

CHEMILUMINISCENČNÍ A FOTOMETRICKÁ ANALÝZA MATRIX GLA PROTEINU U PACIENTŮ S ONEMOCNĚNÍM POHYBOVÉHO APARÁTU

MILOŠ BARNA^{a,b}, JANA ČEPOVÁ^a, KATEŘINA DUNOVSKÁ^a, JAKUB PETRUS^a,
PAVEL MELICHERČÍK^b, RICHARD PRŮŠA^a, RENÉ KIZEK^a a EVA KLAPKOVÁ^a

^a Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, ^b 1. Ortopedická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha, Česká republika
eva.klapkova@fnmotol.cz

Došlo 2.8.23, přijato 4.9.23.

Matrix Gla protein (MGP) je cirkulující protein s nízkou molekulární hmotností, který působí jako přirozený inhibitor kalcifikace. Řadíme ho do skupiny proteinů označených jako vitamin K dependentní proteiny. Jeho hlavní funkcí je prevence ukládání vápníku do měkkých tkání. Pro správné fungování musí být MGP dostatečně karboxylován a fosforylován, což je proces, který vyžaduje vitamin K₂ jako kofaktor gamma-glutamylkarboxylasy. Nedostatek vitamínu K se projevuje kardiovaskulárním onemocněním, nedostatečnou mineralizací kostní tkáně a vznikem kalcifikujících deposit v měkkých tkáních. Cílem práce bylo navržení metod pro sledování hladiny MGP a defosforylovaného nedostatečně karboxylovaného MGP (dp-uc MGP) za využití imunochemické detekce a aplikovat je na analýzu reálných patientských vzorků pro použití v klinických laboratořích, kde by tyto markery mohly sloužit jako potenciální markery závažnosti kloubních onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění a také jako markery vypovídající o stavu vitamínu K v organismu.

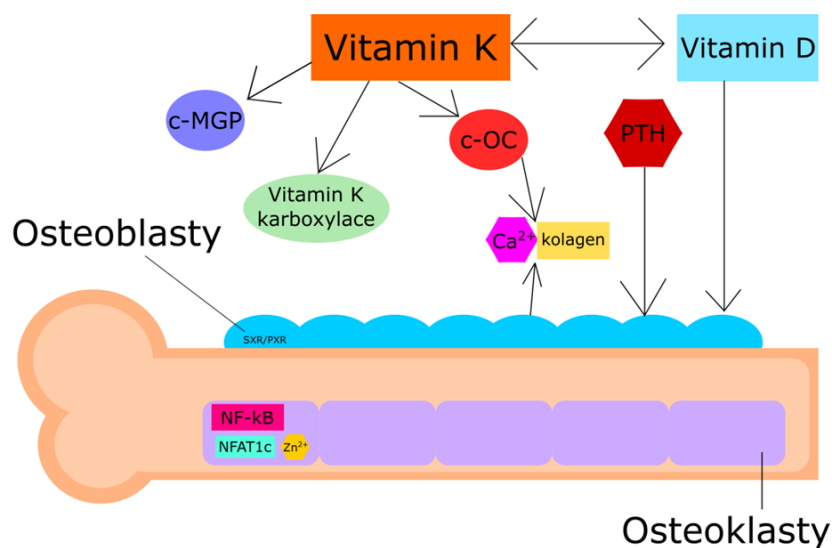
Klíčová slova: ELISA; hladiny vápníku a fosforu; kostní metabolismus; matrixové proteiny, vitamin K

Úvod

Heterotopické osifikace a kalcifikující tendinitida patří mezi onemocnění měkkých tkání pohybového aparátu s neznámou etiologií^{1,2}. Heterotopické osifikace jsou charakterizovány jako vznik lamelární kosti uvnitř měkkých tkání. Vznikají nejčastěji po operaci náhrady kyčelního kloubu^{1,2}. Jsou závažnou komplikací, která může vést k omezení hybnosti operovaného kloubu s nutností dalšího operačního zákroku^{3,4}. Příčina vzniku těchto osifikací zatím stále není jasná, nicméně existují rizikové faktory, které vznik tohoto onemocnění výrazně podporují. Jak je ukázáno na obr. 1, do procesu kostního metabolismu je zapojena řada molekul v různých molekulárně-biologických procesech. Některé z těchto molekul by se mohly stát vhodnými prognostickými markery osifikace^{5,6}.

Matrix γ -karboxyglutamátový (Gla) protein (MGP, 9531 Daltonů, pI 8,66) patří do skupiny matrixových proteinů, jejichž význam je momentálně intenzivně studován. MGP je jeden z rodiny vitamin K-dependentních proteinů (VKDP). Tato rodina čítá celkově 17 VKDP. Propeptid je při maturaci odštěpen karboxypeptidasou N. MGP obsahuje ve své molekule 5 karboxyglutamátů a 3 fosfoseriny. Mezi pozicemi 73 a 79 je disulfidová vazba a mezi pozicemi 51 a 97 je vlastní Gla doména. Biologický poločas

u savčích retikulocytů *in vitro* je 2,8 hodiny. Zatímco se předpokládá, že karboxylace má vliv na vazbu vápníku mezi dvě rezidua karboxylové kyseliny, fosforylace má ovlivnit uvolňování MGP do buněk⁷. Protože obě modifikace mohou být provedeny neúplně, mohou být identifikovány různé formy těchto MGP. Ačkoli úloha MGP není zcela známa, předpokládá se, že jeho exprese v subendoteliálních makrofázích a buňkách hladkého svalstva cév je zapojena do vaskulární kalcifikace jako důležitý lokální inhibitor^{8,9}. Syntéza MGP podléhá dvěma posttranslačním modifikacím: vitamínu K-dependentní γ -glutamátové karboxylaci a serinové fosforylaci^{10–12}. Nedostatek vitamínu K u dialyzovaných pacientů komplikuje karboxylaci MGP (cit.¹³). V několika studiích byl prokázán klinický význam stanovení hladin MGP v krevním séru pacientů pro diagnostiku kardiovaskulárních onemocnění a osteoartrózy^{7,10,14–17}. V současnosti je k dispozici velmi málo informací o vztahu MGP k heterotopické osifikaci. Pro analýzu proteinů jsou využívány především imunochemické metody v různém uspořádání^{18,19}. Tyto metody jsou vhodné pro monitorování velmi nízkých koncentrací proteinů. Cílem práce bylo navržení metod pro sledování hladiny MGP a dp-uc MGP jako potenciálního markeru heterotopické osifikace, kalcifikující tendinitidy ramene či kardiovaskulárních onemocnění.



Obr. 1. **Kostní metabolismus představuje celou řadu složitých vazeb.** Na zjednodušeném schématu jsou naznačeny vazby k transkripčním faktorům jako je NF-kB, NFAT1C, SXR/PXR. Je předpokládána asociace vitamínu K₂ s c-MGP proteinem, c-OC (osteokalcinem). Zde je interakce vápenatých iontů s kolagenovými vlákny. Na regulační úrovni zde vstupují PTH (parathormon) i vitamin D.

Experimentální část

Použité chemikálie

Isopropanol, hexan, diethylether a fluorid amonný byly v LC-MS čistotě. Deuterizované standardy vitamínů (MK-7-7- a K₁-d7) byly zakoupeny v Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, ON, Kanada). Fylochinon, MK-7 a ostatní chemikálie použité pro analýzu byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) v čistotě p.a. Chemická/biochemická analýza využívala pracovní roztoky od společnosti Siemens (USA).

Biologický materiál a příprava roztoků a vzorků

Pro primární analýzu bylo získáno přibližně 5 ml krve do zkumavek Vacuette s akcelerátorem hemokoagulace. Následnou centrifugací (Avanti J-15R, Beckman Coulter (USA) 1500 g, 10 min, 4 °C) bylo odděleno krevní sérum pro biochemickou analýzu. Před každým odběrem krve byl podepsán informovaný souhlas. Všechna vyšetření jsou v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Kontrolní skupina zdravých probandů bez postižení pohybového aparátu byla vybrána tak, aby věkově byla podobná skupině pacientů ($n = 30$). Skupiny pacientů s onemocněním pohybového aparátu byly rozděleny na skupinu s kalcifikující tendinitidou ramene ($n = 21$); dále s heterotopickou osifikací kyčle ($n = 19$); s kalcifikací kolene ($n = 1$); a s artritidou ($n = 2$).

MGP ELISA stanovení

Pro detekci MGP byla využita metoda ELISA (Human Matrix Gla Protein, MyBioSource, USA). Sekundární protilátka byla značená křenuvou peroxidasou a jako substrát byl použit 5 mmol l⁻¹ TMB (tetramethylbenzidin) s obsahem 3 mmol l⁻¹ peroxidu vodíku. K zastavení reakce je používán přídatek 0,1 mol l⁻¹ kyseliny sírové. Lidský MGP byl použit jako kalibrátor. K promývání bylo využito TECAN zařízení. Měření bylo provedeno na desítkovém čtecím zařízení Infinite (Tecan, Japonsko). Čtení barevného produktu reakce bylo nastaveno na střed jamky při 540 nm. Data byla vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Více podrobností je uvedeno v práci Schurgerse¹⁵.

IDS-iSYS analýza

Analýza dp-uc MGP byla provedena plně automatizovaně na IDS-iSYS (Immuno-diagnostic Systems Holdings PLC, UK) za využití IDS InaKtif MGP (dp-uc MGP). K detekci je využívána fluorescenčně značená monoklonální protilátka dp-uc MGP. K detekci bylo využito chemiluminiscence (CLIA). Množství dávkovaného vzorku séra bylo 50 μl. Další podrobnosti jsou uvedeny v metodice analýzy.

LC-MS/MS analýza

K analýze vitamínu K₁ a vitamínu K₂ (MK-7) v séru byl použit chromatografický systém Agilent Technologies 1290 Infinity II LC (Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, USA) s autosamplerem, pumpami a termostátovanou kolonou za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Hmotnostní detekce byla prováděna pomocí trojitěho kvadrupólu v módu MRM (Agilent 1290, Triple Quad 6470, Agilent Technologies). Jako vnitřní standardy byly použity isotopově značené formy vitamínu K (MK-7-d7, K₁-d7). Před samotnou analýzou bylo nezbytné provést předúpravu vzorku extrakcí tuhými fázemi (SPE). Vzorky byly separovány na koloně SB-C8 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) při 40 °C za použití gradientu mobilních fází (A – 0,1% fluorid amonný v 50% methanolu, B – 0,1% fluorid amonný v methanolu). Doba separace byla přibližně 9 minut. Pro přípravu vzorku bylo použito 500 μl séra, ke kterému bylo přidáno 10 μl vnitřního standardu. Následně byly přidány 2 ml ethanolu, aby došlo k uvolnění vitamínů z vazby. Poté byl vzorek 5 min extrahován do 4 ml hexanu a centrifugován při 3727 g po dobu 10 min. Organická vrstva byla následně odpařena pod proudem dusíku a lipidový extrakt byl rozpuštěn ve 2 ml hexanu. U takto připraveného vzorku byla provedena SPE. Extrakční kolonky byly aktivovány postupně 9 ml hexanu a k eluci byla použita směs diethyletheru s hexanem (3:97). Takto připravený vzorek byl následně opět odpařen a odparek rozpuštěn ve 100 μl propan-2-olu. Připravený vzorek se přenesl do vialky a byl analyzován metodou LC-MS/MS. Další detaily jsou uvedeny v práci Dunovské²⁰.

Chemická analýza

Pro chemickou analýzu vzorků pacientů byl použit analyzátor Atellica Solutions CH 930 (Siemens, USA) a Atellica Solutions IM (Siemens, USA), který používá mikroobjemovou technologii pro fotometrické analýzy. Byly stanoveny koncentrace Ca, P, ALP, kreatininu a 25-(OH) vitamínu D. Ultračistá voda byla připravena na zařízení ELGA (Londýn, Spojené království), pH bylo kontrolováno na pH metru (VWR, USA).

Statistické a matematické vyhodnocení

Veškerá analyzovaná data byla převedena do laboratorní databáze QINSLAB a statisticky vyhodnocena. Všechny analýzy byly provedeny minimálně ve 3 opakováních. Analytické parametry LOD a LOQ byly vypočítány podle práce Hubaoux a Vose²¹.

Výsledky a diskuse

Biochemická a chemická analýza krevních sér pacientů

Ve sledovaném pilotním souboru pacientů s onemocněním pohybového aparátu byly analyzovány vybrané biochemické parametry související s kostním metabolismem (tab. I). Podle diagnóz byly vytvořeny skupiny. V jednotlivých skupinách byly stanoveny hladiny

analytů biochemických markerů vyjádřených jako průměrné hodnoty ALP (μkat l⁻¹): kontrola (1,2); ramena (1,3); kyčle (1,5); kolena (1,6); artritida (1,0); kreatinin (μmol l⁻¹): kontrola (81,6); ramena (69,4); kyčle (71,2); kolena (83,6); artritida (66,4); Ca (mmol l⁻¹): kontrola (2,4); ramena (2,4); kyčle (2,5); kolena (2,5); artritida (2,4); P (mmol l⁻¹): kontrola (1,1); ramena (1,2); kyčle (1,1); kolena (0,9); artritida (1,2); 25-(OH)-vitamin D (nmol l⁻¹): kontrola (86); ramena (73); kyčle (58); kolena (62); artritida (88). Zejména u vitamínu K₂ byl pozorován pozitivní účinek na kostní hmotu, kde působí na osteokalcin v průběhu jeho karboxylace. Dostatečná karboxylace je také nezbytná u MGP. Hladiny vybraných vitamínů byly analyzovány technikou LC-MS/MS (cit.^{20,22}). Vitamin K₂ MK-7 (nmol l⁻¹): kontrola (0,31); ramena (0,30); kyčle (0,37); kolena (0,96); artritida (0,38). Z těchto prvotních experimentálních dat byla provedena korelační analýza testovaných průměrných biochemických ukazatelů stanovených v séru. Byla zjištěna korelace k hladině sérového 25-(OH) vitamínu D a ALP (r = -0,881), dále MK-7 a MGP (r = 0,995), MGP a P (r = -0,894) a MGP a Ca (r = 0,768).

Spektrofotometrické stanovení celkového MGP

Byly publikovány studie zabývající se rozdíly v koncentracích MGP v séru u zdravých probandů, u pacientů s *anginou pectoris*, onemocněními chrupavky a osteoartrózy^{15,23–25}. Autoři naznačují, že MGP by se mohlo používat jako marker aktivity osteoartrózy²⁶.

Závislost změny signálu na koncentraci MGP

V naší práci jsme optimalizovali postup pro stanovení celkového MGP v biologickém vzorku. Po primárním promytí destičky bylo k analýze použito 100 μl vzorku (10× ředění sérum). MGP se vázal na primární protilátku ukotvenou k povrchu destičky. K vlastní detekci byla využita protilátka značená peroxidásou (inkubace 60 min, 37 °C, 100 rpm v 0,01 mol l⁻¹ PBS, pH 7,0). Jako vhodný substrát byl využíván 5 mmol l⁻¹ TMB. Oxidací TMB vzniká typický barevný produkt (vložený obrázek v obr. 2Ab). Byla testována závislost signálu na koncentraci MGP (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 a 0 ng ml⁻¹). Obr. 2Ab ukazuje lineární část od 0 do 10 ng ml⁻¹. Ze získaných dat (n = 12) byly vypočteny analytické parametry: r = 0,9968; RSD = 9,3 %; LOD = 1,6; LOQ = 5,4 ng ml⁻¹; QC = koeficient 7,4 %. Získaná závislost byla využita pro stanovení koncentrace MGP v séru pacientů.

Koncentrace MGP u vzorků pacientů

Kromě toho byla ELISA metoda dále využita pro stanovení MGP proteinu u vybraných pacientů s dobrou reprodukovatelností do 20 %. Celkem bylo analyzováno 76 vzorků krevních sér (obr. 3Aa). Průměrná hladina MGP byla 25,9 ng ml⁻¹ s mediánem 20,5 ng ml⁻¹ a extrémní minimální koncentrace 8 ng ml⁻¹ a maximální koncentrace 73,1 ng ml⁻¹. V tomto vzorku bylo analyzováno 29 kontrol s průměrnou hladinou MGP 22,9 ng ml⁻¹

Tabulka I
Popis biochemických a chemických parametrů sledované skupiny probandů^a

Popis sledované skupiny	Zdraví probandi	Kalcifikace kolene	Kalcifikace ramene	Osifikace kyčle	Artritida
Počet případů, <i>n</i>	30	1	21	19	2
Věk	58 (58)	62 (62)	50 (49)	65 (73)	59 (59)
Alkalická fosfatasa (ALP), $\mu\text{kat l}^{-1}$	$1,2 \pm 0,4$ (1,2)	1,6 (1,6)	$1,3 \pm 0,3$ (1,3)	$1,5 \pm 0,5$ (1,5)	$1,0 \pm 0,2$ (1,0)
Kreatinin, $\mu\text{mol l}^{-1}$	$81,6 \pm 20,5$ (80,9)	83,6 (83,6)	$69,4 \pm 13,5$ (64,5)	$71,2 \pm 20,2$ (72,4)	$66,4 \pm 18,9$ (66,4)
Celkové vápenaté ionty, mmol l^{-1}	$2,4 \pm 0,1$ (2,4)	2,5 (2,5)	$2,4 \pm 0,1$ (2,4)	$2,5 \pm 0,2$ (2,5)	$2,4 \pm 0,1$ (2,4)
Celkové fosfáty, mmol l^{-1}	$1,1 \pm 0,2$ (1,1)	0,9 (0,9)	$1,2 \pm 0,2$ (1,2)	$1,1 \pm 0,2$ (1,2)	$1,2 \pm 0,2$ (1,2)
25-(OH) vitamin D, nmol l^{-1}	86 ± 16 (88)	62 (62)	73 ± 16 (75)	58 ± 14 (59)	85 ± 16 (85)
MK-7, ng ml^{-1}	$0,31 \pm 0,16$ (0,28)	0,96 (0,96)	$0,30 \pm 0,13$ (0,27)	$0,37 \pm 0,26$ (0,33)	$0,38 \pm 0,09$ (0,38)
MGP, ng ml^{-1}	23 ± 11 (18)	65 (65)	23 ± 16 (19)	28 ± 16 (23)	33 ± 28 (32)

^a Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty a směrodatná odchylka, v závorce je medián.

a mediánem 18 ng ml^{-1} . U 21 vzorků pacientů byla průměrná hladina MGP $30,2 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $27,9 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích MGP mezi skupinami ($p = 0,2191$) (obr. 3Ba). Na obr. 3Ca je ukázán rozdíl distribuce koncentrace MGP mezi pohlavími. U mužů byla koncentrace MGP $21,4 \text{ ng ml}^{-1}$ s mediánem $21,3 \text{ ng ml}^{-1}$ a u žen byla průměrná koncentrace MGP $16,9 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $17,0 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích MGP mezi skupinami ($p = 0,11$). Podle frekvenčního histogramu je většina hodnot sérové koncentrace MGP v intervalu od 6 do 14 nmol l^{-1} .

Chemiluminiscenční stanovení celkového dp-uc MGP

V několika studiích byl jako možný prediktor mortality popisován dp-uc MGP (cit.^{27–30}). dp-uc MGP by mohl mít vyšší klinickou specificitu než MGP, proto jsme se pokusili tento protein stanovit. Koncentrační hladiny dp-uc MGP jsou velmi nízké, a proto jejich stanovení vyžaduje pozornost.

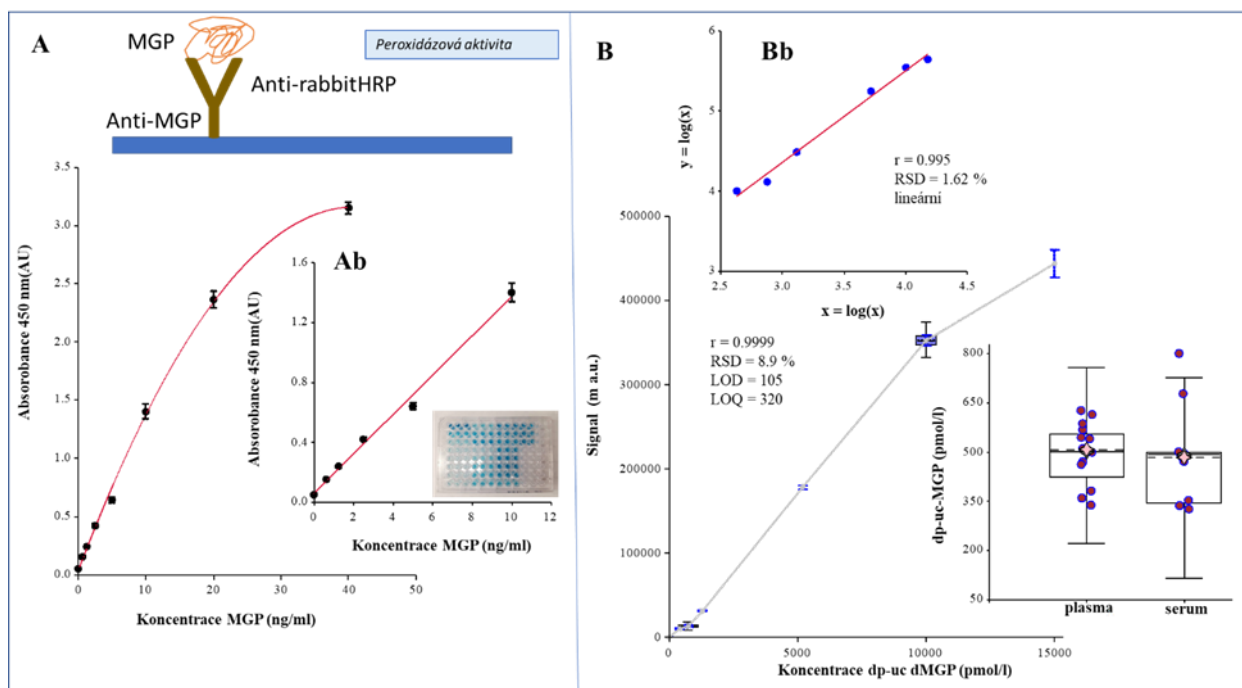
Závislost změny signálu na koncentraci dp-uc MGP

Analýza probíhala za využití plně automatizovaného systému (dávkování vzorku, promývání, inkubace, detekce). K detekci je využíváno fluorescenčně značené protilátky, která se specificky váže na detekční komplex. Fluorescenční signál pozadí je poměrně nízký, a tak je možné rozlišit i velmi nízkou koncentraci stanovovaného analytu. Na obr. 2B je závislost fluorescenčního signálu na koncentraci dp-uc MGP ($0\text{--}15\ 000 \text{ pmol l}^{-1}$). Závislost nebyla lineární a pro určení koncentrace ve vzorcích vyhovoval model kvadratické křivky ($y = -19418 + 45,17x -$

$0,0009x^2$). Kalibrační experimenty byly provedeny v několika nezávislých opakováních ($n = 8$) s dobrou relativní chybou kolem 8,9 %. Ze získaných dat bylo možné určit $\text{LOD} = 105$ a $\text{LOQ} = 320 \text{ pmol l}^{-1}$. Ve vloženém obrázku v obr. 2B je závislost signálu na koncentraci dp-uc MGP linearizována logaritmováním ($r = 0,995$).

Koncentrace dp-uc MGP u vzorků pacientů

Na obr. 2 B ve vloženém obrázku je ukázána distribuce měřených signálů dp-uc MGP v plasmě a séru stejného vzorku. Průměrné koncentrace byly v plasmě zvýšené v porovnání se sérem ($n = 14$, průměr 501 pmol l^{-1}) a séru ($n = 11$, průměr 492 pmol l^{-1}). Hladina dp-uc MGP v séru je velmi nepatrně nižší než v plasmě (do 10 %), což může způsobovat komplikace při automatizovaném vyhodnocení koncentrace ve vzorku. Celkem bylo analyzováno 41 vzorků krevních sér (obr. 3Ab). Průměrná hladina dp-uc MGP byla $2,47 \text{ ng ml}^{-1}$ s mediánem $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$ a extrémní minimální koncentrace 2 ng ml^{-1} a maximální koncentrace 4 ng ml^{-1} . V tomto vzorku bylo analyzováno 29 kontrol s průměrnou hladinou dp-uc MGP $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$ a mediánem $2,4 \text{ pmol l}^{-1}$. U 21 vzorků pacientů byla průměrná hladina dp-uc MGP $2,55 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích dp-uc MGP mezi skupinami (obr. 3Bb). Na obr. 3Cb je ukázán rozdíl distribuce koncentrace dp-uc MGP mezi pohlavími. U mužů byla koncentrace dp-uc MGP $2,45 \text{ ng ml}^{-1}$ s mediánem $2,4 \text{ ng ml}^{-1}$ a u žen byla průměrná koncentrace dp-uc MGP $2,52 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích dp-uc MGP mezi skupinami. Podle frekvenčního histogramu je většina hodnot sérové koncentrace dp-uc MGP v intervalu od 6 do 14 ng ml^{-1} . Hladiny dp-uc MGP



Obr. 2. ELISA detekce MGP v krevním séru. Závislost na koncentraci MGP (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 a 0 ng ml⁻¹) (A), vložený obrázek lineární závislost (0–10 ng ml⁻¹) (Ab). Sekundární protilátka značená křenuvou peroxidasou oxiduje substrát 5 mmol l⁻¹ TMB, 15 min, 37 °C, 100 rpm za vzniku modrého zbarvení. Enzymatická reakce je zastavena přidávkem 0,05 mol l⁻¹ H₂SO₄. CLIA detekce dp-uc MGP v krevním séru. Změna signálu na koncentraci dp-uc MGP (B) ve vloženém obrázku logaritmičká linearizace koncentrační závislosti (Bb). Pro přepočet koncentrací dp-uc MGP bylo použito MW 12350. Pro všechna testování byl počet jednotlivých opakování 4, chybové úsečky zobrazeny jako CI (95 %). Další podrobnosti jsou uvedeny v části Materiál a metody.

byly v séru velmi homogenní a většina hodnot se pohybovala v intervalu mezi 2–3 ng ml⁻¹ s maximem kolem 2,5 ng ml⁻¹. Na získaném vzorku korelační analýza mezi hladinou průměrných koncentrací dp-uc MGP a MGP prokázala korelační závislost $r = -0,66$.

Závěr

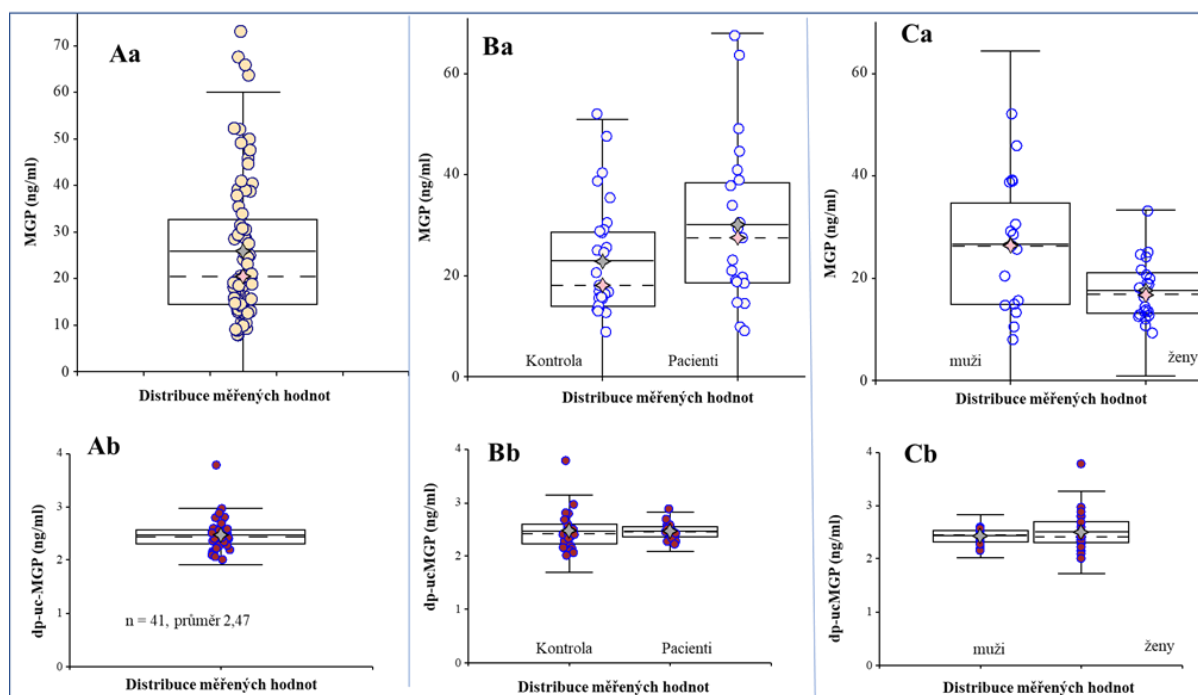
Při nedostatečné karboxylaci MGP dochází k tzv. „kalciovému paradoxu“, kdy se nadměrně ukládají vápenaté ionty do měkkých tkání na úkor kostní hmoty a nastává aberantní mineralizace měkkých tkání. Byly navrženy metody pro detekci MGP a dp-uc MGP splňující základní analytické charakteristiky pro použití v klinických laboratořích. Postup byl aplikován na reálné vzorky pacientů s onemocněním pohybového aparátu. V současné době není stanovení celkového MGP v klinické praxi rutinně využíváno a stanovení dp-uc MGP je využíváno rutinně pouze u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Pilotně získaná experimentální data ukázala na rozdíly mezi testovanými skupinami pacientů a kontrol. Experimenty budou dále rozšiřovány na větší soubor pacientů pro následné využití v ortopedické klinické praxi. Tyto markery

by mohly sloužit jako potenciální ukazatele závažnosti kloubních onemocnění (kalcifikující tendinitida ramene, heterotopické osifikace), kardiovaskulárních onemocnění a také jako markery vypovídající o stavu vitamínu K v organismu.

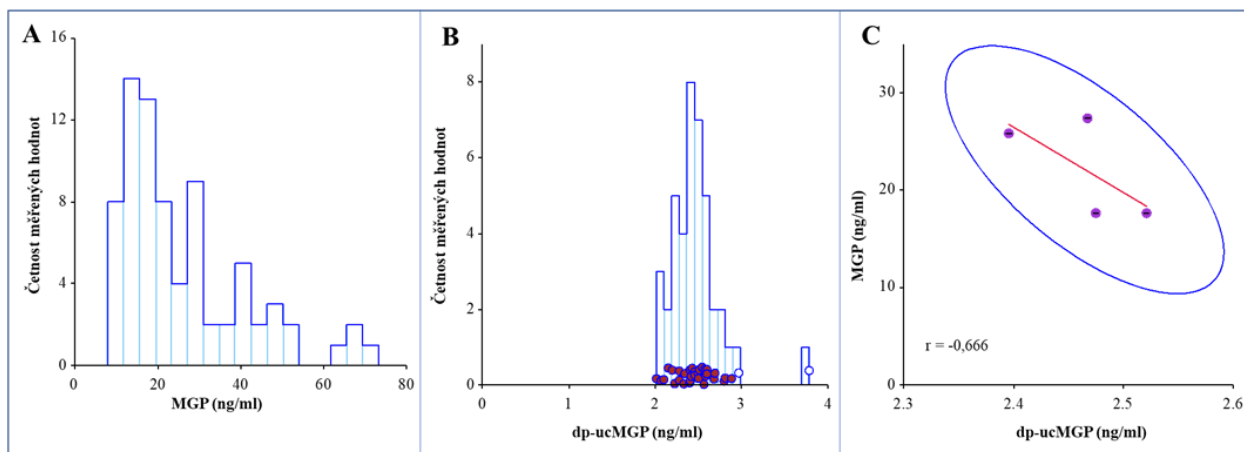
Práce byla realizována za podpory institucionální podpory MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

Seznam zkratk

MGP	celkový MGP, také t-MGP
uc-MGP	nedostatečně karboxylovaný MGP
dp-MGP	defosforylovaný MGP
dp-uc MGP	defosforylovaný nedostatečně karboxylovaný MGP
ELISA	enzymová imunoabsorbční analýza
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií
VKDP	vitamin K dependentní proteiny
VK2	vitamin K ₂
MK-7	menachinon-7



Obr. 3. **Distribuce hladin MGP a dp-uc MGP u kontrolní a patientské skupiny.** Rozvrstvení hladin MGP u všech analyzovaných vzorků krevního séra, $n = 76$ (Aa) a dp-ucMGP $n = 41$ (Ab). Porovnání koncentračních hladin MGP mezi kontrolní skupinou a patientskou skupinou (Ba) a dp-ucMGP (Bb). Porovnání koncentračních hladin MGP mezi pohlavím (Ca) a dp-ucMGP (Cb). Podrobnosti k materiálu a metodám jsou uvedeny v části materiály a metody. Všechny analýzy byly opakovány 3krát.



Obr. 4. **Frekvenční histogramy distribuce naměřených hodnot.** MGP (A) a dp-ucMGP (B) v celkovém souboru vzorků krevních sér. Korelační analýza hladin MGP a dp-uc MGP (C). Další podrobnosti jsou uvedeny na obr. 3.

LITERATURA

1. Kotb M. M., Omar U. F., Kaliya-Perumal A. K.: *Diagnostics* 13, 1711 (2023).
2. Klapkova E., Dunovska K., Kizek R., Hodik M., Cepova J., Prusa R., Barna M., Melicharcik P.: *Motol In* 15, 16 (2023), <https://www.fnmotol.cz/wp-content/uploads/motol-in-kveten-final1-web.pdf>, staženo 4. 9. 2023.
3. Olsen E., Endrizzi D., Stephenson M., Farrarher S.: *Skeletal Radiology* 50, 973 (2021).
4. Dhollander O., McKee A., Houben R.: *Acta Orthop. Belg.* 86, 162 (2020).

5. Wilkinson J. M., Stockley I., Hamer A. J., Barrington N. A., Eastell R.: *J. Orthopaed. Res.* 21, 529 (2003).
6. Ishihara C., Kushida K., Takahashi M., Ohishi T., Murata H., Nagano A., Goto S.: *Spinal Cord* 38, 211 (2000).
7. Bjorklund G., Svanberg E., Dadar M., Card D. J., Chirumbolo S., Harrington D. J., Aaseth J.: *Cur. Med. Chem.* 27, 1647 (2020).
8. Luo G. B., Ducey P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R., Karsenty G.: *Nature* 386, 78 (1997).
9. Murshed M., Schinke T., McKee M. D., Karsenty G.: *J. Cell Biol.* 165, 625 (2004).
10. Schurgers L. J., Cranenburg E. C. M., Vermeer C.: *Thromb. Haemost.* 100, 593 (2008).
11. Westendorf R. a 11 spoluautorů: *Am. J. Kidney Dis.* 59, 186 (2012).
12. Saritas T. a 15 spoluautorů: *Clin. Kid. J.* 15, 2300 (2022).
13. Vidula M. K. a 10 spoluautorů: *Am. J. Hypert.* 35, 393 (2022).
14. Schurgers L. J., Teunissen K. J. F., Knapen M. H. J., Kwaijtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C. P., Cleutjens J. P. M., Vermeer C.: *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 25, 1629 (2005).
15. Schurgers L. J., Teunissen K. J. F., Knapen M. H. J., Geusens P., van der Heijde D., Kwaijtaal M., van Diest R., Ketteler M., Vermeer C.: *Clin. Chim. Acta* 351, 131 (2005).
16. Cranenburg E. C. M. a 11 spoluautorů: *J. Thromb. Haemost.* 9, 1225 (2011).
17. Crintea A., Dutu A. G., Constantin A. M., Fekete Z., Samasca G., Lupan I., Florian I. A., Silaghi C. N., Craciun A. M.: *Biology-Basel* 11, 82 (2022).
18. Svestak M., Sporova L., Prochazkova J., Karpisek M., Dragusin L. G., Moravcikova D., Stejskal D.: *Chem. Listy* 105, 622 (2011).
19. Hou F. P., Sun S. Q., Abdullah S. W., Tang Y., Li X. X., Guo H. C.: *Anal. Met.* 15, 2154 (2023).
20. Dunovska K., Klapkova E., Sopko B., Cepova J., Prusa R.: *PeerJ* 7, e7695 (2019). DOI: 10.7717/peerj.7695.
21. Hubaux A., Vos G.: *Anal. Chem.* 42, 849 (1970).
22. Klapkova E., Cepova J., Dunovska K., Prusa R.: *J. Clin. Lab. Anal.* 32, e22381 (2018).
23. Shea M. K., O'Donnell C. J., Hoffmann U., Dallal G. E., Dawson-Hughes B., Ordovas J. M., Price P. A., Williamson M. K., Booth S. L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1799 (2009).
24. Cranenburg E. C. M., Koos R., Schurgers L. J., Magdeleyns E. J., Schoonbrood T. H. M., Landewé R. B., Brandenburg V. M., Bekers O., Vermeer C.: *Thromb. Haemost.* 104, 811 (2010).
25. Misra D., Booth S. L., Crosier M. D., Ordovas J. M., Felson D. T., Neogi T.: *J. Rheumatol.* 38, 1960 (2011).
26. Lis K.: *Reumatologia* 46, 1 (2008).
27. Wei F. F. a 10 spoluautorů: *J. Am. Heart Assoc.* 8, e011960 (2019).
28. Schlieper G. a 12 spoluautorů: *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 387 (2011).
29. Oikonomaki T., Papatirou M., Ntrini T., Kalogeropoulou C., Zabakis P., Kalavrizioti D., Papadakis I., Goumenos D. S., Papachristou E.: *Int. Urol. Nephrol.* 51, 2037 (2019).
30. Levy-Schousboe K. a 17 spoluautorů: *Clin. Kid. J.* 14, 2114 (2021).

M. Barna^{a,b}, J. Čepová^a, K. Dunovská^a, J. Petrus^a, P. Melicherčík^a, R. Průša^a, R. Kizek^a, and E. Klapková^a (^a Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, ^b Department of Orthopaedics, First Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic): **Chemiluminescent and Photometric Analysis of Matrix Gla Protein from Patients with a Defect of Musculoskeletal System**

Matrix Gla protein (MGP) is a circulating protein with a low molecular weight that acts as a natural inhibitor of calcification. It belongs to the group of vitamin K-dependent proteins. For its proper function, MGP must undergo vitamin K-dependent carboxylation and phosphorylation. Its main function is the prevention of soft-tissue calcification. It requires vitamin K₂ as a cofactor for gamma glutamyl carboxylase. Vitamin K insufficiency is manifested by cardiovascular diseases, insufficient mineralization of bone tissue and the formation of calcifying deposits in soft tissues. The aim of this study was to design methods for monitoring the levels of MGP and dp-uc MGP by using immunochemical detection and to apply them to the analysis of real samples for use in clinical laboratories. These markers could serve as potential markers of the severity of joint diseases, cardiovascular diseases and also as markers indicating the status of vitamin K in organism.

Keywords: ELISA, levels of calcium and phosphates, bone metabolism, matrix Gla proteins, vitamin K



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.