 2. Messtermin), die für diese Studie zur Verfügung standen (n=146), für die Parameter Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7 verwendet, auch ohne zu unterscheiden, ob eine Vitamin K2-Substitution stattgefunden hat oder nicht. Für Osteocalcin in den beiden Unterformen und der alkalischen Knochenphosphatase wurden die 55 Patienten (mit Verlaufslaboren insgesamt n=70 Laboruntersuchungen) verwendet, die keine knochenwirksame spezifische Osteoporose-Medikation eingenommen haben.

Tabelle 16: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter und der alkalischen Knochenphosphatase

		VK1	VK2-MK4	VK2-MK7	cOC	ucOC	APKNO
Vitamin K1	R	1	0,172	-0,002	0,039	-0,113	0,025
	Sign.		**0,04**	0,98	0,75	0,35	0,83
	n	146	146	146	70	70	70
Vitamin K2-MK4	R	0,172	1	-0,09	-0,077	-0,135	-0,115
	Sign.	**0,04**		0,28	0,52	0,26	0,34
	n	146	147	147	70	70	70
Vitamin K2-MK7	R	-0,002	-0,09	1	0,210	0,089	-0,027
	Sign.	0,98	0,28		0,08	0,42	0,82
	n	146	147	147	70	70	70
cOC	R	0,039	-0,077	0,210	1	0,473	0,476
	Sign.	0,75	0,52	0,08		**<0,001**	**<0,001**
	n	70	70	70	70	70	70
ucOC	R	-0,113	-0,135	0,089	0,473	1	0,204
	Sign.	0,34	0,26	0,42	**<0,001**		0,09
	n	70	70	70	70	70	70
APKNO	R	0,025	0,115	-0,027	0,476	0,204	1
	Sign.	0,84	0,34	0,82	**<0,001**	0,09	
	n	70	70	70	70	70	70

Verwendung aller für die Studie vorliegenden Labore (n=146) bei Vitamin K1, VK2-MK4 und VK2-MK7, Verwendung aller Labore der Patienten ohne Osteopose-spezifische Medikation (n=70) für cOC, ucOC und APKNO, R=Korrelationskoeffizient bei Pearson-Korrelation, Sign.=Signifikanz,

Es zeigt sich ein schwacher signifikanter Zusammenhang zwischen dem carboxylierten und dem uncarboxylierten Osteocalcin **(p=<0,001).** Auch zwischen APKNO und carboxyliertem Osteocalcin **(p=<0,001)** sowie zwischen Vitamin K2-MK4 und Vitamin K1 **(p=0,03)** ist der Zusammenhang signifikant.

Die in der Ausgangshypothese angenommene signifikante Korrelation zwischen Vitamin K2-MK7 und uncarboxyliertem Osteocalcin bestätigen die hier vorgestellten Daten nicht. Für das carboxylierte Osteocalcin und Vitamin K2-MK7 zeichnet sich eine Tendenz für eine positive Korrelation, jedoch kein signifikanter Zusammenhang (p=0,095), ab.

Bei jenen Laborparametern, bei denen ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte, wurden die Ergebnisse zur Verdeutlichung in Abbildung 13 grafisch dargestellt.

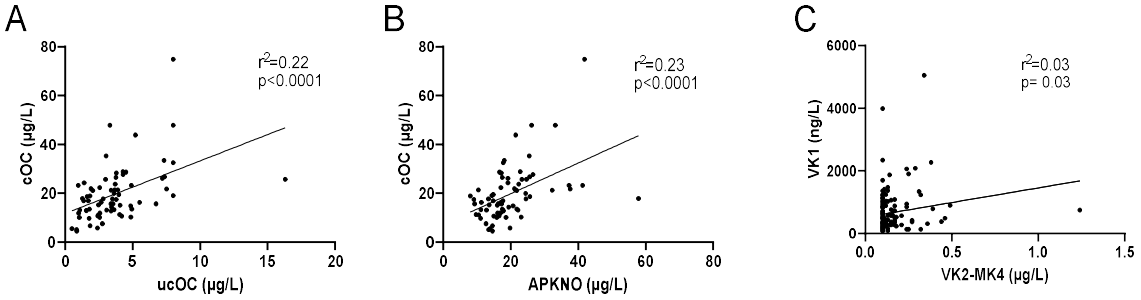

Abbildung 13: Streudiagramme mit linearer Regression von (A) cOsteocalcin und ucOsteocalcin (n=55), (B) cOsteocalcin und APKNO (n=70) und (C) Vitamin K1 und Vitamin K2-MK4 (n=146).

Die lineare Regression von carboxyliertem und uncarboxyliertem Osteocalcin ergaben r^2 =0,3, **p=<0,001** sowie eine Regressionsgerade mit der Steigung 2,6. Bei einer Zunahme des uncarboxylierten Osteocalcins um 1 µg/l stieg der Wert für das carboxylierte Osteocalcin um 2,6 µg/l an. Bei cOsteocalcin und der alkalischen Knochenphosphatase ergab die lineare Regression r^2 =0,35, **p=<0,001** sowie eine Regressionsgerade mit der Steigung 0,7. Bei einer Zunahme der alkalischen Knochenphosphatase um 1 µg/l erhöhte sich das carboxylierte Osteocalcin um 0,7 µg/l.Bei der linearen Regression von Vitamin K1 und Vitamin K2-MK4 zeigte sich ein schwacher Zusammenhang mit r^2 =0,03, **p=0,03** sowie eine Regressionsgerade mit der Steigung 943,6. Folglich nahm bei einer Zunahme des Vitamin K1 um 943,6 ng/l der Wert für Vitamin K2-MK4 um 1 µg/l zu.

Der in der Ausgangshypothese erwartete signifikante Zusammenhang zwischen uncarboxyliertem Osteocalcin und Vitamin K2-MK7 konnte im Rahmen der hier durchgeführten Analysen nicht bestätigt werden. Dies ist zur Verdeutlichung in der folgenden Abbildung 14 als einfaches Streudiagramm für die untersuchten Patienten ohne Osteoporose-Medikation grafisch dargestellt.

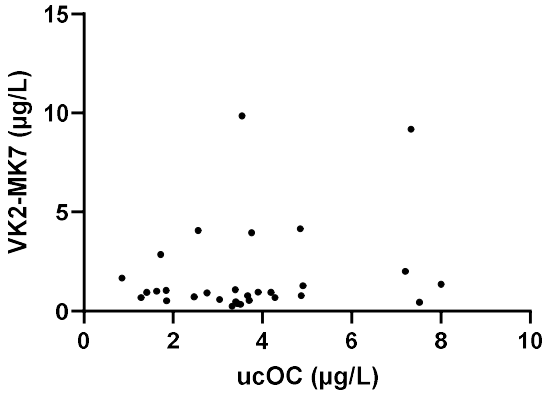

Abbildung 14: Streudiagramm ohne signifikanten linearen Zusammenhang von nichtcarboxyliertem Osteocalcin und Vitamin K2-MK7 (n=30).

3.7 Einflussgrößen auf die Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter

3.7.1 Einnahme sonstiger Medikation

Wie anfangs beschrieben wurden einige Patienten auch mit „sonstiger Medikation" therapiert, die nicht der Behandlung der Osteoporose dienen, aber für deren Krankheitsverlauf relevant sein können. Folgend wurde untersucht, ob die Höhe der gemessenen Vitamin K2-relevanten Parameter von der Einnahme anderer Medikation beeinflusst wird. Dabei wurden vor allem Protonenpumpeninhibitoren und Acetylsalicylsäure in antikoagulatorischer Dosierung verglichen, da hierfür das zur Verfügung stehende Kollektiv an Patienten am größten war. In der Analyse zeigte sich, dass Patienten, die Protonenpumpeninhibitoren eingenommen haben, signifikant höhere Vitamin K2-MK4-Werte **(p=0,034)** hatten als Patienten, die diesen Wirkstoff nicht einnehmen (Abbildung 15). Bezüglich Vitamin K2-MK7 und Vitamin K1 und der Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren zeigte sich kein Zusammenhang.

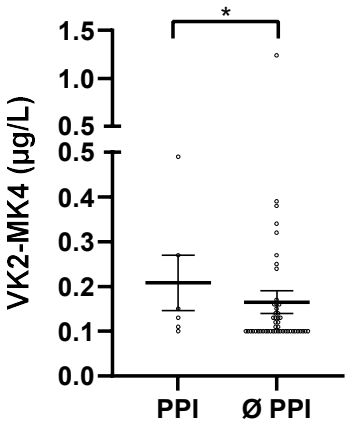

Abbildung 15: Höhe der Vitamin K2-MK4-Spiegel mit und ohne Einnahme von PPI im Vergleich.

Bei Verwendung des Gesamtkollektivs (n=100) stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Einnahme von ASS und der Höhe des uncarboxylierten Osteocalcins heraus. Dabei ergab sich, dass bei Patienten die ASS verordnet bekommen haben, signifikant höhere ucOC-Werte **(p=0,038)** messbar waren als bei Patienten ohne ASS als Medikation. Bei ausschließlicher Verwendung der Patienten ohne spezielle Osteoporosemedikation (n=55) zeigte sich dieser Zusammenhang nicht mehr signifikant.

3.7.2 Alter

Im Anschluss wurde untersucht, ob die Serumspiegel der im Rahmen dieser Studie verwendeten Vitamin K2-relevanten Parameter vom Alter der Patienten beeinflusst werden.

Dabei stellte sich ein schwacher signifikant linearer Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und Höhe der Vitamin K1-Serumspiegel **(p=0,012)** heraus, siehe Abbildung 16.

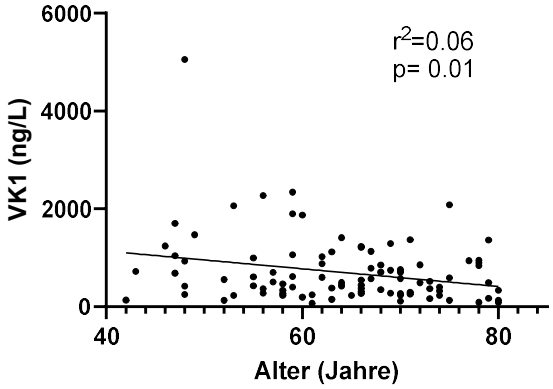

Abbildung 16: Streudiagramm mit linearer Regression von Vitamin K1 und dem Alter der Patienten.

Die lineare Regression von Vitamin K1 und dem Alter der Patienten ergaben r^2=0,06; **p=0,01** und eine Regressionsgerade mit der Steigung -18. Schlussfolgernd sinkt bei einer Zunahme des Alters um ein Jahr der Wert für Vitamin K1 um 18 ng/l ab.

Bei den anderen Vitamin K2-relevanten Parametern zeigte sich kein Zusammenhang mit dem Alter.

3.7.3 BMI

Nachfolgend wurde ein möglicher Einfluss des BMI auf die Höhe der Vitamin K2-relevanten Laborparameter getestet. Ein Ausschnitt aus der durchgeführten Pearson-Korrelation ist in der folgenden Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit dem BMI

		VK1	VK2-MK4	VK2-MK7	cOC	ucOC
BMI	R	0,041	-0,099	0,205	-0,074	0,145
	Sign.	0,69	0,33	**0,04**	0,59	0,29
	n	100	100	100	55	55

Es zeigte sich im Gesamtkollektiv (n=100) ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem BMI und Vitamin K2-MK7 **(p=0,04).** Abbildung 17 zeigt, dass bei höherem BMI höhere Serumspiegel von Vitamin K2-MK7 messbar waren.

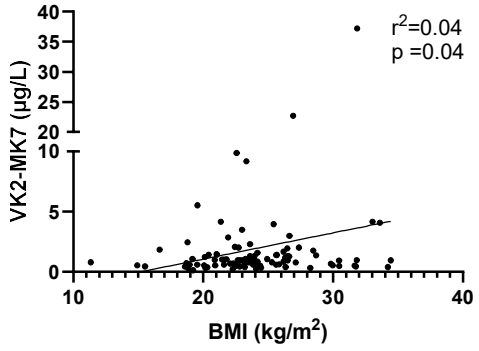

Abbildung 17: Streudiagramm mit linearer Regression von Vitamin K2-MK7 und dem BMI. **P=0,04**.

Bei Vitamin K1, Vitamin K2-MK4, carboxyliertem und uncarboxyliertem Osteocalcin zeigte sich bei unseren Analysen sowohl im Gesamtkollektiv (n=100) als auch im nicht mit spezifischer Osteoporose-Therapie behandelten Kollektiv (n=55) in Bezug auf den BMI kein signifikanter Zusammenhang.

3.8 Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit der Knochendichte

Nachdem die Vitamin K2-relevanten Parameter untereinander korreliert und verglichen wurden, überprüften wir mögliche Zusammenhängen zwischen der Knochendichte und der Höhe der Serumspiegel der Vitamin K2-relevanten Parameter.

Dafür wurden die Vitamin K2-relevanten Parameter mit den T-Scores, den Z-Scores und der TBS korreliert. Die Z-Scores sind dabei schon für das Alter korrigiert.

Mit den T-Scores und den Vitamin K2-relevanten Parametern wurde eine Pearson-Korrelation durchgeführt. Es zeigte sich, wie in Tabelle 18 dargestellt, kein signifikanter Zusammenhang.

Tabelle 18: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit den T-Scores der DXA im Gesamtkollektiv

		VK1	VK2-MK4	VK2-MK7	cOC	ucOC
WS T-Score	R	-0,146	-0,126	-0,095	0,089	0,146
	Sign.	0,16	0,22	0,36	0,39	0,15
	N	96	97	97	97	97
Femur li T-Score	R	-0,014	-0,156	0,038	-0,022	-0,063
	Sign.	0,90	0,15	0,73	0,84	0,57
	N	85	86	86	86	86
Femurhals li T-Score	R	-0,046	-0,075	0,092	0,104	0,065
	Sign.	0,67	0,49	0,40	0,337	0,549
	N	86	87	87	87	87
Femur re T-Score	R	-0,153	-0,163	0,014	0,076	0,072
	Sign.	0,167	0,138	0,9	0,493	0,518
	N	83	84	84	84	84
Femurhals re T-Score	R	-0,146	-0,146	0,052	0,092	0,068
	Sign.	0,196	0,193	0,643	0,416	0,546
	N	80	81	81	81	81

R=Korrelationskoeffizient, Sign.=Signifikant, n=Anzahl, li= links, re= rechts.

Tabelle 19 zeigt die Korrelationen der fünf Vitamin K2-relevanten Parameter mit den Parametern Z-Score und TBS der DXA-Messung.

Tabelle 19: Pearson-Korrelation der Vitamin K2-relevanten Parameter mit den Z-Scores der DXA und dem TBS im Gesamtkollektiv

		VK1	VK2-MK4	VK2-MK7	cOC	ucOC
WS Z-Score	R	-0,212	-0,077	-0,158	0,019	-0,031
	Sign.	**0,04**	0,46	0,13	0,86	0,76
	N	94	95	95	95	95
Femur li Z-Score	R	-0,154	-0,091	-0,035	-0,054	-0,179
	Sign.	0,16	0,41	0,75	0,62	0,10
	N	85	86	86	86	86
Femurhals lis Z-Score	R	-0,250	0,009	-0,021	-0,027	-0,215
	Sign.	**0,02**	0,94	0,85	0,81	**0,04**
	N	85	86	86	86	86
Femur re Z-Score	R	-0,233	-0,077	-0,046	0,041	-0,056
	Sign.	**0,04**	0,49	0,68	0,71	0,62
	N	81	82	82	82	82
Femurhals re Z-Score	R	-0,284	-0,08	-0,054	0,01	-0,045
	Sign.	**0,01**	0,48	0,63	0,93	0,70
	N	80	81	81	81	81
TBS	R	-0,024	0,076	-0,051	-0,15	-0,229
	Sign.	0,83	0,49	0,65	0,17	**0,04**
	N	83	84	84	84	84

Tabelle 19 veranschaulicht, dass es sowohl signifikante Korrelationen zwischen Vitamin K1 und einigen Z-Scores als auch zwischen ucOC und Z-Scores der DXA-Messungen gibt. Zudem zeigt sich, dass je höher die Messwerte für das uncarboxylierte Osteocalcin sind, desto niedriger und damit schlechter ist der TBS, damit die Knochenstruktur.

Nach der Pearson-Korrelation wurde für die signifikanten Ergebnisse eine lineare Regression (Tabelle 20) durchgeführt, um einen Zusammenhang der Werte zu zeigen.

Tabelle 20: Lineare Regression der signifikanten Ergebnisse für die Vitamin K2-relevanten Parameter mit den Z-Scores

Lineare Regression	**p**
Vitamin K1 mit WS Z-Score	**p=0,000**
Vitamin K1 mit Femurhals links Z-Score	**p=0,001**
Vitamin K1 mit Femur rechts Z-Score	**p=0,011**
Vitamin K1 mit Femurhals rechts Z-Score	**p=0,005**
ucOC mit Femurhals links Z-Score	**p=0,001**
ucOC mit TBS	**p=0,034**

Da keine signifikanten Zusammenhänge für die T-Scores und vereinzelte signifikante Zusammenhänge der Z-Scores mit den Vitamin K-Werten ermittelt werden konnten, wurde eine weitere Methode angewandt, um mögliche Zusammenhänge zwischen den Vitamin K2-relevanten Parametern und den beiden Knochendichteparametern zu überprüfen. Dazu wurden die Laborparameter Vitamin K1, Vitamin K2-MK7, carboxyliertes und uncarboxyliertes Osteocalcin in Quartile eingeteilt. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests wurden die Knochendichteparameter in den Quartilen der Laborwerte verglichen. Die Quartile der einzelnen Parameter waren wie folgt (Tabelle 21) definiert:

Tabelle 21: Quartile von VK1, VK2-MK7, cOC, ucOC und APKNO im Gesamtkollektiv

	VK1 (ng/l)	**VK2-MK7 (µg/l)**	**cOC (µg/l)**	**ucOC (µg/l)**	**APKNO (µg/l)**
1. Quartil	72-272	0,1-0,6	4,5-9,8	0-1,5	6,1-11,6
2. Quartil	272-493	0,6-1	9,8-15	1,5-2,8	11,6-16,5
3. Quartil	493-895	1-1,4	15-21,3	2,8-4,3	16,5-21,7
4. Quartil	895-5050	1,4-37,2	21,3-47,8	4,3-8	21,7-57,9

Der Gruppenvergleich (Kruskal-Wallis für nicht-normalverteile Werte) der vier Quartile des Vitamin K1-Wertes ergab für den Z-Scores des linken Femurs ein signifikantes Ergebnis **(p=0,024)** (Abbildung 18).

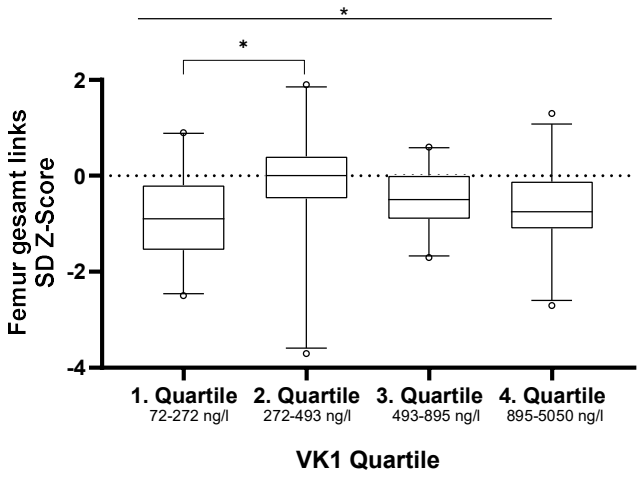

Abbildung 18: Quartilevergleich von Vitamin K1 und Höhe des Z-Score des gesamten linken Femurs zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100). ***P<0,05** Kruskal-Wallis mit posthoc paarweisem Vergleich (Bonferroni).

Die paarweisen Vergleiche für die Unterschiede zwischen den Quartilen waren signifikant zwischen dem 1. und 2. Quartil **(p=0,004)** sowie zwischen dem 1. und 4. Quartil **(p=0,020).** Letzterer ist jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant. Die Abbildung lässt einen Zusammenhang in Form einer umgedrehten Parabel erahnen (*U-shape-Curve).* Daraus könnte geschlossen werden, dass bei einem physiologischen Z-Score mittelhohe Vitamin K1-Werte vorliegen. Sowohl zu hohe als auch zu niedrige Vitamin K1-Werte scheinen einen niedrigeren und somit schlechteren Z-Score zu begünstigen. Die Ergebnisse dieser explorativen Studie bedürfen Bestätigung und weiterer Analysen.

Bei allen anderen analysierten DXA-Werten und Vitamin K2-relevanten Parametern waren die Ergebnisse nicht signifikant.

Da bei dem Parameter Vitamin K2-MK4 die Laborwerte sehr nah beieinanderlagen und zu wenige Patienten in einer Quartile-Gruppe gewesen wären, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. Für Vitamin K2-MK4 (µg/l) liegt der Median bei 0,1. Die erste Gruppe war demnach definiert von 0 bis 0,1 µg/l und die zweite von 0,1 bis 1,24 µg/l. Der anschließende Vergleich ergab ein signifikantes Ergebnis für den Z-Score vom linken Femurhals. Es zeigt sich, dass Patienten mit

niedrigeren Vitamin K2-MK4-Werten einen signifikant niedrigeren Z-Score am linken Femurhals aufweisen (**p=0,035**).

Nachdem die Ergebnisse der DXA-Messungen zuerst tabellarisch (Tabelle 10) dargestellt und dann mit den Vitamin K2-relevanten Messparametern korreliert wurden (Tabelle 18, Tabelle 19), wurde anschließend überprüft, ob sich diese Ergebnisse unterscheiden, wenn die Patienten Osteoporose-spezifische Medikamente eingenommen haben im Vergleich zu denen, die diese Therapie nicht erhalten haben.
Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Z-Score des Femurhals rechts **(p=0,032).** Dies ist in der folgenden Abbildung 19 grafisch dargestellt.

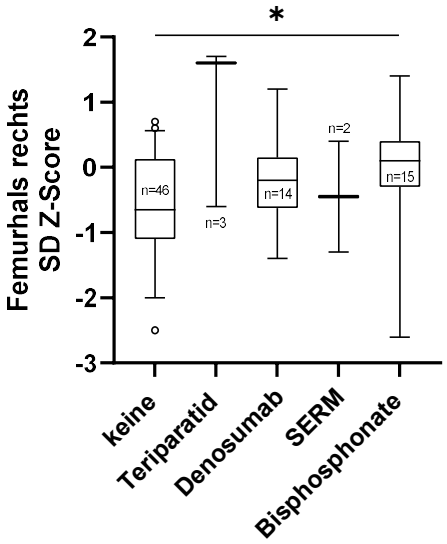

Abbildung 19: Vergleich der Einnahme osteoporosespezifischer Therapie und Höhe des Z-Scores des rechten Femurhalses zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100). SD= Standardabweichung.

Auch hier wurde analysiert, welche Gruppen untereinander signifikant unterschiedlich sind. Dabei zeigten sich trotz einer gemittelten Signifikanz zwischen allen Gruppen keine signifikanten Ergebnisse in den einzelnen Analysen.

Da der Großteil der Patienten das 50. Lebensjahr erreicht hatte, ist als Parameter vorrangig der T-Score für die Analysen relevant und die Untersuchungen mit dem Z-Score werden der Vollständigkeit halber erwähnt.

3.9 Zusammenhang der Vitamin K2-relevanten Parameter und Frakturen

Da für die Patienten das Vorliegen von Frakturen maßgeblich für den Verlauf der Krankengeschichte ist, testeten wir, ob es Zusammenhänge zwischen der Höhe der Serumspiegel der Vitamin K2-relevanten Laborparameter und dem Vorliegen von Frakturen im Gesamtkollektiv gibt.

Der nach dem Levene-Test der Varianzengleichheit durchgeführte t-Test für die Mittelwertgleichheit ergab, dass Patienten mit Frakturen (n=60) – nicht unterteilt in der Lokalisation in Wirbelsäule oder peripher – einen signifikant niedrigeren Serumspiegel des carboxylierten Osteocalcins **(p=0,01)** hatten im Vergleich zu Patienten ohne Fraktur (n=40), wie in Abbildung 20 dargestellt. Nach Aufteilung der Frakturen in einzelne Lokalisationen (Wirbelsäule/peripher) ist diese Signifikanz nicht mehr sichtbar.

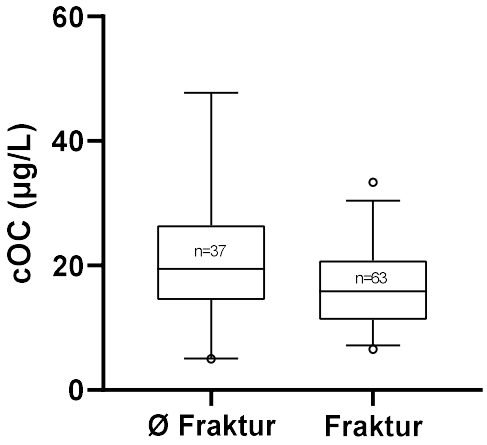

Abbildung 20: cOsteocalcin-Spiegel bei Patienten mit und ohne Fraktur zum 1. Messtermin im Gesamtkollektiv (n=100). **P=0,01**.

Wenn ausschließlich jene Patienten betrachtet werden, die keine Osteoporose-spezifische Therapie einnehmen (n=55), ist die Signifikanz für ein niedrigeres carboxyliertes Osteocalcin bei Patienten mit Fraktur im Vergleich zu jenen ohne Fraktur nicht mehr sichtbar, es gibt nur noch eine Tendenz (p=0,08) für niedrigere cOsteocalcin-Werte bei Patienten mit Frakturen.

Bei den anderen verwendeten Vitamin K2-relevanten Parametern und auch bei der alkalischen Knochenphosphatase zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der gemessenen Laborwerte und dem Vorliegen von Frakturen.

Anschließend wurde mittels Kreuztabelle für die Vitamin K2-relevanten Parameter getestet, ob es Unterschiede im Vorliegen von Frakturen gibt, wenn unterschiedliche spezifische Osteoporosemedikamente eingenommen wurden. Dabei zeigte sich kein

signifikanter Unterschied (Chi^2) beim Vorliegen von Frakturen zwischen der Einnahme und der Nicht-Einnahme diverser spezifischer Osteoporosemedikation.

Somit kann die Ausgangshypothese, die einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Frakturen und dementsprechend veränderten Vitamin K2-relevanten Laborparametern erwarten ließ, nicht bestätigt werden.

Wichtig für die Einordnung hierbei ist, dass es sich, wie bereits erwähnt, bei den Angaben zu den Frakturen nur um anamnestische Angaben aus dem Patientenfragebogen handelt und dass Patienten mit Frakturen eher mit Osteoporose-spezifischer Therapie behandelt werden.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studie zusammengefasst und mit der Literatur verglichen.

Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich um 100 Osteoporosepatienten, die im Zeitraum Januar 2019 bis April 2020 im Endokrinologikum Göttingen behandelt wurden. Es waren vorrangig postmenopausale Frauen (n=84, 84%) und zusätzlich 16 Männer (16%). Das Gesamtkollektiv war im Mittel 64,2 Jahre alt (Range: 42-80 Jahre), aufgeteilt nach dem Geschlecht waren die männlichen Patienten mit 62,1 Jahren etwas jünger als das weibliche Kollektiv mit 64,9 Jahren. Der mittlere BMI lag im normwertigen Bereich von 23,6 kg/m². In unserem Patientenkollektiv haben anamnestisch 60% im Laufe ihres bisherigen Lebens mindestens eine, einige Patienten auch mehrere Frakturen erlitten. 45% des Gesamtkollektivs nahmen eine Osteoporose-spezifische Medikation ein. Bei den Auswertungen der Knochendichtemessungen zeigte sich bei unserem Gesamtkollektiv, dass die Männer tendenziell schlechtere Messwerte in den peripheren Knochen (Femur) aufwiesen, wohingegen die Frauen eine im Geschlechtervergleich schlechtere Knochensubstanz der Wirbelsäule hatten.

Die *Bone Evaluation Study-2* (BEST-2) hat als Kohortenstudie den Status in Deutschland für die Jahre 2013-2018 hinsichtlich der Prävalenz der Osteoporose sowie der Versorgungssituation der deutschen Bevölkerung im Alter von ≥ 50 Jahren und den epidemiologischen Charakteristika erfasst. Dafür wurde auf Basis der InGef-Datenbank (Instituts für angewandte Gesundheitsforschung Berlin) aus Daten der gesetzlichen Krankenkassen eine Stichprobe von ca. vier Millionen Versicherten herangezogen, die hinsichtlich des Geschlechts und des Alters repräsentativ für die deutsche Gesamtbevölkerung war. Es wurde beschrieben, dass für das Jahr 2018 der Anteil von Osteoporose-Patienten in der deutschen Allgemeinbevölkerung auf etwa 5,87 Millionen geschätzt wurde. Dabei handelte es sich bei 81,6% der Erkrankten um Frauen. Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei 69,4 Jahren (±10,5 Jahre), das der Männer bei 67,6 Jahren (±9,8 Jahre). Bei 39,0% der betrachteten Patienten lag eine Fraktur vor. Eine Osteoporose-spezifische knochenwirksame Medikation haben 30,0% der Patienten in der Studienpopulation erhalten. Bei diesen Patienten war eine Osteoporose diagnostiziert worden und/oder eine osteoporotische Fraktur lag vor (Hadji et al. 2024).

Zusammenfassend ist unser Studienkollektiv im Vergleich zur beschriebenen Literatur breit angelegt. Die von uns untersuchten Patienten sind im Mittel jünger und kränker, erkennbar an prozentual mehr Patienten mit Osteoporose-spezifischer Fraktur und Medikation.

Mit dieser Studie soll ein Überblick über die Vitamin K2-Versorgung der Osteoporose-Patienten unseres Kollektivs gewonnen werden. Dafür wurden die Laborwerte im Blutserum mit unterschiedlichen Verfahren bestimmt. Vitamin K wurde in unserem Projekt mit der LC-MS/MS-Methode gemessen, Osteocalcin mit Hilfe eines CLIA.
Um die im Rahmen unserer Studie gemessenen und verwendeten Laborwerte übersichtlich darzustellen, wurden die Patienten in das Gesamtkollektiv (n=100) mit einem Labor zum 1. Messtermin und anschließend in das „Nicht-Substituierte Verlaufskollektiv“ (n=26) und das „Neu-Substituierte Kollektiv“ (n=6) zum 1. und 2. Messtermin aufgeteilt.
In der laborchemischen Untersuchung zeigte sich bei der Betrachtung der analysierten Daten des Gesamtkollektivs (n=100), dass die Serum-Messpiegel von Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und uncarboxyliertem Osteocalcin im Durchschnitt im Normbereich lagen. Das carboxylierte Osteocalcin und Vitamin K2-MK7 lagen durchschnittlich außerhalb des Referenzbereichs über der Norm.
Bereits in älteren Studien wurde beschrieben, dass bei postmenopausalen osteoporotischen Frauen die Serumspiegel von carboxyliertem Osteocalcin normal, niedrig oder hoch waren (Price et al. 1980; Brown et al. 1984). Diese unterschiedliche Reaktion wurde auf die Variabilität der Knochenbildungsrate bei der Osteoporose zurückgeführt (Calvo et al. 1996). Dementsprechend scheint es sich in unserem Kollektiv vorrangig um Patienten mit dem histologischen Korrelat einer high-turnover Osteoporose zu handeln, da die Osteocalcinspiegel im Gesamtkollektiv hoch waren. Passend dazu lagen auch andere Knochenstoffwechselparameter, wie die alkalische Knochenphosphatase, eher im höheren Messbereich. Das im Mittel erhöht gemessene Vitamin K2-MK7 könnte dadurch begründet sein, dass, wie in der Einleitung beschrieben, Vitamin K2-MK7 mit einer HWZ von über 60 Stunden lange stabil und somit länger nachweisbar ist (Sato et al. 2012). Uncarboxyliertes Osteocalcin als indirekter Marker für die Vitamin K-Versorgung war bei unseren Analysen im Gesamtkollektiv (n=100) grenzwertig hoch, aber noch im Normbereich. Somit scheint die Vitamin K2-Versorgung im Gesamtkollektiv (n=100) im Durchschnitt aller Patienten zum 1. Messtermin ausreichend zu sein.
Bei den aufgeteilten Kollektiven mit Verlaufsmessungen stellten sich die Ergebnisse anders dar. Im „Neu-Substituierten Kollektiv“ (n=6) lagen die Messwerte für Vitamin K2-MK7 sowie das carboxylierte und das uncarboxylierte Osteocalcin zum 1. Messtermin über dem

Normbereich. Wegen des erhöhten uncarboxylierten Osteocalcins haben die Patienten im Verlauf Vitamin K2-MK7 supplementiert. In der Ausgangshypothese wurde ein Anstieg des Vitamin K2 sowie Absinken der ucOC-Werte unter Vitamin K2-Substitution angenommen. Dies konnte im Rahmen unserer Analysen bedingt bestätigt werden. Unter Vitamin K2-MK7-Substitution mit 100 µg täglich zeigte sich beim 2. Messtermin ein signifikanter Anstieg des Vitamin K2-MK7-Messwertes, die Messung scheint valide. Das ucOsteocalcin war im Mittel abgesunken, aber nicht auf den normwertigen Bereich und nicht signifikant. Ursächlich für die fehlende Signifikanz könnte eine zu geringe Dosierung, eine vergleichsweise kleine substituierte Kohorte oder eine nicht ausreichende Resorption des Vitamin K2-MK7 sein.

In diversen Studien, vor allem aus dem asiatischen Raum, konnte gezeigt werden, dass eine Substitution von Vitamin K2 den ucOC-Serumspiegel signifikant senkt (Shiraki et al. 2000; Miki et al. 2003; Iwamoto 2014). Auch in jüngeren Arbeiten, wie beispielsweise von Knapen et al., wurde in einer randomisierten, placebokontrollierten Studie mit 214 postmenopausalen Frauen im Alter von 55 – 65 Jahren dargestellt, dass unter Substitution von Vitamin K2-MK7 der Gehalt an ucOC um circa die Hälfte sank, während in der Placebogruppe keine signifikante Veränderung beobachtet wurde (Knapen et al. 2018; Jadhav et al. 2022). Dabei konnten in den erwähnten Studien deutlich größere und einheitlichere Patientenkollektive im Vergleich zu unserem analysiert und statistisch signifikante Zusammenhänge gezeigt werden.

Im „Nicht-Substituierten Kollektiv“ (n=26) waren beim 2. Messtermin die Werte für Vitamin K2-MK4 signifikant niedriger als beim 1. Messtermin. Sie sind somit im Verlauf der Messungen gesunken. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die Messung des Vitamin K2-MK4 grade im Vergleich zum Vitamin K2-MK7 noch schwieriger und ungenauer ist, da die Ergebnisse stark vom Einnahmezeitpunkt des Vitamin K mit seiner geringen Halbwertzeit und dem Zeitpunkt der Blutentnahme abhängen (Schurgers und Vermeer 2002; Sato et al. 2012). Möglicherweise haben die Patienten im „Nicht-substituierten Kollektiv“ vor dem 1. Messtermin mehr Vitamin K2-haltige Lebensmittel wie Käse und Sauerkraut zu sich genommen als vor dem 2. Messtermin. Dadurch könnten die Messungen beeinflusst sein. Deswegen wäre zukünftig ein Ernährungsprotokoll sinnvoll.

Da einige Patienten Osteoporose-spezifische und damit knochenwirksame Medikamente verwendeten, wurde untersucht, ob diese einen Einfluss auf die Höhe der Vitamin-K2 relevanten Parameter haben. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Einnahme

Osteoporose-spezifischer Therapie und der Höhe des carboxylierten und des uncarboxylierten Osteocalcins. Dabei war der Unterschied über alle verwendeten Osteoporose-spezifischen Medikamentengruppen in Bezug auf die Höhe der Osteocalcin-Formen signifikant. Die paarweisen Vergleiche stellten heraus, dass unter Bisphosphonat- und Denosumab-Therapie signifikant niedrigere und unter Teriparatid-Therapie nicht signifikant höhere Osteocalcin-Werte messbar waren.

Folgend wurden bei weiteren Analysen mit dem Knochenparameter Osteocalcin jene 55 Patienten verwendet, die keine Osteoporose-spezifische Therapie eingenommen haben, um eine Verzerrung der gemessenen Werte durch die spezielle Therapie zu vermeiden. Zudem wurde aus diesem Ergebnis geschlossen, dass bei mit speziellen Osteoporose-Medikamenten vorbehandelten Patienten eine Messung des ucOsteocalcins als indirekter Marker für den Vitamin K2-Status nicht sinnvoll zu sein scheint.

Bei den anderen Vitamin K2-relevanten Laborparametern (Vitamin K1, Vitamin K2-MK4 und Vitamin K2-MK7) war kein signifikanter Zusammenhang der Höhe der Blutserumspiegel mit der Osteoporose-spezifischen Therapie sichtbar. Entsprechend wurden für Analysen mit diesen Messwerten alle 100 der Studie zur Verfügung stehenden Patienten verwendet. Neben der Höhe der einzelnen Vitamin K2-relevanten Laborwerte im Gruppenvergleich wurden Zusammenhänge zwischen den gemessenen Vitamin K-Formen untereinander, sowie Korrelationen zwischen den Knochenstoffwechselparametern Osteocalcin und alkalische Knochenphosphatase dargestellt. Dabei zeigte sich in Bezug auf die Vitamin K2-relevanten Laborparameter ein schwacher, signifikanter Zusammenhang zwischen Vitamin K1 und Vitamin K2-MK4 mit Zunahme des Vitamin K2-MK4 bei einem Anstieg von Vitamin K1. Als Erklärungsmodell könnte das bereits in der Einleitung beschriebene Phänomen dienen, dass Vitamin K1 in Vitamin K2-MK4 umgewandelt werden kann und sich somit die Höhe der messbaren Spiegel kongruent verhält (Okano et al. 2008).

Mit unseren Daten konnte eine signifikante Korrelation zwischen carboxyliertem und uncarboxyliertem Osteocalcin gezeigt werden, wobei bei einer Zunahme des uncarboxylierten Osteocalcins auch das carboxylierte Osteocalcin anstieg. Dieser Zusammenhang lässt sich dadurch begründen, dass sich die Zustandsformen des Osteocalcins gegenseitig beeinflussen. Auch zwischen cOsteocalcin und der alkalischen Knochenphosphatase (APKNO), beides Knochenstoffwechselparameter, zeigte sich bei einer Zunahme der Knochenphosphatase ein signifikanter Anstieg des carboxylierten Osteocalcins. Sowohl die alkalische Knochenphosphatase als auch Osteocalcin sind

Parameter des Knochenumsatzes. Die alkalische Knochenphosphatase ist ein Enzym der Mineralisierung in der frühen Phase, Osteocalcin ist ein Parameter der späten Phase (Bowles et al. 1996). Withold zeigte in einer Studie über die Bestimmung von alkalischer Knochenphosphatase und Osteocalcin bei der Diagnose von Knochenmetastasen ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang der Höhe von der alkalischen Knochenphosphatase und Osteocalcin (Withold 1997).
Bei unseren Analysen zeigte sich zwischen uncarboxyliertem Osteocalcin und Vitamin K2 kein signifikanter Zusammenhang. In der Literatur wird beschrieben, dass ein erhöhtes uncarboxyliertes Osteocalcin mit einem niedrigeren Vitamin K2-Status einhergeht (Shiraki et al. 2000; Miki et al. 2003; Iwamoto 2014; Ma et al. 2022). Mit unseren Daten können wir diesen in der Literatur beschriebenen Zusammenhang nicht bestätigen. Als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte ursächlich sein, dass unser Kollektiv im Vergleich breit gefasst ist und in Bezug auf knochenwirksame Medikation als Einflussfaktor auf den Osteocalcinspiegel inhomogen ist.

Nach den Zusammenhängen der Laborparameter untereinander wurden Korrelationen der Knochendichte mit den Vitamin K2-relevanten Laborparametern untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Korrelationen für die T-Scores, jedoch signifikante lineare Zusammenhänge einiger Z-Scores und der TBS mit den Laborwerten Vitamin K1 und uncarboxyliertem Osteocalcin. Da für die Analyse von Patienten über einem Lebensalter von 50 Jahren der T-Score verwendet wird, lassen sich insgesamt keine relevanten Korrelationen der Knochendichte und der Vitamin K2-relevanten Parameter nachweisen. Dabei zu beachten ist, dass es sich nicht um eine epidemiologische Studie handelt, sondern um ein vorselektiertes Kollektiv aus Patienten, die wegen einer Osteoporose vorstellig und zu einem großen Teil mit Osteoporose-spezifischen Medikamenten vorbehandelt waren. Da die Knochendichte und die Knochenumbaumarker durch die Therapie verändert werden, können unsere Daten in diesem Zusammenhang nur als Orientierung für weitere Forschungen in diesem Bereich dienen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Vitamin K2-relevanten Laborwerte neben der Osteoporose-spezifischen Therapie auch von anderen Messgrößen, wie dem Alter, Vitamin D, dem BMI und anderen Medikamenten beeinflusst wird.
Als Einflussgröße auf die Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter wurde das Alter der Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass die gemessenen Werte für Vitamin K1 bei den älteren Patienten unserer Studie schwach signifikant niedriger waren als bei jüngeren

Patienten. Die anderen Vitamin K-relevanten Parameter zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Alter der Patienten.

Tsugawa et al. beschrieben, dass die Vitamin K1-Konzentration im mittleren Lebensalter (50 – 69 Jahre) am höchsten und bei älteren Patienten vergleichsweise niedriger war (Tsugawa et al. 2006). In die Studie wurden nur Frauen mit einer Altersspanne von 30 – 88 Jahren eingeschlossen, die bis auf eine primäre Form der Osteoporose keine Vorerkrankung hatten und keine knochenwirksamen Medikamente einnahmen. Eine syrische Studie von 2018 zeigte, dass der mittlere Serum-Spiegel von Vitamin K1 in der Gruppe der postmenopausalen osteoporotischen Frauen signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe mit Patientinnen ohne Osteoporose (Jaghsi et al. 2018). Im Rahmen der amerikanischen landesweiten repräsentativen Querschnittserhebung NHANES aus den Jahren 2011 – 2012 wurde die selbstberichtete Vitamin K1-Aufnahme anhand von über 20 Jahre alten männlichen (n=2092) und weiblichen (n=2214) Befragten ermittelt, indem ein komplexes, mehrstufiges Wahrscheinlichkeits-Cluster-Stichproben-Design angewandt wurde. Es zeigte sich, dass im Durchschnitt 43,0% der Männer und 62,5% der Frauen die adäquate Zufuhr (120 bzw. 90 µg/Tag) von Vitamin K1 nicht erreichten, wobei die niedrigste selbstberichtete Zufuhr bei den Männern festgestellt wurde, insbesondere in den älteren (51 – 70 und ≥71 Jahre) Altersgruppen (Harshman et al. 2017). Ergänzend untersuchten Shea et al. in der „*Health, Aging, and Body Composition Study*" einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vitamin K1-Status und dem Auftreten von Mobilitätseinschränkungen. Es stellte sich heraus, dass ältere Erwachsene mit einem erniedrigten Vitamin K1-Plasmaspiegel eher eine Mobilitätseinschränkung und Behinderung entwickelten als jene mit höheren Vitamin K1-Spiegeln (Shea et al. 2020). Laut einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2017 haben ältere Menschen ein höheres Risiko, einen Mangel an Vitamin K insgesamt zu entwickeln als jüngere, auch durch eine verminderte endogene Produktion von Vitamin K2 (Palermo et al. 2017). Ein im zunehmenden Alter vorbestehenden Mangel an Vitamin K2 zeigte sich in unserem Kollektiv nicht. Ursächlich dafür könnte sein, dass in unserem Gesamtkollektiv einige Patienten Vitamin K2 substituierten. Unsere Daten bestätigen jedoch die Literatur bezüglich eines erniedrigten Vitamin K1-Status bei steigendem Lebensalter.

Zusammenfassend scheint mit zunehmendem Lebensalter, grade bei Osteoporosepatienten zur Verhinderung von Mobilitätseinschränkungen, eine ausreichende Vitamin K-Versorgung und dessen Kontrolle relevant zu sein.

90% der Osteoporosepatienten unseres Kollektivs haben Vitamin D supplementiert. Folgend wurde untersucht, ob sich die Vitamin K- und Vitamin D-Spiegel gegenseitig beeinflussen oder zusammenhängen, da beide fettlösliche Vitamine sind und in der Theorie bei steigendem Vitamin K durch Substitution auch die Aufnahme von Vitamin D verbessert ist. Mit unseren Daten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Vitamin K2-Substitution und damit verbunden messbar höheren Vitamin D-Serumspiegeln im Vergleich zu Patienten, die keine Vitamin K2-Substitution erhalten, nachgewiesen werden. Es zeigten sich in unseren Analysen interessanterweise signifikant höhere Vitamin D-Werte in der nicht mit Vitamin K2-substituierten Gruppe beim 2. Messtermin. Möglicherweise beruht der erhöhte Vitamin D-Spiegel auf einer jahreszeitlichen Assoziation durch eine vermehrte Aufnahme in den Sommermonaten, unabhängig von Vitamin K2.

In anderen wissenschaftlichen Arbeiten, wie beispielsweise einer Metaanalyse von 2020, wird beschrieben, dass die vermehrte Aufnahme von Vitamin K auch die Resorption und Aufnahme von Vitamin D verbessert (Kuang et al. 2020). Der Osteocalcin-Spiegel wird durch Vitamin D beeinflusst, welches für die Bildung von ucOsteocalcin erforderlich sein soll. Daten von 965 gesunden Probanden weisen auf eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen uncarboxyliertem Osteocalcin und Vitamin D hin (Buranasinsup und Bunyaratavej 2015). Bei einem erhöhten Vitamin K2-Spiegel wäre demnach auch die Vitamin D-Aufnahme verbessert und erhöht, wodurch das carboxylierte Osteocalcin vermehrt vorliegen würde. Dieses Ergebnis konnten wir mit unseren Daten nicht bestätigen. Ursächlich dafür könnte sein, dass das bei uns verwendete Kollektiv deutlich kleiner ist und nahezu alle Patienten Vitamin D substituieren. Möglicherweise sind die Vorteile, die sich aus einer Kombination der Vitamine K und D ergeben, eher auf die komplementäre Rolle in der kardiovaskulären Gesundheit und des Kalzium-Stoffwechsels zurückzuführen als auf einen direkten Anstieg des Vitamin D-Spiegels durch eine Substitution von Vitamin K2.

Wie in der Einleitung beschrieben hat das uncarboxylierte Osteocalcin eine hormonelle Funktion bei der Regulation der Glukosehomöostase, indem es beispielsweise die Adiponektin-Expression in den Adipozyten erhöht (Lee et al. 2007; Ferron et al. 2008). Deshalb könnte, wie im Mausmodel beobachtet, angenommen werden, dass die Patienten mit einem erhöhten ucOcsteocalcin auch einen höheren BMI haben. Wir erwarteten einen Zusammenhang zwischen dem BMI, damit der Fettmasse, und den Vitamin K2-relevanten Parametern.

In unserer Studie zeigte sich, dass ein hoher BMI schwach signifikant mit höheren Werten für Vitamin K2-MK7 sowie uncarboxyliertem Osteocalcin korrelierte, wenn alle der Studie zur Verfügung stehenden Patienten verwendet werden. Wenn nur die 55 Patienten ohne spezielle Osteoporosemedikation in die Analyse eingeschlossen sind, ist kein signifikanter Zusammenhang mehr von BMI und uncarboxyliertem Osteocalcin sichtbar.

In der Literatur gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den Vitamin K2-relevanten Parametern und dem BMI. Dabei ergab sich eine inverse Korrelation zwischen dem Vitamin K2-Spiegel und dem BMI bei Hämodialyse-Patienten, mit dem Ergebnis, dass je übergewichtiger die Patienten waren, desto niedriger der Vitamin K2-MK7-Serumspiegel gemessen wurde (Ravera et al. 2021). Passend dazu wird beschrieben, dass ein Vitamin K-Mangel durch eine verringerte Aktivität der Darmbakterien bedingt sein kann, wie sie auch bei fettleibigen und Personen mit Diabetes mellitus beobachtet wird (Saltzman und Russell 1998; Bleau et al. 2015; Palermo et al. 2017). Eine andere Arbeit beleuchtete den Zusammenhang von ucOsteocalcin und dem BMI. Dabei zeigte sich, je niedriger das gemessene uncarboxylierte Osteocalcin war, desto besser war die Versorgung mit Vitamin K2 und desto geringer waren Gewicht und BMI (Knapen et al. 2012). Eine Metaanalyse von Liu et al. beschrieb höhere Messwerte des Gesamt-Osteocalcins und des uncarboxylierten Osteocalcins bei niedrigem BMI (Liu et al. 2020). In einer Arbeit von 2015 mit 100 übergewichtigen Erwachsenen und 50 gesunden, nach Alter und Geschlecht gematchten Kontrollpersonen, zeigte sich, dass Osteocalcin bei übergewichtigen Personen signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen war (El-Eshmawy und Abdel Aal 2015). Es wurden dabei nicht die einzelnen Unterformen des Osteocalcins unterschieden.

Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Körpermasse und damit einhergehend niedrigem Vitamin K2-Status, welcher sich in unserem Kollektiv anders darstellte. Erklärungsmodelle für den bei uns gemessenen erhöhten Vitamin K2-Status bei höherem BMI könnten die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten sein. Möglicherweise nehmen Patienten mit einem höheren BMI durch eine erhöhte Aufnahme von beispielsweise Käse mehr Vitamin K2 zu sich. Zudem könnte eine veränderte Darmflora bei Adipösen zu einer höheren endogenen Produktion von Vitamin K2 führen. Da Vitamin K2 fettlöslich ist, könnte zudem mehr Vitamin K2 im Fettgewebe gespeichert sein, welches beim Austritt ins Blut dann vermehrt messbar wäre. Insgesamt scheint für die Beantwortung zum Zusammenhang von Vitamin K2 und dem BMI auch der HbA1c (Hämoglobin-A1c) als Langzeitblutzucker-Messwert und der

Lipidstatus relevant zu sein. Diese Parameter wurden im Rahmen dieser Studie nicht bestimmt, könnten in anderen Arbeiten aber weitere Erkenntnisse liefern.

Zusammenfassend scheint bei einer kurzen Halbwertszeit und wegen der Instabilität des Vitamin K2-MK4 dessen Messung und Substitution nicht sinnvoll zu sein. Vitamin K2-MK7 ist mit einer HWZ von 68 h deutlich länger nachweisbar, unter Substitution zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Vitamin K2, jedoch kein signifikanter Effekt auf ucOsteocalcin bei möglicherweise zu niedriger Dosierung. Insgesamt scheint jedoch die Messung und Substitution von Vitamin K2-MK7 sinnvoll. Vitamin K1 zeigte signifikant erniedrigte Messwerte bei älteren Patienten. Es kann bei kurzer HWZ im peripheren Gewebe in Vitamin K2 umgewandelt werden, auch hier scheint die Messung und Substitution bei Bedarf sinnvoll. Osteocalcin kann (vorrangig in der uncarboxylierten Form) ein indirekter Marker für den Vitamin K2-Status sein, somit sollte eine Bestimmung dessen erfolgen. Bei Patienten, die Osteoporose-spezifische Medikation verwenden, ist diese Messung jedoch nicht zu empfehlen, da die Höhe des messbaren Osteocalcins von der Einnahme dieser spezifischen Medikation beeinflusst wird.

Während der Datenerhebung für unsere Studie zeigte sich, dass die Dosierung bei der Supplementierung von Vitamin K2 vor allem in der Gruppe der bereits zu Beginn supplementierten neun Patienten mit 45 – 500 µg Vitamin K2-MK7 täglich sehr inhomogen war. Im Endokrinologikum wurde eine einheitliche Dosierung von 100 µg pro Tag verordnet. Es stellte sich im Rahmen der Bearbeitungen die Frage, welche Vitamin K2-Dosierung zur Substitution sinnvoll sein könnte.
In unserem Kollektiv zeigte sich unter Vitamin K2-Substitution ein signifikanter Anstieg der Vitamin K2-Messwerte sowie ein nicht signifikantes Absinken des ucOC-Messspiegels. Eine chinesische Studie von 2020 befasste sich mit dieser Fragestellung und erörterte zudem, ob eine Kombination mit Vitamin D und Calcium, wie es auch einige Patienten unseres Kollektivs verordnet bekommen haben, noch bessere Ergebnisse erreichen würde, mit dem Ziel, eine niedrige und wirksame Dosis von Vitamin K2 zur Verbesserung der BMD festzulegen. Als Ergebnis wurde unter diversen Dosierungen einer Vitamin K2-Supplementierung von 90 µg/Tag eine signifikante Wirkung auf die Verringerung des Knochenverlusts bei postmenopausalen Frauen zugeschrieben. Die Kombination mit Kalzium und Vitamin D brachte keine zusätzlichen Effekte (Zhang et al. 2020). Knapen et al. zeigte an gesunden postmenopausalen Frauen, dass eine Supplementierung von 180 µg Vitamin K2 täglich den Vitamin K-Status signifikant verbesserte, indem es das

uncarboxylierte Osteocalcin senkte und einen Verlust an Wirbelhöhe in der unteren Brustwirbelregion signifikant verringerte (Knapen et al. 2013). In der Literatur lassen sich zudem Studien finden, bei denen Dosierungen von 45 mg Vitamin K2-MK4 pro Tag verwendet wurden, somit das Tausendfache im Vergleich zur Substitution der Vitamin K2-MK7-Unterform, worunter sich ebenfalls ein Absinken der Konzentration des uncarboxylierten Osteocalcins zeigte (Yasui et al. 2006; Binkley et al. 2009; Giri et al. 2020). Bei diesen Arbeiten wurde Vitamin K2 in der MK4-Form verwendet und nicht, wie üblich, in der MK7-Variante. Da bei Vitamin K2-MK4 die Halbwertszeit kurz ist, sind scheinbar deutlich höhere Dosierungen nötig, um einen positiven Effekt der Supplementierung zu erreichen.

Zusammenfassend hatte die Dosierung von 100 µg Vitamin K2-MK7 täglich in unserem „Neu-substituierten Kollektiv" keinen ausreichenden Effekt, um den Vitamin K-Status signifikant zu verbessern und eine höhere Dosierung könnte sinnvoll sein. Jedoch beziehen sich unsere Ergebnisse vorrangig auf die gemessenen Laborparameter, nicht aber auf die möglicherweise damit einhergehende Veränderung der Frakturrate oder der Knochendichte. Da unser Gesamtkollektiv bereits zum 1. Messtermin einen ausreichenden Vitamin K-Status hatte und nur wenige Patienten einen behandlungsbedürftigen Vitamin K-Mangel aufwiesen, sind unsere Ergebnisse orientierend zu bewerten. Es empfiehlt sich auch zukünftig die Supplementierung mit der Vitamin K2-MK7-Unterform, da hierbei geringe Dosierungen nötig zu sein scheinen. Es zeigte sich, dass in der Literatur ebenfalls keine einheitliche Supplementations-Dosierung für Vitamin K2 besteht und es weiterer Forschung bedarf, um diese einheitlich festzulegen. Interessant sind dafür vor allem weitere Studien, die einen Verlauf der Erkrankung mit Veränderung der Knochendichte oder der Frakturrate unter Vitamin K2-Substitution zeigen.

Da die Dosierungen in der Literatur zum Teil wesentlich höher waren, als die bei uns verwendeten, stellte sich die Frage, ob eine Vitamin K2-Substitution mit Nebenwirkungen assoziiert sein kann.

Bei Ren et al. zeigten sich keine Auswirkungen einer Vitamin K-Supplementierung auf die Aktivitäten von Vitamin K-abhängigen Prokoagulationsfaktoren bei gesunden Personen und auch bei thrombotischen Ereignissen scheint eine Vitamin K-Supplementierung unbedenklich (Ren et al. 2021). Jedoch sollen die einzelnen Vitamin K-Unterformen unterschiedliche Interaktionspotentiale aufweisen. Von Schurgers et al. wurde gezeigt, dass Vitamin K2-MK7 fast dreimal mal stärker als Vitamin K1 der Wirkung von Vitamin K-Antagonisten entgegenwirkt und somit das Risiko für pharmakodynamische Interaktionen

mit Vitamin K-Antagonisten bei Vitamin K2-MK7 höher als bei Vitamin K1 ist (Schurgers et al. 2006). Sconce et al. postulieren, dass eine Vitamin K1-Supplementierung zu einer Stabilisierung des INR (*international normalized ratio*), welcher Maß für die Blutgerinnung ist, führt (Sconce et al. 2007). Zudem zeigte eine niederländische Studie von 2010 mit 19 Patienten, die jünger als 55 Jahre waren, seit mindestens zehn Jahren Cumarine einnahmen und keine sonstigen kardiovaskulären Risikofaktoren aufwiesen im Vergleich zu 18 gesunden Kontrollpersonen, dass die Einnahme von Cumarinen mit einer verstärkten extrakoronaren Gefäßverkalkung einhergeht, möglicherweise durch die Hemmung der Carboxylierung von MGP als Ausdruck eines Vitamin K-Mangels (Rennenberg et al. 2010). Somit sollte bei Patienten mit Cumarin-Therapie auf einen ausreichenden Vitamin K-Spiegel geachtet und bei Mangel substituiert werden.

Abschließend zu erwähnen ist, dass sich bei unserem Forschungsprojekt Einflussfaktoren wie ein kleines, heterogenes, vergleichsweise krankes Patientenkollektiv und eine unterschiedliche Dosierung der Supplementation bei bereits substituierten Patienten als Herausforderung erwiesen haben. Dies hat dazu geführt, dass wir die von anderen Studien vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Ausgangshypothese zum Zusammenhang der Höhe der Vitamin K2-relevanten Parameter nur teilweise bestätigen konnten. Unser Kollektiv besteht vorwiegend aus postmenopausalen Frauen, jedoch ist die Altersspannweite groß und die Einnahme spezieller Osteoporosemedikation innerhalb des Kollektivs nicht einheitlich. In unseren Analysen zeigten sich keine relevanten signifikanten Zusammenhänge der Vitamin K2-relevanten Parameter mit den Frakturen und der Knochendichtemessung mittels DXA. Es wurde diesbezüglich nur die Dokumentation zum Zeitpunkt des 1. Messtermins verwendet. Ein Verlauf und damit einhergehend mögliche Veränderungen der Knochendichte und der Frakturrate unter Vitamin K2-Substitution wären in weiteren Projekten interessant. Da die Vitamin K-Spiegel von der Ernährung beeinflusst werden, sind zudem Ernährungsgewohnheiten bedeutsam, die im Rahmen dieser Studie nicht genauer betrachtet wurden.

Bei uns zeigte sich ein Einfluss spezieller Osteoporosemedikation auf die Höhe des Osteocalcins, nicht aber auf die Messspiegel von Vitamin K1 und Vitamin K2. Dies war bisher kein Gegenstand der Forschung, könnte aber bei einer größeren Kohorte und auch in weiteren Untersuchungen neue Erkenntnisse bringen.

Da in der Literatur beschrieben ist, dass die Konzentration von Vitamin K1 in engem Zusammenhang mit der Triglycerid-Konzentration und von Vitamin K2 mit der Konzentration von LDL und HDL steht (Kohlmeier et al. 1996; Schurgers und Vermeer

2002; Shearer und Newman 2008b), ist eine gute Einstellung und Kontrolle derer ebenfalls sinnvoll und wichtig, um einer Gefäßverkalkung entgegen zu wirken. Auf der Bestimmung des Lipidstatus mit anschließender Korrektur für Lipidparameter und damit einhergehenden potentiellen Zusammenhängen der Blutfette mit der Vitamin K2-Versorgung lag in dieser Dissertation kein Schwerpunkt, wäre aber in zukünftigen Bearbeitungen der Vitamin K2-Thematik interessant.
Nebenwirkungen der Vitamin K2-Susbtitution scheinen in der bei unserer Studie verwendeten Dosierung nicht relevant. Im Verlauf könnte prospektiv bei einem Kollektiv von ausschließlich Patienten ohne Osteoporose-spezifische Medikation getestet werden, wie sich die Vitamin K2-relevanten Parameter unter einer täglichen höheren Substitution von beispielsweise 200 µg Vitamin K2-MK7 über vier Wochen mit erneuter Kontrollmessung und mit begleitendem Führen eines Ernährungsprotokolls entwickeln. In diesem Zusammenhang wäre die Bestimmung des Lipidstatus und des HbA1c als Langzeitblutzuckerwerte interessant.

Bezogen auf die Ausgangsfragestellung scheint die Messung von Vitamin K1, Vitamin K2-MK7 und, unter der Voraussetzung, dass keine knochenwirksame Osteoporose spezifische Medikation eingenommen wird, auch von ucOsteocalcin und cOsteocalcin eine sinnvolle Ergänzung in der Osteoporose-Diagnostik zu sein. Da Vitamin K2-MK7 in unserem Gesamtkollektiv zum 1. Messtermin normwertig war, scheint gemessen an den Daten unseres Kollektivs eine prophylaktische Substitution von Vitamin K2-MK7 nicht sinnvoll zu sein. Bei einem Mangel sollte eine ausreichende Substitution erfolgen. Dabei war eine Supplementierung von Vitamin K2 mit einer Dosierung von 100 µg täglich für eine signifikante Verbesserung des Vitamin K-Status in unserem Kollektiv nicht ausreichend. Bei jenen Patienten, die bereits vor der Studie mit unterschiedlichen Dosierungen von Vitamin K2-MK7 supplementiert wurden, wäre eine Anpassung dieser Dosierung sinnvoll. Zudem sollte auf eine regelmäßige und korrekte Einnahme des Vitamin K2 und ausreichende Zufuhr auch über die Nahrung hingewiesen werden.
Unsere Ergebnisse bestätigen damit teilweise die Literatur zeigen aber auch, dass die Übertragbarkeit von Erkenntnissen, die bei homogenen großen Kollektiven erlangt werden, bei einem kleineren diversen Kollektiv (mit unterschiedlichem Alter, Geschlecht und medikamentöser Therapie) wie unserem nicht zwangsläufig gegeben ist.
In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studie und der Literatur lässt sich festhalten, dass eine adäquate Versorgung mit Vitamin K2 bei Osteoporosepatienten eine sinnvolle Ergänzung in der Diagnostik der Osteoporose sein kann.

5 Zusammenfassung

Osteoporose ist eine Erkrankung des Knochenstoffwechsels, bei der es gehäuft zu Frakturen und damit einer Einschränkung der Lebensqualität kommen kann. In der Diagnostik werden vor allem die Knochendichtemessung mittels DXA und diverse Laborparameter verwendet.

Vitamin K mit seinen Unterformen gehört aktuell noch nicht standardmäßig dazu, soll aber den Knochenstoffwechsel positiv beeinflussen.

In der hier vorgestellten explorativen Studie wurde die Vitamin K2-Versorgung und Diagnostik bei Osteoporosepatienten des Endokrinologikums Göttingen untersucht. Dabei wurde die von *amedes MVZ wagnerstibbe* in diesem Rahmen neu etablierte LC-MS/MS-Messung verwendet. Es sollte analysiert werden, wie der Vitamin K2-Status des Kollektivs ist und ob die Messung von Vitamin K2 und seinen dazugehörigen relevanten Parametern eine sinnvolle Ergänzung in der Diagnostik der Osteoporose sein kann. Es handelt sich um eine retrospektive Studie, bei der sich das Patientenkollektiv aus 100 Osteoporosepatienten zusammensetzt, wovon sechs Patientinnen bei erniedrigtem Vitamin K2-Status im Verlauf substituiert wurden.

Es zeigte sich ein Gesamtkollektiv mit 84% vorrangig postmenopausalen Frauen und 16% Männern, jedoch im Vergleich zu anderen Studien einer großen Altersspannweite. 45% der Patienten nahm regelmäßig eine Osteoporose-spezifische Therapie ein. 60% der Studienteilnehmer gaben anamnestisch Frakturen in der Vorgeschichte an. Die Auswertungen der Knochendichtemessungen mittels DXA ergaben, dass die Männer des Kollektivs tendenziell schlechtere Messwerte in den peripheren Knochen (Femur) aufwiesen, wohingegen die Frauen eine im Vergleich schlechtere Knochensubstanz der Wirbelsäule hatten.

Wir konnten zeigen, dass unter spezifischer Osteoporose-Therapie wie Bisphosphonaten und Denosumab niedrigere und Teriparatid-Therapie signifikant höhere Osteocalcin-Werte im Gruppenvergleich messbar waren ($p<0{,}001$).

Es stellte sich heraus, dass bereits zum ersten Messtermin die meisten Patienten des Kollektivs hohe Vitamin K2-MK7-Spiegel (1,9±4,4 µg/l, Normbereich: 0,1 – 0,82 µg/l), jedoch auch erhöhte Messwerte für das uncarboxylierte Osteocalcin (3,2±2,24 µg/l, Normbereich 0,6 – 3,34 µg/l) aufwiesen, welches ein indirekter Marker für den Vitamin K2-Status ist. Unter Vitamin K2-Substitution (bei n=6) zeigte sich ein Anstieg der Vitamin K2 MK7-Serumspiegel (von 1,0±0,8 µg/l auf 5,0±3,7 µg/l) sowie ein nicht signifikantes

Absinken der ucOC-Werte (von 5,0±2,74 µg/l auf 4,3±2,14 µg/l). Ein signifikanter Zusammenhang der Höhe des Vitamin K1 und Vitamin K2-MK4 (p=0,038), sowie der Osteocalcin-Werte untereinander (p=<0,001) und von carboxyliertem Osteocalcin und der alkalischen Knochenphosphatase (p=<0,001) konnte dargestellt werden. In unserem Gesamtkollektiv zeigte sich ein schwach signifikanter Zusammenhang von erhöhtem Vitamin K2-MK7-Serumspiegel (p=0,04) bei höherem BMI und ein mit zunehmendem Lebensalter erniedrigter Vitamin K1-Spiegel (p=0,012). Signifikante Korrelationen der Vitamin K2-relevanten Parameter mit dem Vitamin D-Status, der Knochendichte und der Frakturrate zeigten sich nicht.

Die Messung von Vitamin K1, Vitamin K2-MK7 und, wenn keine Osteoporose-spezifische Medikation eingenommen wird, auch den Osteocalcin-Formen, scheint eine sinnvolle Ergänzung in der Osteoporose-Diagnostik zu sein.

Die Vitamin K2-Versorgung im Gesamtkollektiv war im Normbereich, aber grenzwertig niedrig. Bei Patienten mit erhöhtem uncarboxylierten Osteocalcin als Zeichen eines Vitamin K2-Mangels scheint eine Supplementierung von Vitamin K2 mit einer Dosierung von 100 µg täglich für eine signifikante Verbesserung des Vitamin K-Status in unserem Kollektiv nicht ausreichend und eine höhere Dosierung könnte sinnvoll sein. Grade bei älteren Patienten sollte auf einen ausreichenden Vitamin K-Status geachtet und bei günstigem Nebenwirkungsprofil substituiert werden. Ob dies auch positive Effekte auf die Knochendichte und Frakturrate hat, ist in der Literatur umstritten und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Akbari S, Rasouli-Ghahroudi AA (2018): Vitamin K and Bone Metabolism: A Review of the Latest Evidence in Preclinical Studies. BioMed Res Int 25, 1–8

Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D (2017): Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. Ann N Y Acad Sci 1409, 79–84

Berkner KL, Runge KW (2004): The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. J Thromb Haemost 2, 2118–2132

Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS (2003): AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. Gastroenterology 124, 795–841

Binkley N, Harke J, Krueger D, Engelke J, Vallarta-Ast N, Gemar D, Checovich M, Chappell R, Suttie J (2009): Vitamin K Treatment Reduces Undercarboxylated Osteocalcin but Does Not Alter Bone Turnover, Density, or Geometry in Healthy Postmenopausal North American Women. J Bone Miner Res 24, 983–991

Bleau C, Karelis AD, St-Pierre DH, Lamontagne L (2015): Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. Diabetes Metab Res Rev 31, 545–561

Booth SL (2009): Roles for Vitamin K Beyond Coagulation. Annu Rev Nutr 29, 89–110

Booth SL, Davidson KW, Sadowski JA (1994): Evaluation of an HPLC method for the determination of phylloquinone (Vitamin K1) in various food matrixes. J Agrie Food Chem 42, 295–300

Booth SL, Centi A, Smith SR, Gundberg C (2013): The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? Nat Rev Endocrinol 9, 43–55

Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW, Marsh DR (1996): Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. Ann Clin Biochem 33, 196–200

Brown JP, Malaval L, Chapuy MC, Delmas PD, Edouard C, Meunier PJ (1984): Serum bone gla-protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal Osteoporosis. Lancet 323, 1091–1093

Buitenhuis HC, Soute BAM, Vermeer C (1990): Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj 1034, 170–175

Bults P, Spanov B, Olaleye O, van de Merbel NC, Bischoff R (2019): Intact protein bioanalysis by liquid chromatography – High-resolution mass spectrometry. J Chromatogr B 1110, 155–167

Buranasinsup S, Bunyaratavej N (2015): The Intriguing Correlation between Undercarboxylated Osteocalcin and Vitamin D. J Med Assoc Thai 98, 16–20

Calvo MS, Eyre D, Gundberg CM (1996): Molecular Basis and Clinical Application of Biological Markers of Bone Turnover. Endocr Rev 17, 36

Cole DEC, Carpenter TO, Gundberg CM (1985): Serum osteocalcin concentrations in children with metabolic bone disease. J Pediatr 106, 770–776

Cole DEC, Gundberg CM, Strik LJ, Atkinson SA, Hanley DA, Ayer LM, Baldwin LS (1987): Changing Osteocalcin Concentrations During Pregnancy and Lactation: Implications for Maternal Mineral Metabolism. J Clin Endocrinol Metab 65, 290–294

Consensus Development Conference (1993): Diagnosis, prophylaxis and treatment of Osteoporosis. Am J Medcine 94 94, 646–650

del Pino J, Martín-Gómez E, Martín-Rodríguez M, López-Sosa C, Cordero M, Lanchares JL, García-Talavera JR (1991): Influence of sex, age, and menopause in serum osteocalcin (BGP) levels. Klin Wochenschr 69, 1135–1138

Delmas PD, Glorieux FH, Delvin EE, Salle BL, Melki I (1987): Perinatal Serum Bone Gla-Protein and Vitamin D Metabolites in Preterm and Fullterm Neonates. J Clin Endocrinol Metab 65, 588–591

DGE (2021): Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Vitamin K-Schätzwerte für eine angemessene Zufuhr, https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/vitamin-k/?L=0; abgerufen am 23.01.2021

Diegel CR, Hann S, Ayturk UM, Hu JCW, Lim K, Droscha CJ, Madaj ZB, Foxa GE, Izaguirre I, Transgenics Core VV and, et al. (2020): An osteocalcin-deficient mouse strain without endocrine abnormalities. PLOS Genet 16, e1008361

Ducros V, Pollicand M, Laporte F, Favier A (2010): Quantitative determination of plasma vitamin K1 by high-performance liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry. Anal Biochem 401, 7–14

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, et al. (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 382, 448–452

DVO (2014): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und postmenopausalen Frauen und S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., https://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202014/DVO-Leitlinie%20Osteoporose%202014%20Kurzfassung%20und%20Langfassung%20Version%201a%2012%2001%202016.pdf; abgerufen am 22.01.2021.

DVO (2023): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern ab dem 50. Lebensjahr. S3-Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., https://register.awmf.org/assets/guidelines/183-001l_S3_Prophylaxe-Diagnostik-Therapie-der-Osteoporose_2023-11.pdf; abgerufen am 17.04.2023.

EFSA (2008): Vitamin K2 added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population and Vitamin K2 as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuffs, in the context of Regulation- Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. EFSA J 6, 822

El-Eshmawy M, Abdel Aal I (2015): Relationships between preptin and osteocalcin in obese, overweight, and normal weight adults. Appl Physiol Nutr Metab 40, 218–222

Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM (2000): Matrix Gla Protein Is Regulated by a Mechanism Functionally Related to the Calcium-Sensing Receptor. Biochem Biophys Res Commun 277, 736–740

Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008): Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. Proc Natl Acad Sci 105, 5266–5270

Furie B, Furie BC (1988): The Molecular Basis of Blood Coagulation. Cell Press 53, 505–518

Fusaro M, Gallieni M, Rizzo MA, Stucchi A, Delanaye P, Cavalier E, Moysés RMA, Jorgetti V, Iervasi G, Giannini S, et al. (2017): Vitamin K plasma levels determination in human health. Clin Chem Lab Med CCLM 55, 789–799

Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MHJ, van der Meer IM, Hofman A, Witteman JCM (2004): Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. J Nutr 134, 3100–3105

Giri T, Newton D, Chaudhary O, Deych E, Napoli N, Villareal R, Diemer K, E Milligan P, F Gage B (2020): Maximal dose-response of vitamin-K2 (menaquinone-4) on undercarboxylated osteocalcin in women with osteoporosis. Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam-Ernahrungsforschung J Int Vitaminol Nutr 90, 42–48

Gröber U, Kisters K (2015): Vitamin K. Ernähr Med 30, 110–114

Gundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M, Rosen JF (1985): Osteocalcin in Human Serum: A Circadian Rhythm. J Clin Endocrinol Metab 60, 736–739

Hadji P, Hardtstock F, Wilke T, Joeres L, Toth E, Möckel L, Gille P (2020): Estimated epidemiology of osteoporosis diagnoses and osteoporosis-related high fracture risk in Germany: a German claims data analysis. Arch Osteoporos 15, 127

Hadji P, Elizabeth E, Dominik O, Robert B (2024): Bone evaluation study-2: update on the epidemiology of osteoporosis in Germany. Arch Osteoporos 19, 26

Halder M, Petsophonsakul P, Akbulut AC, Pavlic A, Bohan F, Anderson E, Maresz K, Kramann R, Schurgers L (2019): Vitamin K: Double Bonds beyond Coagulation Insights into Differences between Vitamin K1 and K2 in Health and Disease. Int J Mol Sci 20, 896

Harshman SG, Finnan EG, Barger KJ, Bailey RL, Haytowitz DB, Gilhooly CH, Booth SL (2017): Vegetables and Mixed Dishes Are Top Contributors to Phylloquinone Intake in US Adults: Data from the 2011-2012 NHANES. J Nutr 147, 1308–1313

Hauschka PV, Carr SA (1982): Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. Biochemistry 21, 2538–2547

Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM (1975): Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 3925–3929

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989): Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol Rev 69, 990–1047

Hu L, Ji J, Li D, Meng J, Yu B (2021): The combined effect of vitamin K and calcium on bone mineral density in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Orthop Surg 16, 592

Iwamoto J (2014): Vitamin K2 Therapy for Postmenopausal Osteoporosis. Nutrients 6, 1971–1980

Jadhav N, Ajgaonkar S, Saha P, Gurav P, Pandey A, Basudkar V, Gada Y, Panda S, Jadhav S, Mehta D, Nair S (2022): Molecular Pathways and Roles for Vitamin K2-7 as a Health-Beneficial Nutraceutical: Challenges and Opportunities. Front Pharmacol 13, 896920

Jaghsi S, Hammoud T, Haddad S (2018): Relation Between Circulating Vitamin K1 and Osteoporosis in the Lumbar Spine in Syrian Post-Menopausal Women. Open Rheumatol J 12, 1–9

Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, McCloskey EV, Willers C, Borgström F (2021): SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. Arch Osteoporos 16, 82

Karl JP, Fu X, Dolnikowski GG, Saltzman E, Booth SL (2014): Quantification of phylloquinone and menaquinones in feces, serum, and food by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr B 963, 128–133

Knapen MHJ, Hamulyák K, Vermeer C (1989): The Effect of Vitamin K Supplementation on Circulating Osteocalcin (Bone Gla Protein) and Urinary Calcium Excretion. Ann Intern Med 111, 1001–1005

Knapen MHJ, Schurgers LJ, Shearer MJ, Newman P, Theuwissen E, Vermeer C (2012): Association of vitamin K status with adiponectin and body composition in healthy subjects: uncarboxylated osteocalcin is not associated with fat mass and body weight. Br J Nutr 108, 1017–1024

Knapen MHJ, Drummen NE, Smit E, Vermeer C, Theuwissen E (2013): Three-year low-dose menaquinone-7 supplementation helps decrease bone loss in healthy postmenopausal women. Osteoporos Int 24, 2499–2507

Knapen MHJ, Jardon KM, Vermeer C (2018): Vitamin K-induced effects on body fat and weight: results from a 3-year vitamin K2 intervention study. Eur J Clin Nutr 72, 136–141

Kneiseler G, Canbay A, Gerken G (2012): Rolle der Vitamin-K-Antagonisten aus Sicht des Hepatologen. Herz 37, 395–401

Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J, Shearer MJ (1996): Transport of Vitamin K to Bone in Humans. J Nutr 126, 1192–1196

Kuang X, Liu C, Guo X, Li K, Deng Q, Li D (2020): The combination effect of vitamin K and vitamin D on human bone quality: a meta-analysis of randomized controlled trials. Food Funct 11, 3280–3297

Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, Wartschow LM, Teta M, Long SY, Sicinski P, White MF (2005): Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β-Cell Growth | Molecular and Cellular Biology. Am Sociely Microbiol 9, 3752–3762

Lambert LJ, Challa AK, Niu A, Zhou L, Tucholski J, Johnson MS, Nagy TR, Eberhardt AW, Estep PN, Kesterson RA, Grams JM (2016): Increased trabecular bone and improved biomechanics in an osteocalcin-null rat model created by CRISPR/Cas9 technology. Dis Model Mech 9, 1169–1179

Lee AJ, Hodges S, Eastell R (2000): Measurement of Osteocalcin. Ann Clin Biochem 37, 432–446

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, et al. (2007): Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell 130, 456–469

Lips P, van Schoor NM (2005): Quality of life in patients with osteoporosis. Osteoporos Int 16, 447–455

Liu X, Liu Y, Mathers J, Cameron M, Levinger I, Yeap BB, Lewis JR, Brock KE, Brennan-Speranza TC (2020): Osteocalcin and measures of adiposity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Arch Osteoporos 15, 145

Lombardi G, Lanteri P, Colombini A, Banfi G (2012): Blood biochemical markers of bone turnover: pre-analytical and technical aspects of sample collection and handling. Clin Chem Lab Med 50, 771–789

Ma M, Ma Z, He Y, Sun H, Yang B, Ruan B, Zhan W, Li S, Dong H, Wang Y (2022): Efficacy of vitamin K2 in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Front Public Health 10, 979649

Marles RJ, Roe AL, Oketch-Rabah HA (2017): US Pharmacopeial Convention safety evaluation of menaquinone-7, a form of vitamin K. Nutr Rev 75, 553–578

McCann JC, Ames BN (2009): Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? Am J Clin Nutr 90, 889–907

Melton LJ (1991): Epidemiology of osteoporosis. Baillières Clin Obstet Gynaecol 4, 785–805

Mera P, Laue K, Wei J, Meyer Berger J, Karsenty G (2016): Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. Mol Metab 5, 1042–1047

Miki T, Nakatsuka K, Naka H, Kitatani K, Saito S, Masaki H, Tomiyoshi Y, Morii H, Nishizawa Y (2003): Vitamin K2 (menaquinone 4) reduces serum undercarboxylated osteocalcin level as early as 2 weeks in elderly women with established osteoporosis. J Bone Miner Metab 21, 161–165

Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, Liu W, Fukuyama R, Wang Y, Komori H, et al. (2020): Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. PLOS Genet 16, e1008586

Nelsestuen GL, Broderius M, Zytkovicz TH, Howard JB (1975): On the role of γ-carboxyglutamic acid in calcium and phospholipid binding. Biochem Biophys Res Commun 65, 233–240

Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, Nakagawa K (2008): 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 283, 11270–11279

Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M: The Vitamin K Cycle. In: Vitamins & Hormones (Vitamin K). Band 78; Academic Press 2008, 35–62

Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G (2011): Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. Cell 144, 796–809

Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, Huang Y, Lee H, Srinivas P, Gao X-B, et al. (2013): Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. Cell 155, 228–241

Palermo A, Tuccinardi D, D'Onofrio L, Watanabe M, Maggi D, Maurizi AR, Greto V, Buzzetti R, Napoli N, Pozzilli P, Manfrini S (2017): Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality? Metabolism 70, 57–71

Pothuaud L, Carceller P, Hans D (2008): Correlations between grey-level variations in 2D projection images (TBS) and 3D microarchitecture: applications in the study of human trabecular bone microarchitecture. Bone 42, 775–787

Presse N, Shatenstein B, Kergoat M-J, Ferland G (2008): Low Vitamin K Intakes in Community-Dwelling Elders at an Early Stage of Alzheimer's Disease. J Am Diet Assoc 108, 2095–2099

Price PA (1988): Role of Vitamin-K-Dependent Proteins in Bone Metabolism. Annu Rev Nutr 8, 565–583

Price PA (1989): Gla-Containing Proteins of Bone. Connect Tissue Res 21, 51–60

Price PA, Baukol SA (1980): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem 255, 11660–11663

Price PA, Nishimoto SK (1980): Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. Proc Natl Acad Sci USA 77, 2234–2238

Price PA, Williamson MK (1985): Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. J Biol Chem 260, 14971–14975

Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N (1976): Characterization of a y-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. Proc Natl Acad Sci USA 1447–1451

Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ (1980): New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. J Clin Invest 66, 878–883

Ravera M, Nickolas T, Plebani M, Iervasi G, Aghi A, Khairallah P, Gallieni M, Mereu MC, Giannini S, Sella S, et al. (2021): Overweight-obesity is associated with decreased vitamin K2 levels in hemodialysis patients. Clin Chem Lab Med CCLM 59, 581–589

Ren R, Liu J, Cheng G, Tan J (2021): Vitamin K2 (Menaquinone-7) supplementation does not affect vitamin K-dependent coagulation factors activity in healthy individuals. Medicine (Baltimore) 100, e26221

Rennenberg RJMW, van Varik BJ, Schurgers LJ, Hamulyak K, Ten Cate H, Leiner T, Vermeer C, de Leeuw PW, Kroon AA (2010): Chronic coumarin treatment is associated with increased extracoronary arterial calcification in humans. Blood 115, 5121–5123

Robert-Koch-Institut (2017): 12-Monats-Prävalenz von Osteoporose in Deutschland. J Health Monit 3, 61–65

Rønn SH, Harsløf T, Oei L, Pedersen SB, Langdahl BL (2021): The effect of vitamin MK-7 on bone mineral density and microarchitecture in postmenopausal women with osteopenia, a 3-year randomized, placebo-controlled clinical trial. Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA 32, 185–191

Salma, Ahmad SS, Karim S, Ibrahim IM, Alkreathy HM, Alsieni M, Khan MA (2022): Effect of Vitamin K on Bone Mineral Density and Fracture Risk in Adults: Systematic Review and Meta-Analysis. Biomedicines 10, 1048

Saltzman JR, Russell RM (1998): The aging gut. Nutritional issues. Gastroenterol Clin North Am 27, 309–324

Sato T, Schurgers LJ, Uenishi K (2012): Comparison of menaquinone-4 and menaquinone-7 bioavailability in healthy women. Nutr J 11, 93

Sato T, Inaba N, Yamashita T (2020): MK-7 and Its Effects on Bone Quality and Strength. Nutrients 12, 965

Schett G, Kiechl S, Weger S, Pederiva A, Mayr A, Petrangeli M, Oberhollenzer F, Lorenzini R, Redlich K, Axmann R, et al. (2006): High-sensitivity C-reactive protein and risk of nontraumatic fractures in the Bruneck study. Arch Intern Med 166, 2495–2501

Schurgers LJ, Vermeer C (2000): Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Food. Pathophysiol Haemost Thromb 30, 298–307

Schurgers LJ, Vermeer C (2002): Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj 1570, 27–32

Schurgers LJ, Teunissen KJF, Hamulyák K, Knapen MHJ, Vik H, Vermeer C (2006): Vitamin K–containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. Blood 109, 3279–3283

Sconce E, Avery P, Wynne H, Kamali F (2007): Vitamin K supplementation can improve stability of anticoagulation for patients with unexplained variability in response to warfarin. Blood 109, 2419–2423

Shea MK, Booth SL (2016): Concepts and Controversies in Evaluating Vitamin K Status in Population-Based Studies. Nutrients 8, 8

Shea MK, Booth SL, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Kathiresan S, Keaney JF, et al. (2008): Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. Am J Epidemiol 167, 313–320

Shea MK, Kritchevsky SB, Loeser RF, Booth SL (2020): Vitamin K Status and Mobility Limitation and Disability in Older Adults: The Health, Aging, and Body Composition Study. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 75, 792–797

Shearer MJ (1995): Vitamin K. Lancet 345, 229–234

Shearer MJ, Newman P (2008a): Metabolism and cell biology of vitamin K. Thromb Haemost 100, 530–547

Shearer MJ, Newman P (2008b): Metabolism and cell biology of vitamin K. Thromb Haemost 100, 530–547

Shearer MJ, Fu X, Booth SL (2012): Vitamin K Nutrition, Metabolism, and Requirements: Current Concepts and Future Research. Adv Nutr 3, 182–195

Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M (2000): Vitamin K2 (Menatetrenone) Effectively Prevents Fractures and Sustains Lumbar Bone Mineral Density in Osteoporosis. J Bone Miner Res 15, 515–521

Silverman S, Viswanathan HN, Yang Y-C, Wang A, Boonen S, Ragi-Eis S, Fardellone P, Gilchrist N, Lips P, Nevitt M, et al. (2012): Impact of clinical fractures on health-related quality of life is dependent on time of assessment since fracture: results from the FREEDOM trial. Osteoporos Int 23, 1361–1369

Simes DC, Viegas CSB, Araújo N, Marreiros C (2020): Vitamin K as a Diet Supplement with Impact in Human Health: Current Evidence in Age-Related Diseases. Nutrients 12, 138

Stock M, Schett G (2021): Vitamin K-Dependent Proteins in Skeletal Development and Disease. Int J Mol Sci 22, 9328

Su S, He N, Men P, Song C, Zhai S (2019): The efficacy and safety of menatetrenone in the management of osteoporosis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Osteoporos Int 30, 1175–1186

Suhara Y, Kamao M, Tsugawa N, Okano T (2005): Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Anal Chem 77, 757–763

Suttie JW (1980): Mechanism of action of vitamin K: synthesis of gamma-carboxyglutamic acid. CRC Crit Rev Biochem 8, 191–223

Swedish Council on Health Technology Assessment: Osteoporosis – Prevention, Diagnosis and Treatment: A Systematic Review (SBU Systematic Review Summaries). 2003

Tarallo P, Henny J, Fournier B, Siest G (1990): Plasma osteocalcin: biological variations and reference limits. Scand J Clin Lab Invest 50, 649–655

Theuwissen E, Magdeleyns EJ, Braam L a. JLM, Teunissen KJ, Knapen MH, Binnekamp I a. G, Summeren MJH van, Vermeer C (2014): Vitamin K status in healthy volunteers. Food Funct 5, 229–234

Torres R, de la Piedra C, Rapado A (1989): Osteocalcin and bone remodelling in Paget's disease of bone, primary hyperparathyroidism, hypercalcaemia of malignancy and involutional osteoporosis. Scand J Clin Lab Invest 49, 279–285

Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T (2006): Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for γ-carboxylation of osteocalcin2. Am J Clin Nutr 83, 380–386

Tsujioka T, Miura Y, Otsuki T, Nishimura Y, Hyodoh F, Wada H, Sugihara T (2006): The mechanisms of vitamin K2-induced apoptosis of myeloma cells. Haematologica 91, 613–619

Uotila L, Suttie JW (1982): Recent findings in understanding the biological function of vitamin K. Med Biol 60, 16–24

Vermeer C (1990): Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. Biochem J 266, 625–636

Vermeer C, Shearer M, Zittermann A, Bolton-Smith C, Szulc P, Hodges S, Walter P, Rambeck W, Stöcklin E, Weber P (2005): Beyond Deficiency: Potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health. Eur J Nutr 43, 325–35

Wen L, Chen J, Duan L, Li S (2018): Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review). Mol Med Rep 18, 3–15

WHO (2007): Assessment of osteoporosis at the primary health care level.

Withold W (1997): Die Massenkonzentration der alkalischen Knochenphosphatase ist der Bestimmung von Osteocalcin bei der Diagnose von Knochenmetastasen überlegen. J Lab Med 21, 223–228

Yasui T, Miyatani Y, Tomita J, Yamada M, Uemura H, Miura M, Irahara M (2006): Effect of vitamin K2 treatment on carboxylation of osteocalcin in early postmenopausal women. Gynecol Endocrinol 22, 455–459

Zhang Yingfeng, Liu Z, Duan L, Ji Y, Yang S, Zhang Yuan, Li H, Wang Y, Wang P, Chen J, Li Y (2020): Effect of Low-Dose Vitamin K2 Supplementation on Bone Mineral Density in Middle-Aged and Elderly Chinese: A Randomized Controlled Study. Calcif Tissue Int 106, 476–485

Zhou M, Han S, Zhang W, Wu D (2022): Efficacy and safety of vitamin K2 for postmenopausal women with osteoporosis at a long-term follow-up: meta-analysis and systematic review. J Bone Miner Metab 40, 763–772