



# KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ VITAMINU K U DĚTÍ S CYSTICKOU FIBRÓZOU METODOU LC-MS/MS

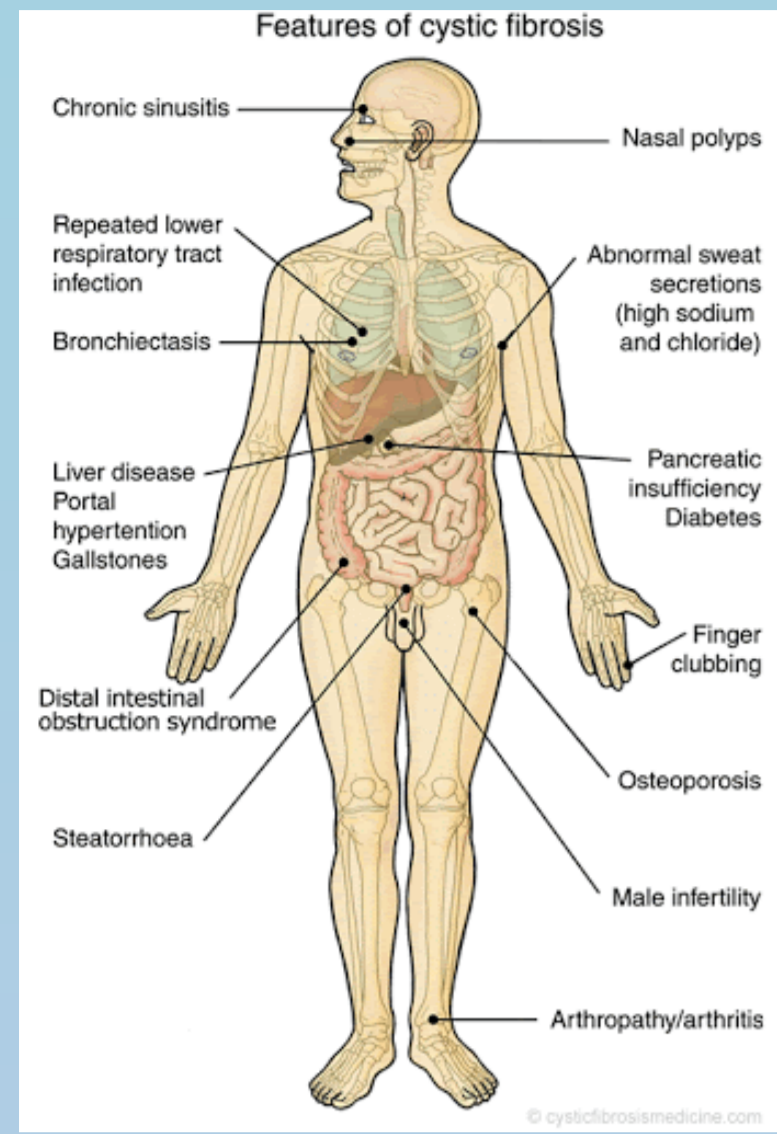


Kateřina Dunovská, Eva Klapková, Jana Čepová, Richard Průša

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2.LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5 - Motol

kontakt: dunovska.katka@seznam.cz

## Úvod

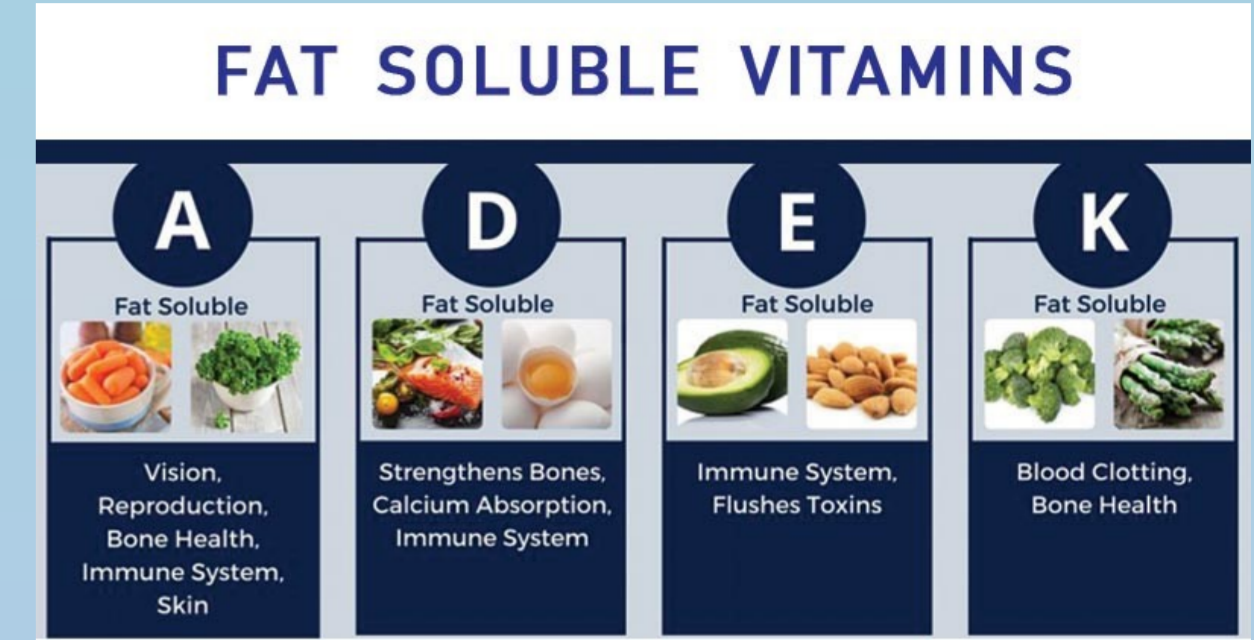


Obr. 1 Projevy cystické fibrózy

<http://www.cfmedicine.com/html/docs/cfcontext/basicproblem.htm>

Cystická fibróza (CF) je závažné autosomálně recesivní onemocnění vedoucí k multiorgánové dysfunkci postihující zejména respirační systém, zažívací ústrojí, pankreas a játra. Nedostatečná funkce pankreatu se projevuje neprospíváním a řídkými stolicemi s nestráveným tukem, ale také nedostatkem vitaminů rozpustných v tucích (vitaminy A, D, E a K).

Nedostatek vitamínu K<sub>1</sub> může mít za následek poruchy hemokoagulace. Pacienti mají zvýšené riziko krvácení, vzniku modřin, vyšší krvácivosti z dásní nebo nosu, přítomnosti krve ve stolici a moči. V literatuře je popisována asociace insuficience vitamínu K<sub>2</sub> s rizikem rozvoje diabetu mellitu 2. typu. Diabetes mellitus 2. typu patří mezi častá onemocnění, která postihují pacienty s cystickou fibrózou. Vitamin K dokáže redukovat sníženou rezistenci na inzulín, která provází právě diabetes mellitus 2. typu, a snižuje riziko výskytu tohoto onemocnění pomocí dostatečně karboxylovaného osteokalcinu.



Obr.2 Lipofilní vitaminy

<https://microbenotes.com/fat-soluble-vitamins-vitamin-a-d-e-and-k/>

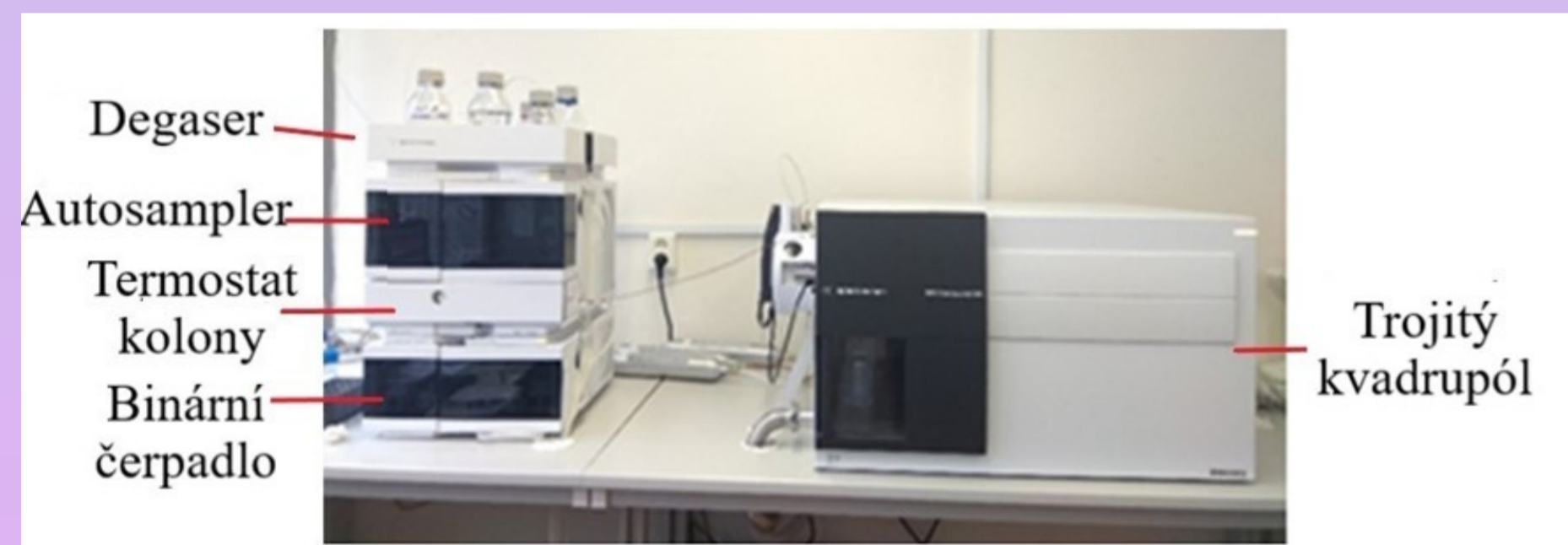
## Cíle práce

Cílem této práce bylo:

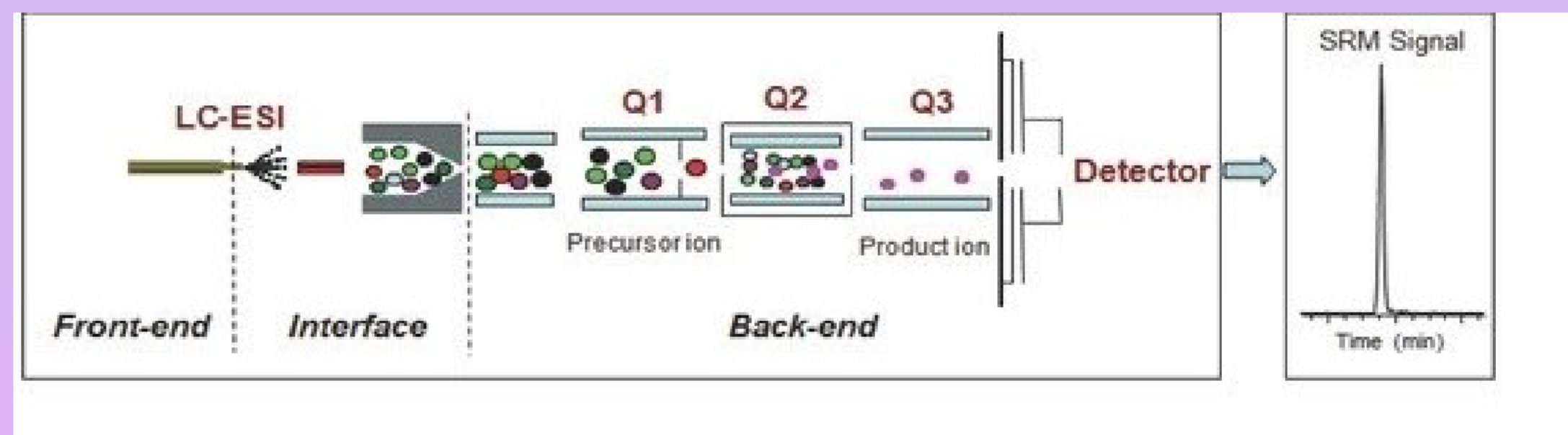
- 1) Validovat LC – MS/MS metodu pro stanovení vitamínu K<sub>1</sub> a K<sub>2</sub> zejména formy: MK-4 a MK-7 v séru.
- 2) Stanovit hladiny vitamínu K<sub>1</sub> a vitaminů K<sub>2</sub> u dětských pacientů s cystickou fibrózou.
- 3) Porovnat hladiny vitaminů K se zdravou populací.

## Materiál a metody

Stanovení koncentrací vitaminů K v séru bylo prováděno pomocí kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+) na systému Agilent 1290 Triple Quad 6470. Separace jednotlivých vitaminů K probíhala na koloně s reverzní fází SB-C8 (1,8 μm, 2,1 x 100mm) při teplotě 40 °C za použití gradientu mobilních fází (A – 50% metanol s 0,1% fluoridem amonným, B – 100% metanol s 0,1% fluoridem amonným). Jako vnitřní standardy byly použity deuterizované standardy pro jednotlivé formy vitamínu K. Pro přípravu vzorku byla použita extrakce na pevné fázi. Analýza vzorku trvala 9 minut.



Obr. 3 LC sestava Agilent 1290 s detektorem 6470 – trojitý kvadrupól (Agilent Technologies, USA)



Obr. 4 Princip trojitého kvadrupólu

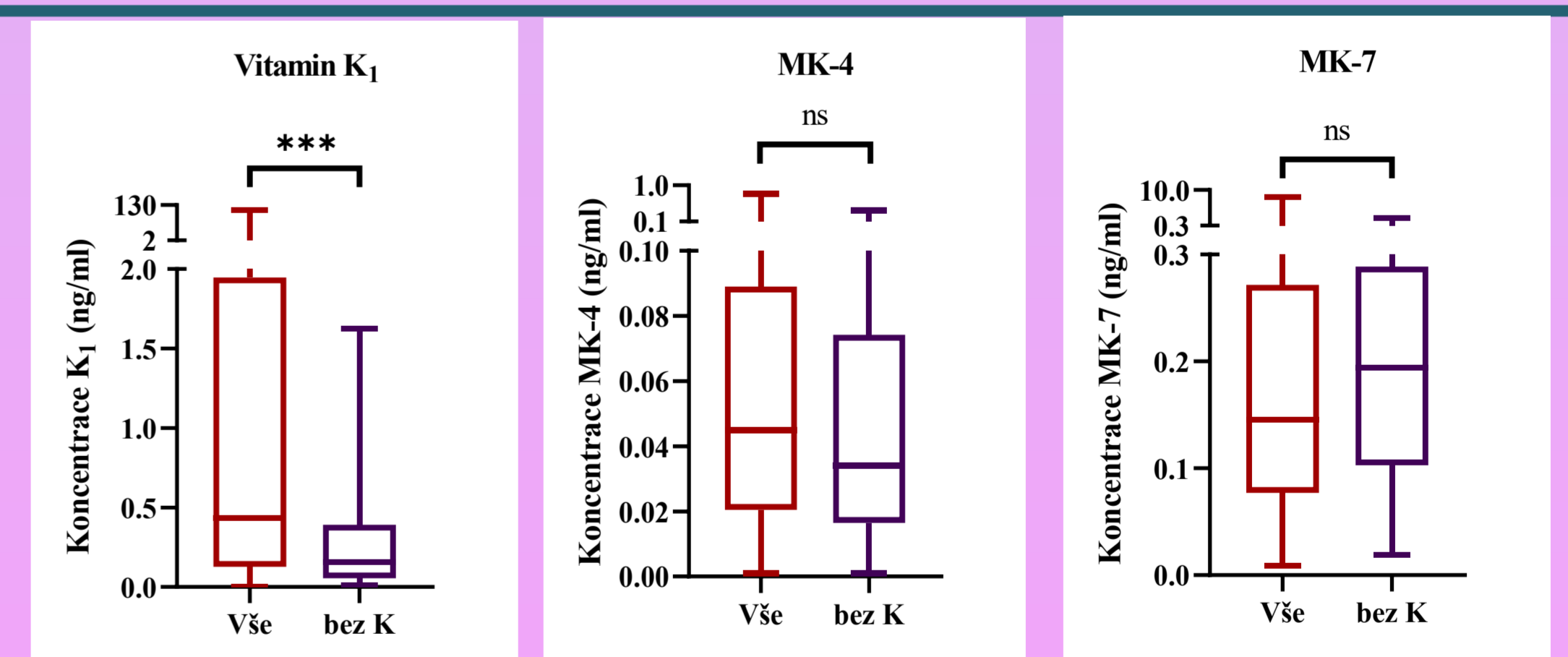
[https://www.researchgate.net/figure/A-Schematic-diagram-of-a-triple-quadrupole-mass-spectrometer-QQO-MS-Typical-SRM\\_fig4\\_224940197](https://www.researchgate.net/figure/A-Schematic-diagram-of-a-triple-quadrupole-mass-spectrometer-QQO-MS-Typical-SRM_fig4_224940197)



Obr. 5 Chromatografický záznam vitaminů K

## Výsledky

Celkem bylo analyzováno 202 sérových vzorků od dětských pacientů s CF. Pacienti s cystickou fibrózou, kteří neužívají Kanavit, vykazovali hladiny vitamínu K<sub>1</sub> nižší než u zdravé populace, zatímco pacienti s cystickou fibrózou při užívání Kanavitu vykazovali hladiny vitamínu K<sub>1</sub> staticky nevýznamně rozdílné od hladin vitamínu K<sub>1</sub> u zdravé populace. Pomocí nepárového neparametrického testu (Mann-Whitney test) byla testována statisticky významná rozdílnost dat mezi pacienty bez substituční léčby vitamínem K a u všech pacientů s CF. U vitamínu K<sub>1</sub> (p-hodnota <0,0001) se data statisticky významně liší.



Obr. 6 Vitamin K u všech pacientů s CF a u pacientů s CF neužívajících vitamin K<sub>1</sub>

(ns – statisticky nevýznamný rozdíl dat, \*\*\* – statisticky významný rozdíl dat)

	Vitamin K <sub>1</sub> (ng/ml)	MK-4 (ng/ml)	MK-7 (ng/ml)
<b>Fyziologické rozmezí</b>	0,044 – 1,357 (ženy) 0,030 – 1,214 (muži)	0,050 – 1,598	0,074 – 0,759
<b>Medián</b>	0,200	0,090	0,190

Tab. 1 Referenční rozmezí zdravé populace (n = 191)

Někteří pacienti s cystickou fibrózou mají významně snížené hladiny forem vitamínu K<sub>2</sub> oproti zdravé populaci. U 83 pacientů nebylo možné detekovat hladiny MK-4, u 72 pacientů nebylo možné detekovat hladiny vitamínu K<sub>1</sub>. Koncentrace vitamínu MK-7 bylo možné kvantifikovat u všech pacientů.

## Závěr

Vitamin K je poslední z lipofilních vitaminů, který se rutinně u pacientů s CF nestanovuje, i přestože jsou pacientům podávány přípravky obsahující tento vitamin. Pro sledování zásob vitamínu K v organismu se využívá nejčastěji INR, které na změnu hladin vitamínu K reaguje pomalu. Nízké hladiny vitamínu K<sub>2</sub> mohou vypovídat i o zhoršené absorpci či střevní produkci těchto forem vitaminů.

Tato studie ukazuje, že užívání Kanavitu má vliv na zvýšení hladiny vitamínu K<sub>1</sub>, ale žádný vliv na zvýšení hladin vitaminů MK-4 a MK-7. Suplementace vitamínem K<sub>2</sub> u pacientů s cystickou fibrózou by mohla být přínosná.

## Poděkování

Tato práce je podpořena projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 0064203 (FN MOTOL). Práce je financována z interního grantu 6015 (FN Motol).