

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Anna Kierońska-Rudek

Badania nad mechanizmami naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub>

Studies on the mechanisms of vasoprotective activity of vitamin K<sub>1</sub>

*Praca doktorska*

*Promotor I:* Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

*Promotor II:* Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny

Pracę wykonano w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET)

*Kierownik jednostki:* Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Kraków, 2023

Praca została wykonana w ramach środowiskowych studiów doktoranckich  
Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej InterDokMed  
POWR.03.02.00-00-I013/16

Badania finansowane były z projektów :

PRELUDIUM No.2018/31/N/NZ7/03900  
(Kierownik projektu: Mgr Anna Kierońska-Rudek)

OPUS No.2018/29/B/NZ7/01684  
(Kierownik Projektu Prof. Stefan Chłopicki)

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania promotorom mojej rozprawy doktorskiej  
**Panu Prof. Stefanowi Chłopickiemu** oraz **Panu Prof. Szczepanowi Zapotocznemu**  
Przed wszystkim za nieocenioną pomoc merytoryczną oraz czas i uwagę poświęcone mi w trakcie  
realizacji i pisania pracy doktorskiej,  
ale także za stawiane mi wymagania oraz wszystkie możliwości, które otrzymałam,  
a które pozwoliły mi się rozwijać.*

*Składam serdeczne podziękowania **Pani dr Agnieszce Kij**,  
za istotny wkład w powstanie tej pracy, wspólne badania i dyskusje naukowe  
oraz za ogrom przyjacielskiego wsparcia.*

*Dziękuję wszystkim **kolegom i koleżankom z JCET**  
za wszelką pomoc w pracy naukowej oraz niezwykle życzliwą atmosferę.*

*Szczególne podziękowania składam mojemu **Mężowi** oraz **Rodzicom**,  
bez ich poświęcenia, wiary, wsparcia oraz nieskończonych pokładów wyrozumiałości nie  
mogłabym dojść do miejsca, w którym dziś jestem.*

# SPIS TREŚCI

<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>I WSTĘP.....</b>	<b>11</b>
1. CHARAKTERYSTYKA WITAMINY K .....	11
2. WPLYW WITAMINY K NA STAN ZAPALNY .....	14
3. WPLYW WITAMINY K NA STARZENIE SIĘ KOMÓREK.....	15
4. WPLYW WITAMINY K NA ROZWÓJ CHOROÓB SERCOWO-NACZYNIOWYCH .....	15
5. DOSTARCZANIE WITAMINY K <sub>1</sub> DO TKANEK .....	17
6. PODSUMOWANIE.....	18
<b>II CEL PRACY.....</b>	<b>19</b>
<b>III MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>20</b>
1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE I LINIE KOMÓRKOWE.....	20
2. MODELE BADAWCZE WYKORZYSTANE DO BADANIA NACZYNIOPROTEKCYJNYCH EFEKTÓW WITAMINY K <sub>1</sub> I K <sub>2</sub> ; BADANIA <i>IN VIVO</i> .....	21
2.1 Model myszy ApoE LDL <sup>-/-</sup> ; żywienie dietą wzbogaconą witaminą K <sub>1</sub> lub K <sub>2</sub> .....	21
2.2 Model niedoboru witaminy K <sub>1</sub> u myszy normolipidemicznych C57BL/6J oraz dyslipidemicznych E3L.CETP; żywienie dietą ubogą w witaminę K <sub>1</sub> oraz próba odwrócenia skutków niedoboru za pomocą diety .....	21
2.3 Model niedoboru witaminy K <sub>1</sub> u myszy normolipidemicznych C57BL/6J; zastosowanie hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu do dostarczania witaminy K <sub>1</sub> w celu poprawy efektywności odwracania skutków niedoboru witaminy K <sub>1</sub> .....	25
3. MODELE BADAWCZE WYKORZYSTANE DO BADANIA NACZYNIOPROTEKCYJNYCH EFEKTÓW WITAMINY K <sub>1</sub> I K <sub>2</sub> ; BADANIA <i>EX VIVO</i> .....	26
3.1 Model izolowanej mysiej aorty <i>ex vivo</i> traktowanej witaminą K <sub>1</sub> i K <sub>2</sub> .....	26
4. MODELE BADAWCZE WYKORZYSTANE DO BADANIA NACZYNIOPROTEKCYJNYCH EFEKTÓW WITAMINY K <sub>1</sub> I K <sub>2</sub> ; BADANIA <i>IN VITRO</i> .....	27
4.1 Modele <i>in vitro</i> wykorzystane do badania senolitycznych efektów witaminy K <sub>1</sub> i K <sub>2</sub> .....	27
4.1.1 Model replikacyjnego starzenia się komórek PAEC i 04/35F/11A.....	27
4.1.2 Model starzenia się komórkach HAEC wywołanego promieniowaniem rentgenowskim.....	27
4.1.3 Model starzenia się komórek 04/35F/11A wywołane gromadzeniem prelaminy A.....	28
4.2 Modele <i>in vitro</i> wykorzystane do badania działania przeciwzapalnego witaminy K <sub>1</sub> i K <sub>2</sub> .....	29
4.2.1 Model zapalenia w komórkach śródbłónka (HAEC).....	29
4.2.2 Model zapalenia w makrofagach (RAW 264.7).....	29
5. OCENA EFEKTÓW NACZYNIOPROTEKCYJNYCH <i>IN VIVO</i> .....	29
5.1 Ocena czynności rozkurczowej naczynia <i>in vivo</i> za pomocą MRI.....	29
5.2 Oznaczenie stężenia witaminy K <sub>1</sub> i witamin z grupy K <sub>2</sub> w osoczu, wątrobie aorcie i kale myszy z zastosowaniem techniki UHPLC-APCI-MS/MS.....	30
6. OCENA EFEKTÓW NACZYNIOPROTEKCYJNYCH <i>EX VIVO</i> .....	32
6.1 Ocena odpowiedzi rozkurczowej naczynia <i>ex vivo</i> za pomocą miografu klasycznego .....	32

<b>7.</b>	<b>OCENA EFEKTÓW NACZYNIOPROTEKCYJNYCH <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>32</b>
7.1	<i>Analiza efektów naczynioprotekcyjnych związanych ze starzeniem się komórek .....</i>	32
7.1.1	Analizę aktywności $\beta$ -galaktozydazy.....	32
7.1.2	Analiza zmian ekspresji genów związanych ze starzeniem się komórek metodą PCR.....	32
7.1.3	Proteomiczna ocena zmian profilu białek związanych ze starzeniem się komórek.....	33
7.1.4	Ocena wpływu witaminy K <sub>1</sub> i K <sub>2</sub> na proliferację komórek .....	34
7.2	<i>Analiza efektów naczynioprotekcyjnych związanych z zapaleniem .....</i>	35
7.2.1	Pomiary produkcji tlenu azotu w pożywce pohodowlanej .....	35
7.2.2	Analiza produkcji PGE <sub>2</sub> , IL-6 i TNF metodą ELISA w pożywce pohodowlanej.....	35
7.2.3	Test adhezji komórek .....	35
7.2.4	Immunohistochemiczna analiza białek związanych z zapaleniem .....	36
7.2.5	Ocena produkcji eikozanoidów w pożywce pohodowlanej metodą UHPLC-APCI-MS/MS.....	36
<b>8.</b>	<b>BADANIE WYCHWYTU WITAMINY K<sub>1</sub> ORAZ PRODUKCJI ENDOGENNEJ WITAMINY K<sub>2</sub>(MK-4) W WARUNKACH <i>EX VIVO</i> ORAZ <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>9.</b>	<b>ANALIZA STATYSTYCZNA .....</b>	<b>38</b>
<b>IV</b>	<b>WYNIKI.....</b>	<b>38</b>
<b>1.</b>	<b>PROFIL NACZYNIOPROTEKCYJNEGO DZIAŁANIA WITAMINY K<sub>1</sub> I K<sub>2</sub> W MODELACH <i>EX VIVO</i> ORAZ <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>2.</b>	<b>MECHANIZMY NACZYNIOPROTEKCYJNE WITAMINY K<sub>1</sub> I K<sub>2</sub> <i>IN VITRO</i>; DZIAŁANIE SENOLITYCZNE I HAMUJĄCE USZKODZENIE DNA .....</b>	<b>41</b>
2.1	<i>Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu replikacyjnego starzenia się komórek śródbłonna (PAEC) i komórek mięśniówki gładkiej (04/35F/11A) .....</i>	41
2.2	<i>Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu starzenia się komórek śródbłonna (HAEC) wywołanego promieniowaniem rentgenowskim .....</i>	43
2.3	<i>Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu starzenia się komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia (04/35F/11A), u których starzenie się wywołano gromadzeniem prelaminy A ...</i>	50
<b>3.</b>	<b>MECHANIZMY NACZYNIOPROTEKCYJNE WITAMINY K<sub>1</sub> I K<sub>2</sub>; DZIAŁANIE PRZECIWPALNE .....</b>	<b>53</b>
3.1	<i>Przeciwpalne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w komórkach śródbłonna (HAEC).....</i>	53
3.2	<i>Przeciwpalne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w makrofagach (RAW 264.7) .....</i>	55
<b>4.</b>	<b>NACZYNIOWE SKUTKI NIEDOBORU WITAMINY K<sub>1</sub> I ODWRÓCENIA NIEDOBORU WITAMINY K<sub>1</sub> U MYSZY Z NORMOLIPIDEMIĄ C57BL/6J ORAZ U MYSZY E3L.CETP Z DYSLIPIDEMIĄ. ....</b>	<b>56</b>
4.1	<i>Naczyniowe skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> i odwrócenia niedoboru witaminy K<sub>1</sub>; analiza poziomów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) w narządach oraz wpływ na parametry układu krzepnięcia u myszy z normolipidemią C57BL/6J oraz u myszy z dyslipidemią E3L.CETP.....</i>	57
4.2	<i>Naczyniowe skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> i odwrócenia niedoboru witaminy K<sub>1</sub>; badanie czynności śródbłonna <i>in vivo</i> u myszy z normolipidemią C57BL/6J oraz u myszy z dyslipidemią E3L.CETP .....</i>	59
<b>5</b>	<b>ENDOGENNA PRODUKCJA WITAMINY K<sub>2</sub>(MK-4) W ŚCIANIE NACZYNIA.....</b>	<b>62</b>
5.1	<i>Endogenna produkcja witaminy K<sub>2</sub> przez bakterie jelitowe .....</i>	62
5.2	<i>Endogenna produkcja witaminy K<sub>2</sub>(MK-4); badanie wychwytu witaminy K<sub>1</sub> i produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) przez ścianę naczynia, komórki śródbłonna, komórki mięśniówki gładkiej ściany naczynia oraz przez makrofagi.....</i>	63
<b>6.</b>	<b>ANALIZA BIODOSTĘPNOŚCI I DZIAŁANIA NACZYNIOPROTEKCYJNEGO WITAMINY K<sub>1</sub>, DOSTARCZANEJ PRZY POMOCY HIALURONOWYCH NANOKAPSUŁ O OLEJOWYM RDZENIU (K<sub>1</sub>-OIL-HyC12) U MYSZY Z NIEDOBREM WITAMINY K<sub>1</sub> .....</b>	<b>66</b>
6.1	<i>Efekt dostarczania witaminy K<sub>1</sub> w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 na jej biodostępność w osoczu, wątrobie oraz aorcie u myszy C57BL/6J z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>.....</i>	66
6.2	<i>Efekt dostarczania witaminy K<sub>1</sub> w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 na czynność śródbłonna <i>in vivo</i> u myszy C57BL/6J z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>.....</i>	69

<b>V DYSKUSJA.....</b>	<b>70</b>
1. <b>DZIAŁANIE NACZYNIOPROTEKCYJNE WITAMINY K<sub>1</sub>.....</b>	<b>71</b>
2. <b>ANALIZA MECHANIZMÓW NACZYNIOPROTEKCYJNEGO DZIAŁANIA WITAMINY K<sub>1</sub> .....</b>	<b>73</b>
2.1 <i>Działanie senolityczne witaminy K<sub>1</sub> w komórkach ściany naczynia.....</i>	<i>73</i>
2.2 <i>Działanie przeciwzapalne witaminy K<sub>1</sub> w komórkach ściany naczynia.....</i>	<i>76</i>
3. <b>WYCHWYT I ENDOGENNA KONWERSJA WITAMINY K<sub>1</sub> W ŚCIANIE NACZYNIA.....</b>	<b>79</b>
4. <b>ZASTOSOWANIE HIALURONOWYCH NANOKAPSUŁ O OLEJOWYM RDZENIU K<sub>1</sub>-OIL-HYC12 W CELU POPRAWY EFEKTYWNOŚCI DOSTARCZANIA WITAMINY K<sub>1</sub> DO NACZYŃ .....</b>	<b>81</b>
<b>VI WNIOSKI.....</b>	<b>86</b>
<b>VII LITERATURA.....</b>	<b>87</b>
<b>IX OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI .....</b>	<b>98</b>
Spis publikacji doktorantki .....	102

## Streszczenie

Najlepiej poznaną funkcją witaminy K<sub>1</sub> jest rola kofaktora w potranslacyjnej karboksylacji białek, biorących udział w procesach krzepnięcia krwi, syntetyzowanych w wątrobie. Aktywności pozawątrobowe, w tym działanie naczynioprotekcyjne były dotąd przypisywane raczej witaminie K<sub>2</sub>. Niedawno pojawiło się jednak, kilka prac, które wykazały, że niskie stężenie witaminy K<sub>1</sub> we krwi korelowało ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym.

**Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie czy witamina K<sub>1</sub> może wykazywać działanie naczynioprotekcyjne podobnie jak witamina K<sub>2</sub> oraz wyjaśnienie mechanizmów tego działania.**

W pracy wykazano, że w modelu izolowanej aorty *ex vivo*, gdzie dysfunkcje śródbłonna wywołano poprzez stymulację zapalną przy użyciu TNF oraz w modelu dysfunkcji śródbłonna u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> *in vivo* witamina K<sub>1</sub> podobnie jak witamina K<sub>2</sub> poprawiała czynność śródbłonna naczyniowego. Badania nad mechanizmami naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>, wykazały, że ich korzystny wpływ na naczynia krwionośne może wynikać z ich działania senolitycznego, które powiązано z hamowaniem uszkodzeń DNA w ścianie naczynia oraz z działania przeciwzapalnego obejmującego szerokie spektrum ścieżek zapalnych w tym hamowanie aktywacji NFκB.

Ważnym dowodem na udział witaminy K<sub>1</sub> w regulacji czynności śródbłonna były badania przeprowadzone z wykorzystaniem diety ubogiej w witaminę K<sub>1</sub> w których wykazano, że niedobór witaminy K<sub>1</sub> w diecie wywołał dysfunkcję śródbłonna, która była odwracana poprzez uzupełnienie niedoboru witaminy K<sub>1</sub>. Te doświadczenia stanowią dowód na to, że witamina K<sub>1</sub> dostarczana w diecie jest niezbędna do utrzymania czynności śródbłonna *in vivo*.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy dają podstawę sądzić, że działanie witaminy K<sub>1</sub> na śródbłonek jest determinowane przez wykorzystanie witaminy K<sub>1</sub> jako substratu do produkcji endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w ścianie naczyń krwionośnych, ale nie można wykluczyć bezpośredniego działania witaminy K<sub>1</sub> na śródbłonek.

Terapeutyczne zastosowanie witaminy K<sub>1</sub> podawanej w hialuronowych nanokapsułach o olejowym rdzeniu, jako nośnika witaminy K<sub>1</sub>, u myszy z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>, szybciej odwracało skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> w porównaniu z podaniem witaminy K<sub>1</sub> w olejowej zawieszynie, poprzez zwiększenie ogólnoustrojowej i naczyniowej biodostępności witaminy K<sub>1</sub>.

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej dowiodły, że witamina K<sub>1</sub> jest równie skuteczna jak witamina K<sub>2</sub> w działaniu naczynioprotekcyjnym. Mechanizmy tego działania

mogą być związane z hamowaniem starzenia się komórek i hamowaniem odpowiedzi zapalnej. Niedobór witaminy K<sub>1</sub> w diecie upośledza czynność śródbłonna, która może być przywrócona przez skuteczną suplementację witaminy K<sub>1</sub>. Przykładem nośnika zapewniającego wysoką efektywność dostarczania witaminy K<sub>1</sub> do naczyń krwionośnych są hialuronowe kapsuły o olejowym rdzeniu. Uzyskane wyniki sugerują, że efektywne dostarczenie witaminy K<sub>1</sub> do ścian naczyń krwionośnych jest niezbędne do uzyskania efektu terapeutycznego, co może wyjaśniać wcześniejsze, niespójne doniesienia dotyczące działania naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub>.



## Abstract

The best known function of vitamin K<sub>1</sub> is the role of a cofactor in the post-translational carboxylation of proteins involved in blood coagulation synthesized in the liver. Extrahepatic functions, including vasoprotective activity, has been attributed rather to vitamin K<sub>2</sub>. However, recently, several papers have shown that low levels of vitamin K<sub>1</sub> in the blood, correlate with increased cardiovascular risk.

**The main aim of this PhD thesis was to investigate whether vitamin K<sub>1</sub> has comparable vasoprotective effects as vitamin K<sub>2</sub> and to explain the mechanisms involved.**

The study showed that in TNF-induced model of endothelial dysfunction in isolated aorta *ex vivo*, and in ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mouse, an *in vivo* model of endothelial dysfunction, vitamin K<sub>1</sub> improved vascular endothelial function, comparably as vitamin K<sub>2</sub>. Studies on the mechanisms of the vasoprotective activity of vitamin K<sub>1</sub> and K<sub>2</sub>, have shown that their beneficial influence on vessel wall may be attributed to their senolytic activity, linked to inhibition of DNA damage and anti-inflammatory activity including inhibition of a broad spectrum of inflammatory pathways, including inhibition of NFκB activation.

Important evidence for the involvement of vitamin K<sub>1</sub> in the regulation of endothelial function was provided by studies with a vitamin K<sub>1</sub>-deficient diet in which it was shown that vitamin K<sub>1</sub> deficiency caused endothelial dysfunction, which was reversed by vitamin K<sub>1</sub> supplementation. These experiments provide evidence that dietary vitamin K<sub>1</sub> is essential for maintaining endothelial function *in vivo*.

The results obtained in the present study, suggest that the effect of vitamin K<sub>1</sub> on the endothelium is determined by the use of vitamin K<sub>1</sub> as a substrate for the endogenous production of vitamin K<sub>2</sub>(MK-4) in the vessel wall. However, a direct effect of vitamin K<sub>1</sub> on the endothelium cannot be excluded.

Therapeutic application of vitamin K<sub>1</sub> administered in hyaluronan nanocapsules with oil-core as a vitamin K<sub>1</sub> carrier in vitamin K<sub>1</sub>-deficient mice more rapidly reversed the effects of vitamin K<sub>1</sub> deficiency in comparison to vitamin K<sub>1</sub> administration in an oil suspension, due to increased systemic and vascular bioavailability of vitamin K<sub>1</sub>.

To sum up, results of this PhD thesis proved that vitamin K<sub>1</sub> is as effective as vitamin K<sub>2</sub> in vasoprotection. The mechanisms of this action may be related to inhibition of cellular senescence and anti-inflammatory activity. Vitamin K<sub>1</sub> deficiency diet impairs endothelial function, which can be restored by effective supplementation of vitamin K<sub>1</sub>. An example of a carrier that provides high efficiency of vitamin K<sub>1</sub> delivery to vessels wall is

represented by the hyaluronan nanocapsules with an oil core. Obtained results suggest, that effective delivery of vitamin K<sub>1</sub> to the blood vessel wall is essential for a therapeutic effect, which may explain previous inconsistent reports concerning vasoprotective effect of vitamin K<sub>1</sub>.

# I Wstęp

## 1. Charakterystyka witaminy K

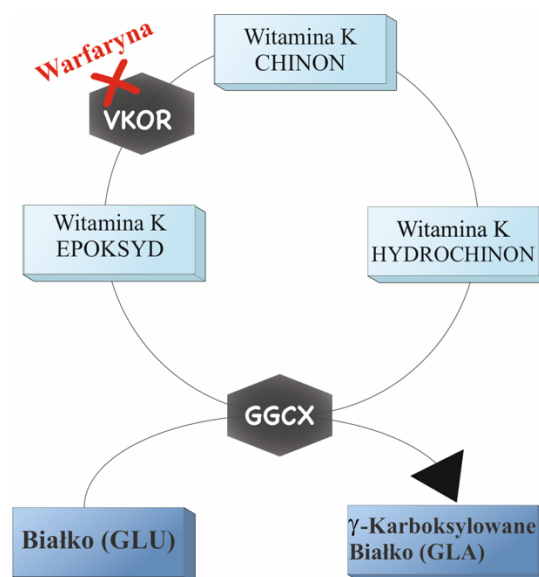
Termin „witamina” został po raz pierwszy wprowadzony w 1912 roku przez wybitnego, polskiego uczonego Kazimierza Funka, jako określenie opisujące niezbędną do życia substancję – „vita” zawierającą w swojej strukturze grupę aminową „amina” [1]. Chociaż, obecnie wiadomo, że nie wszystkie witaminy posiadają grupy aminowe, niezmiennym pozostaje fakt, iż odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu zdrowia człowieka a ich niedobór może prowadzić do rozwoju licznych chorób. Przykładem awitaminoz są: choroba Beri-Beri wywołana niedoborem witaminy B<sub>1</sub> prowadząca do uszkodzeń układu nerwowego oraz sercowo-naczyniowego, pelagra rozwijająca się w wyniku niedoboru witaminy B<sub>3</sub> (nazywanej też witaminą PP), objawiająca się zapaleniem skóry, biegunką oraz zaburzeniami świadomości, szkorbut spowodowany niedoborem witaminy C prowadzący do zaburzeń syntezy kolagenu, albo krzywica, choroba często kiedyś obserwowana u dzieci, która objawia się wadami rozwojowymi układu kostno-szkieletowego [2–5].

Witamina K stanowiąca przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej została odkryta w 1929 roku przez Henrika Dama i opisana jako substancja regulująca krzepnięcie krwi [6]. Obecnie wiadomo, że termin „witamina K” w rzeczywistości opisuje grupę rozpuszczalnych w tłuszczach pochodnych 2-metylo-1,4-naftochinonu, które różnią się między sobą długością i stopniem nasycenia łańcuchów bocznych [7]. Pierścień naftochinonu, nazwano menadionem (witamina K<sub>3</sub>), podczas gdy analogi posiadające dodatkowo boczne łańcuchy izoprenoidowe, dzielą się na dwie grupy: nasyconą witaminę K<sub>1</sub> -filochinon (PK, *Phylloquinone*) oraz nienasycone formy witaminy K<sub>2</sub> zwane menachinonami (MK, *Menaquinone*). Menachinony mogą zawierać od 3 do 15 reszt izoprenoidowych tworząc odpowiednio witaminy od K<sub>2</sub>(MK-3) do K<sub>2</sub>(MK-15) [7]. Filochinon i menachinony mają różne źródła dietetyczne. Witamina K<sub>1</sub> występuje przede wszystkim w zielonych warzywach takich jak brokuły, szpinak, kapusta i jarmuż. Witamina K<sub>2</sub> występuje głównie w fermentowanej żywności takiej jak kiszonki, dojrzewające sery oraz natto, a także, w mniejszych ilościach w produktach pochodzenia zwierzęcego m.in. mięsie i podrobach [8,9]. Witamina K<sub>2</sub> a szczególnie jej długołańcuchowe formy od K<sub>2</sub>(MK-6) do K<sub>2</sub>(MK-15) są również produkowane endogennie, przez bakterie jelitowe [10] i wydaje się, że mikrobiom może stanowić istotne źródło witaminy K<sub>2</sub>. Ostatnie doniesienia wskazują, na to, że również niektóre typy tkanek i komórek takie jak: nabłonek jelit, nerki, śródbłonek naczyniowy oraz makrofagi mogą samodzielnie

syntetyzować endogenną witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) korzystając głównie z menadionu, pochodzącego w dużej mierze z rozpadu witaminy K<sub>1</sub> dostarczanej w diecie [11–14].

Endogenna produkcja witaminy K<sub>2</sub> jest skomplikowanym, wieloetapowym procesem obejmującym odłączenie łańcucha bocznego egzogennych witamin a następnie, uwolniony w ten sposób menadion stanowi substrat podlegający procesowi prenylacji. Reszta geranylgeranylowa syntetyzowana z acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) zostaje dołączona do pierścienia naftochinonu z udziałem białka zawierającego domenę transferazy prenylowej UbiA (UBIAD-1). Powstawanie reszt geranylgeranylowych z acetylo-CoA stanowiących również ścieżkę syntezy cholesterolu, może zostać zahamowane przez leki z grupy statyn [13–15].

Najwcześniej opisaną funkcją witaminy K jest udział w regulacji krzepnięcia krwi, gdzie zredukowana forma witaminy K - hydrochinon (KH<sub>2</sub>) pełni rolę kofaktora dla  $\gamma$ -glutamyl karboksylazy (GGCX), uczestnicząc w karboksylacji białek zależnych od witaminy K (VKDP; *vitamin K dependent proteins*) takich jak czynniki krzepnięcia: II, VII, IX, X. Redukcja witaminy K jest zależna od reduktazy epoksydu witaminy K (VKOR), enzymu hamowanego przez pochodne kumaryny np. warfrynę (**Rycina 1**) [16]. Dalsze badania rozszerzyły spektrum białek zależnych od witaminy K, o białka takie jak: osteokalcyna oraz MGP (*Matrix Gla Protein*), przypisując tym samym witaminie K nową funkcję, jaką jest regulacja gospodarki wapniowej. Obecnie, w zależności od źródła mówi się o nawet 30 białkach zależnych od witaminy K, które są zaangażowane w szereg procesów biologicznych takich jak regulacja adhezji i migracji komórek (periostyna), regulacja odpowiedzi zapalnej (białko C) czy wzrost komórek (GAS6; *Growth arrest – specific 6*), tym samym wskazując na to, że witamina K może odgrywać istotną rolę w regulacji innych procesów, daleko wykraczających poza opisywane pierwotnie krzepnięcie krwi [1].



**Rycina 1. Cykl witaminy K.** Reszty glutaminianowe (GLU) białek zależnych od witaminy K są przekształcane w reszty karboksylglutaminowe (GLA) w procesie  $\gamma$ -karboksylacji przy udziale GG CX. Kofaktorem GG CX jest zredukowana forma witaminy  $KH_2$ , która powstaje w procesie redukcji epoksydu witaminy K przy udziale VKOR, hamowanego przez pochodne kumaryny takie jak warfaryna. Na podstawie Azuma i wsp., [16].

Badania nad niekanonicznymi mechanizmami działania witaminy K doprowadziły w konsekwencji do znacznego poszerzenia wiedzy dotyczącej samej roli witaminy K. Dostępne dane dowodzą, że funkcje witaminy K wykraczają poza regulację krzepnięcia i wapnienia obejmując również działanie przeciwzapalne [17,18], senolityczne [19] oraz naczyńioprotekcyjne [20]. Rola witaminy  $K_1$ , była jednak dotychczas ograniczana właściwie wyłącznie do zlokalizowanej w wątrobie regulacji krzepnięcia krwi [21], natomiast funkcje pozawątrobowe były przypisywane przede wszystkim witaminie  $K_2$  [17,20,22] i tylko nieliczne badania dotyczą pozawątrobowych aktywności witaminy  $K_1$ , a ich wyniki są niespójne [23,24]. Podział funkcji witaminy  $K_1$  i  $K_2$  wydawał się być dodatkowo wspierany przez różnice w budowie chemicznej tych witamin takie jak stopień nasycenia łańcuchów bocznych. Ta klarowna klasyfikacja została jednak poddana w wątpliwość poprzez fakt, że u wielu bakterii zidentyfikowano częściowo nasycone menachinony [25,26]. Biorąc pod uwagę, dowody ewolucyjne, wskazujące na to, że synteza witaminy  $K_1$  przez chloroplasty roślin, wyewoluowała na skutek endosymbiozy z sinicami [27], można wysnuć hipotezę, iż witamina  $K_1$  występująca u roślin, ewolucyjnie jest zredukowaną witaminą  $K_2$ (MK-4). Innym faktem przemawiającym za możliwością porównywalnego działania witaminy  $K_1$  jak  $K_2$  jest wyżej wspomniana możliwość konwersji witaminy  $K_1$  w endogenna witaminę  $K_2$ (MK-4) [11,12,28,29].

Ostatnia dekada poszerzyła wiedzę dotyczącą mechanizmów działania witaminy K, wskazując na to, że poza kanonicznym mechanizmem jej działania, związanym z karboksylacją

białek, może także pełnić inne istotne funkcje niezależne od karboksylacji. Najnowsze dane wskazują, między innymi, że witamina K nie musi podlegać cyklicznym przemianom zależnym od VKOR w cyklu witaminy K, jak sądzono dotychczas, ale może być redukowana na alternatywnej ścieżce przy udziale białka FSP-1 (*fibroblast-specific protein 1*), hamując proces ferroptozy [30]. Innym przykładem niekanonicznego działania witaminy K jest opisana u muszek owocówek funkcja mitochondrialnego nośnika elektronów i zaangażowanie w produkcję ATP [31]. Wykazano również, że witamina K może wpływać na ekspresję i/lub aktywność czynników transkrypcyjnych pośrednicząc w akumulacji kolagenu w komórkach osteoblastycznych (SXR; *steroid and xenobiotic receptor*) oraz regulując odpowiedź zapalną (NFκB) [18,32].

## **2. Wpływ witaminy K na stan zapalny**

Stan zapalny to złożony proces, obejmujący wzrost przepuszczalności naczyń, migrację komórek zapalnych, sekrecję prozapalnych cytokin oraz przebudowę macierzy pozakomórkowej [20, 21]. Stan zapalny towarzyszy przebiegowi większości chorób takich jak choroby wirusowe, cukrzyca, nowotwory oraz choroby sercowo-naczyniowe [35–38]. Wiele substancji biologicznych może regulować równowagę mechanizmów pro- i przeciwzapalnych. Do substancji o działaniu przeciwzapalnym zaliczane są między innymi witaminy: witamina C, witamina D oraz jak pokazują najnowsze dane również witamina K [17,39,40].

Znaczna większość dostępnych badań, przypisuje działanie przeciwzapalne witaminie K<sub>2</sub>, wskazując, że różne formy K<sub>2</sub>(MK-3), K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7) są zdolne do hamowania produkcji cytokin takich jak: interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) i czynnik martwicy nowotworu (TNF) w komórkach zapalnych [17,18]. Chociaż ilość badań dotycząca przeciwzapalnych efektów witaminy K<sub>1</sub> jest znacznie mniejsza niż w przypadku witaminy K<sub>2</sub>, warto zaznaczyć, że istnieją przesłanki, wskazujące na to, że również witamina K<sub>1</sub> może być zaangażowana w regulację procesów zapalnych. U ludzi odnotowano, że poziom witaminy K<sub>1</sub> we krwi odwrotnie korelował z poziomem markerów zapalnych [41]. Podobnie u szczurów, podawanie witaminy K<sub>1</sub> hamowało migrację makrofagów *in vitro* oraz zmniejszało śmiertelność z powodu endotoksemii wywołanej przez lipopolisacharyd (LPS) [18].

Przeciwzapalne działanie witaminy K, w szczególności witaminy K<sub>2</sub>, zostało stosunkowo dobrze udokumentowane, jednakże doniesienia dotyczące mechanizmu tego działania pozostają niespójne. Co prawda wykazano, że białko GRP (*Gla-rich protein*) hamowało produkcję prozapalnej prostaglandyny E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) i ekspresję metaloproteinazy 13 (MMP13) w hodowlach komórkowych synowocytów i chondrocytów stymulowanych

prozapalnie IL-1 [42], sugerując tym samym udział mechanizmów karboksylacji w przeciwzapalnym działaniu witaminy K. Inne prace pokazują jednak, że witamina K hamuje fosforylację IKK $\alpha/\beta$ , co wskazuje, iż jej działanie przeciwzapalne nie jest związane z mechanizmami karboksylacji, ale jest związane z bezpośrednim hamowaniem aktywności czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B, odpowiedzialnego za regulację aktywacji większości szlaków zapalnych [17].

### **3. Wpływ witaminy K na starzenie się komórek**

Starzenie się komórek (*Senescence*) jest procesem związanym z zaburzeniem cyklu komórkowego, zatrzymaniem podziałów komórkowych, skracaniem telomerów oraz wydzielaniem przez komórki białek związanych ze starzeniem się takich jak cytokiny prozapalne [43]. Proces patologicznego starzenia się komórek ściany naczynia obok, zapalenia stanowi kolejny, istotny czynnik ryzyka związanym z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych [44,45]. Biorąc pod uwagę, że liczba incydentów sercowo-naczyniowych istotnie wzrasta wraz z wiekiem, poszukiwanie substancji pozwalających na zahamowanie procesu starzenia się komórek ściany naczynia, może potencjalnie przyczynić się do opracowania nowych strategii prewencji chorób sercowo-naczyniowych. Choć niedawno pojawiły się dane sugerujące wpływ niedoboru witaminy K na rozwój schorzeń związanych z wiekiem takich jak choroba Alzheimera [7,46,47], to dostępne dane dotyczą przede wszystkim do badań dotyczących wpływu witaminy K<sub>2</sub> na rozwój chorób neurodegeneracyjnych i tylko jedna praca opisuje wpływ witaminy K<sub>2</sub>(MK-7) na aktywność związanej ze starzeniem  $\beta$ -galaktozydazy w komórkach śródbłonka [19].

### **4. Wpływ witaminy K na rozwój chorób sercowo-naczyniowych**

Choroby sercowo-naczyniowe są obecnie jedną z wiodących przyczyn śmierci na świecie, dlatego też, aktualnie nauka koncentruje się na lepszym zrozumieniu przyczyn i poszukiwaniu nowych strategii zapobiegania i leczenia tych chorób. Do chorób sercowo-naczyniowych zaliczamy: miażdżycę, chorobę wieńcową, niewydolność serca, kardiomiopatie, udar, niewydolność żylną czy zakrzepicę. W przebiegu większości z tych chorób obserwuje się ostry lub przewlekły stan zapalny, wapnienie naczyń, zaburzenia krzepnięcia oraz dysfunkcję śródbłonka naczyniowego. Warto nadmienić, że sama dysfunkcja śródbłonka naczyniowego może być spowodowana oraz nasilana przez liczne czynniki związane z zaburzeniem fizjologii komórek śródbłonka, takie jak starzenie się komórek, zaburzenia proliferacji, tranzycja

endotelialno-mezenchymalna, zaburzenia syntezy tlenku azotu (NO), czy stres oksydacyjny [48,49].

Nie można zaprzeczyć, że wapnienie naczyń i zastawek stanowi jeden z istotnych czynników, który zwiększa ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych. Jednocześnie liczne prace opisują rolę witaminy K<sub>2</sub> jako kofaktora karboksylacji białek, takich jak MGP czy osteokalcyna [50–53], zaangażowanych w regulację poziomu wapnia we krwi i w kościach, a także regulator procesów wapnienia w ścianie naczyń krwionośnych. Pomimo tego, że w literaturze można znaleźć wzmianki dotyczące naczynioprotekcyjnego działania zarówno witaminy K<sub>1</sub> jak i witaminy K<sub>2</sub> [23,54–56], działanie naczynioprotekcyjne było dotychczas kojarzone głównie z hamowaniem wapnienia naczyń krwionośnych i przytłaczająca większość dostępnych badań skupiała się na witaminie K<sub>2</sub> [57–64].

Najnowsze badania dostarczyły jednak dowodów wskazujących na to, że naczynioprotekcyjny potencjał witaminy K<sub>2</sub> nie kończy się na regulacji wapnienia. Badania A. Bar i wsp., (2019) dowiodły, że witamina K<sub>2</sub>(MK-7) poprawiała zależną od śródbłonna czynność rozkurczową naczyń u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, bez wpływu na wielkość blaszki miażdżycowej, a mechanizm działania naczynioprotekcyjnego witaminy K<sub>2</sub>(MK-7) był związany z regulacją produkcji NO [20]. Podobnie, Cirilli i wsp., (2020) w swoich badaniach *in vitro* wykazali, że witamina K<sub>2</sub> hamowała stres oksydacyjny, przyczyniając się do hamowania rozwoju dysfunkcji komórek śródbłonna [19].

W świetle przytoczonych dowodów, naczynioprotekcyjne działanie witaminy K<sub>2</sub> wydaje się niepodważalne, podczas gdy dane dotyczące korzystnego działania witaminy K<sub>1</sub> na ścianę naczynia pozostają niespójne. Jedną z istotnych przyczyn, która spowodowała, że badania nad pozawątrobowymi działaniami witaminy K<sub>1</sub> były jak dotąd pomijane, były wyniki prospektywnych, populacyjnych badań kohortowych „Rotterdam study”. W tych populacyjnych badaniach wykazano, że wysokie spożycie witaminy K<sub>1</sub> nie miało wpływu na obniżenie ryzyka sercowo-naczyniowego w przeciwieństwie do witaminy K<sub>2</sub> [58]. W innych badaniach, przeprowadzonych na gryzoniach, również nie zaobserwowano zależności między wysokim spożyciem witaminy K<sub>1</sub> a zmniejszonym wapnieniem naczyń [58,65]. W ostatnim czasie pojawiły się jednak istotne badania, które wykazały, że wysokie spożycie witaminy K<sub>1</sub> hamowało wapnienie tętnic wieńcowych podczas gdy niskie stężenie witaminy K<sub>1</sub> odwrotnie korelowało z ryzykiem sercowo-naczyniowym [23,66,67].

Ta niespójność literatury ponownie otworzyła dyskusję na temat roli witaminy K<sub>1</sub> w czynności naczyń krwionośnych. Dodatkowo, biorąc pod uwagę, że dostępne dane spójnie wiążą niskie stężenie witaminy K<sub>1</sub> ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym,



a niespójności dotyczą korelacji pomiędzy spożyciem witaminy K<sub>1</sub> a jej korzystnym działaniem na naczynia krwionośne, poza analizą podaży witaminy K<sub>1</sub> niezbędne wydaje się zbadanie wpływu biodostępności witaminy K<sub>1</sub> w naczyniach krwionośnych na jej efekt naczynioprotekcyjny.

## **5. Dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do tkanek**

Witamina K<sub>1</sub> dostarczana w diecie jest wchłaniana w jelicie cienkim, wiązana w olejowym rdzeniu chylomikronów bogatych w trójglicerydy, a następnie transportowana w chylomikronach resztkowych do wątroby gdzie jest w magazynowana [68]. Transport chylomikronów jest zależny od apolipoproteiny E (ApoE), determinując jednocześnie klirens wątrobowy witaminy K<sub>1</sub> [46,69–71]. W osoczu, witamina K<sub>1</sub> jest transportowana przez lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (VLDL) stanowiące główny zależny od lipoprotein szlak transportu witaminy K<sub>1</sub> z wątroby do tkanek docelowych [69], oraz przez lipoproteiny o średniej gęstości (IDL), a także lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [72]. Lipoproteiny są więc głównym czynnikiem determinującym poziom witaminy K<sub>1</sub> w osoczu i wydajność jej dostarczania do tkanek [15,21,24]. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych u pacjentów z hipercholesterolemią, które wykazały, że podwyższony poziom LDL u tych pacjentów był skorelowany z wysokim poziomem krążącej witaminy K<sub>1</sub> [21]. Natomiast u noworodków, zaobserwowano, że niskie stężenie LDL wiązało się z niskim stężeniem witaminy K<sub>1</sub> w surowicy [21]. Obok poziomu samych lipoprotein, także dostępności receptorów dla lipoprotein w tkankach docelowych determinuje efektywność wychwytu witaminy K<sub>1</sub> [25,26]. Warto nadmienić, że u osób starszych i pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi, obok zaburzeń profilu lipidowego, obserwuje się także występowanie polimorfizmów ApoE odpowiedzialnej za transport chylomikronów, co może wpływać na dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do tkanek pozawątrobowych, a w konsekwencji ograniczać biodostępność witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń krwionośnych u tych pacjentów.

Wychwyt witaminy K<sub>1</sub> przez tkanki może być również utrudniony ze względu na jej hydrofobowy charakter. Tak jak w przypadku innych lipofilnych substancji, słaba rozpuszczalność witaminy K<sub>1</sub> w wodzie, szczególnie w przypadku podania doustnego może znacząco obniżać jej przyswajalność [73]. Innym czynnikiem ograniczającym biodostępność witaminy K<sub>1</sub> jest jej endogenna konwersja w jelicie [13], gdzie komórki nabłonka jelit przekształcają egzogenną witaminę K<sub>1</sub> w endogenną witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) [28]. Witamina K<sub>1</sub> stanowi również substrat dla bakterii jelitowych, które przekształcają ją w długołańcuchowe formy witaminy K<sub>2</sub> [74]. Ze względu na konwersję zachodzącą zarówno w komórkach

nabłonka jelit jak i bakteriach jelitowych dostarczenie witaminy K<sub>1</sub>, pochodzącej głównie z diety do ściany naczynia w niezmienionej formie może być znacznie ograniczone.

Reasumując, wiele czynników, takich jak transport zależny od lipoprotein, hydrofobowy charakter, a także konwersja w jelicie utrudniają dostarczenie witaminy K<sub>1</sub> do tkanek pozawąrobowych w tym do ściany naczyń krwionośnych.

## **6. Podsumowanie**

Przyczyny rozwoju chorób sercowo-naczyniowych są niezwykle złożone. Do głównych czynników zaangażowanych w progresję tych chorób zalicza się między innymi stan zapalny, oraz upośledzenie fizjologicznej funkcji komórek ściany naczyń krwionośnych. Jedną z obiecujących substancji, która potencjalnie mogłaby wesprzeć terapię chorób sercowo-naczyniowych jest witamina K, która, jak wskazują dostępne dane, może hamować procesy zapalne oraz poprawiać czynność śródbłonka [17,20,58]. Co istotne, znacząca większość przeprowadzanych dotychczas badań nad pozawątrobowymi aspektami działania witaminy K dotyczyła witaminy K<sub>2</sub> podczas gdy, rola witaminy K<sub>1</sub> była często pomijana, a jej funkcję ograniczano przede wszystkim do regulacji procesów krzepnięcia krwi. Niedawno, pojawiały się jednak przesłanki wskazujące, na to, że niski poziom witaminy K<sub>1</sub> koreluje ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym [23]. Mechanizm tej zależności nie został jednak dotąd wyjaśniony, a może być związany z naczynioprotekcyjnym działaniem witaminy K<sub>1</sub>. Witamina K<sub>1</sub> jest najpowszechniej występującą formą witaminy K w żywności [75–77], dlatego też wyjaśnienie mechanizmów jej naczynioprotekcyjnego działania mogą w przyszłości stanowić podstawę do zaproponowania nowych rekomendacji dotyczących suplementacji witaminy K<sub>1</sub>, a także nowych rekomendacji żywieniowych nie tylko dla ludzi zdrowych, ale również dla pacjentów ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi.

## II Cel Pracy

Pozawątrobowe, w szczególności naczynioprotekcyjne działanie witaminy K było dotychczas przypisywane głównie witaminie K<sub>2</sub>, podczas gdy dane dotyczące naczynioprotekcyjnego witaminy K<sub>1</sub> są wciąż niespójne i nie zostały w pełni wyjaśnione.

**W związku z tym, głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie czy witamina K<sub>1</sub> może wykazywać działanie naczynioprotekcyjne podobnie jak witamina K<sub>2</sub>.**

W szczególności celem niniejszej pracy doktorskiej było:

1. Zbadanie mechanizmu naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>, ze szczególnym uwzględnieniem działania przeciwzapalnego i senolitycznego .
2. Zbadanie wpływu niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonna naczyniowego *in vivo* u myszy z normo- i dyslipidemią.
3. Zbadanie mechanizmów endogennej konwersji witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń krwionośnych.
4. Zbadanie terapeutycznej skuteczności witaminy K<sub>1</sub> podawanej w postaci hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu w celu zwiększenia biodostępności witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczynia i poprawy czynności śródbłonna.

Rozprawę doktorską stanowią w większości oryginalne, niepublikowane wyniki i tylko część wyników została wcześniej opublikowana w publikacji:

Anna Kieronska-Rudek, Agnieszka Kij, Patrycja Kaczara, Anna Tworzydło, Marek Napiorkowski, Katarzyna Sidoryk, Stefan Chłopicki, *Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line*. Cells. 2021, 10(7):1571 (IF pięcioletni = 7.677, Punktacja MNiSW = 140).

### III Materiały i metody

#### 1. Zwierzęta doświadczalne i linie komórkowe

Myszy C57BL/6J zakupiono w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (Warszawa, Polska) oraz w Centralnym Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie (Warszawa, Polska). Myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> otrzymano z Katedry Żywienia Człowieka Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (Polska). Myszy APOE\*3-Leiden.huCETP (E3L.CETP) [78–81] zostały dostarczone w ramach współpracy przez Dr J.M.G Princen'a z Organization of Applied Scientific Research, Metabolic Health Research (Leiden, Holandia). Zwierzęta doświadczalne utrzymywano w indywidualnie wentylowanych klatkach hodowlanych, bez ograniczania koprofagii, po 5–6 osobników, z nieograniczonym dostępem do pożywienia i wody, w pomieszczeniu o kontrolowanych warunkach temperatury i wilgotności z 12-godzinnym cyklem dzień/noc. Badania na zwierzętach przeprowadzono po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie przy Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (Kraków, Polska), postępując zgodnie z wytycznymi Dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Ludzkie komórki śródbłonna aorty HAEC (*Human Aortic Endothelial Cells*), mysie komórki mięśnie gładkie aorty MOVAS (*Mouse Aortic Smooth Muscle Cells*) i komórki monocytów U937 zakupiono w ATTC (Rockville, Maryland, MD, Stany Zjednoczone). Mysie komórki makrofagów RAW 264.7 zakupiono w ECCAC (Salisbury, Anglia, Wielka Brytania). Komórki śródbłonna PAEC (*Porcine Aorta Endothelial Cells*) otrzymano w ramach współpracy z Prof. Y. Wang z University of Hongkong, Chiny. Wykorzystanie ludzkich pierwotnych komórek mięśniówki gładkiej aorty 04/35F/11A (komórki pobrane od dawcy), było możliwe w ramach stażu naukowego w laboratorium Prof. C.M. Shanahan (Kings Collage Londyn, Wielka Brytania). Do hodowli komórkowej użyto następujących pożywek hodowlanych: dla HAEC – pożywka Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2), (Lonza, Bazylea, Szwajcaria) uzupełniona 10% FBS oraz zestawem suplementów zalecanym przez producenta (Lonza, Bazylea, Szwajcaria). Dla komórek PAEC, MOVAS oraz RAW 264.7 pożywka Dulbecco's Eagle Medium (DMEM), (Gibco, Paisley, Szkocja, Wielka Brytania) uzupełniona 10 % FBS, dla U937 pożywka Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) (Lonza, Bazylea, Szwajcaria) uzupełniona 20% FBS. Komórki 04/35F/11A

hodowano w pożywce Medium 199 (Gibco, Paisley, Szkocja, Wielka Brytania) uzupełnionej 20% FBS. Wszystkie linie komórkowe hodowano w inkubatorze do hodowli komórek w 37°C; 5% CO<sub>2</sub> i regularnie badano pod kątem zanieczyszczenia Mycoplasma przy użyciu zestawu MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Bazylea, Szwajcaria).

## **2. Modele badawcze wykorzystane do badania naczyńoprotekcyjnych efektów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>; badania *in vivo***

### **2.1 Model myszy ApoE LDL<sup>-/-</sup>; żywienie dietą wzbogaconą witaminą K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub>**

Myszy ApoE LDL<sup>-/-</sup> w wieku 16 tygodni, o których wiadomo, że z wiekiem rozwijają dysfunkcję śródbłonna a potem blaszki miażdżycowe [20] żywiono przez 8 tygodni dietą AIN 93G wzbogaconą w witaminę K<sub>1</sub> K<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich MO, Stany Zjednoczone) lub witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) (Sigma-Aldrich MO, Stany Zjednoczone) w dawce 10 mg/kg m. c. Następnie oceniano zależną i niezależną od śródbłonna odpowiedź rozkurczową aorty techniką obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI; *Magnetic resonance imaging*) w pniu ramienno-głowym tętnicy szyjnej oraz lewej tętnicy szyjnej (n=6-10 myszy/grupę).

### **2.2 Model niedoboru witaminy K<sub>1</sub> u myszy normolipidemicznych C57BL/6J oraz dyslipidemicznych E3L.CETP; żywienie dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> oraz próba odwrócenia skutków niedoboru za pomocą diety**

W celu zdefiniowania składników diety o najwyższej zawartości witaminy K<sub>1</sub> oceniono jej stężenie w różnych składnikach paszy (**Tabela 1**). Najwyższe stężenie witaminy K<sub>1</sub> stwierdzono w produktach sojowych, oleju słonecznikowym i kazeinie. W związku z tym, w celu opracowania diety ubogiej w witaminę K<sub>1</sub> przy jednoczesnym zachowaniu bilansu wszystkich niezbędnych składowych diety takich jak białka, węglowodany i tłuszcze, składniki o wysokiej zawartości witaminy K<sub>1</sub>, zastąpiono innymi o niższej zawartości witaminy K<sub>1</sub>. W związku z tym, zmniejszono zawartość kazeiny, olej sojowy zastąpiono olejem kukurydzianym a skrobię kukurydzianą częściowo zastąpiono płatkami ryżowymi (50%), dlatego dietę opisano jako AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>). Składniki diety wymieniono szczegółowo w **Tabeli 2**. Skład diety, wywołującej niedobór witaminy K<sub>1</sub> opracowano we współpracy z zespołem Prof. R. Kostogrysa z Katedry Żywienia Człowieka i Dietetyki na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie.

**Tabela 1. Zawartość poszczególnych form witaminy K w składnikach diety.** (Pomiary poziomu witaminy K metodą UHPLC-APCI-MS/MS wykonano we współpracy z Dr A. Kij z JCET, Kraków)

Składnik*	K <sub>1</sub> [mg/kg]	K <sub>2</sub> (MK-4) [mg/kg]	K <sub>2</sub> (MK-7) [mg/kg]
<b>Blonnik</b>	NW	NW	NW
<b>Białka soi</b>	0.035	NW	0.248
<b>Kazeina</b>	0.002	0.003	NW
<b>Płatki ryżowe</b>	NW	NW	NW
<b>Płatki sojowe</b>	0.683	NW	0.022
<b>Skrobia kukurydziana</b>	NW	NW	NW
<b>Olej kukurydziany</b>	0.443	NW	NW
<b>Olej słonecznikowy</b>	18.811	NW	NW
<b>Olej sojowy</b>	10.340	NW	NW

\* Stężenie poszczególnych form witaminy K wyrażono w mg/kg danego składnika; symbolem NW (niewykrywalny) oznaczono poziom poniżej progu detekcji metody UHPLC-APCI-MS/MS.

Uważa się, że dieta gryzoni zawierająca witaminę K<sub>1</sub> w ilości 0,75-2,00 mg/kg paszy zaspokaja dzienne zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> [74,82–84]. W związku z tym, dieta kontrolna zastosowana w niniejszym badaniu AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) była oparta na składzie diety z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>(AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)), do której dodano witaminę K<sub>1</sub> w dawce 0,75 mg/kg paszy (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) (**Tabela 2**). Dodatkową grupę kontrolną AIN-93M (+K<sub>1</sub>) zawierającą również witaminę K<sub>1</sub> w dawce 0,75 mg/kg, paszy, ale opartą na klasycznym składzie paszy AIN-93M (**Tabela 2**) zaprojektowano, aby potwierdzić, że obserwowane efekty naczyniowe są związane wyłącznie z poziomem witaminy K<sub>1</sub> i nie mają związku ze zmianą innych składników diety takich jak źródło białka czy tłuszczu.

**Tabela 2. Skład diet zaspokajających zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> oraz diety ubogiej w witaminę K<sub>1</sub>.**  
(Opracowanie składu paszy we współpracy z Prof. R. Kostogrys z UR, Kraków; Pomiar poziomu witaminy K metodą UHPLC-APCI-MS/MS wykonano we współpracy z Dr A. Kij z JCET, Kraków)

Składnik*	Diety zaspokajające zapotrzebowanie na witaminę K <sub>1</sub>		Dieta uboga w witaminę K <sub>1</sub>
	AIN-93M(+K <sub>1</sub> )	AIN-93M RYŻ(+K <sub>1</sub> )	AIN-93M RYŻ(-K <sub>1</sub> )
Skrobia kukurydziana [g/kg]	465.692	20.692	20.692
Płatki ryżowe [g/kg]	-	500.000	500.000
Kazeinna (>85% białka) [g/kg]	140.000	96.000	96.000
Maltodekstryna [g/kg]	155.000	155.000	155.000
Sacharoza [g/kg]	100.000	100.000	100.000
Olej kukurydziany [g/kg]	40.000	40.000	40.000
Błonnik [g/kg]	50.000	39.000	39.000
Mieszanka mineralna (AIN-93M-MX) [g/kg]	35.000	35.000	35.000
Mieszanka witaminowa (AIN-93-VX) bez witaminy K <sub>1</sub> [g/kg]	-	-	10.000
Mieszanka witaminowa (AIN-93-VX) z witaminą K <sub>1</sub> (75 mg/kg mix) [g/kg]	10.000	10.000	-
L-Cystyna [g/kg]	1.800	1.800	1.800
Wodorowinian cholinyl [g/kg]	2.500	2.500	2.500
Tert-butylohydrochinon (TBHQ) [g/kg]	0.008	0.008	0.008

W celu zbadania wpływu niedoboru witaminy K<sub>1</sub> w diecie, oraz określenia czy niedobór witaminy K<sub>1</sub> można przywrócić żywieniem dietą zaspokajającą zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> myszy C57BL/6J, w wieku 14 tygodni przydzielono do czterech grup doświadczalnych, gdzie każda z grup była żywiona w sposób zgodny z poniższym schematem.

- **Grupa AIN-93M (+K<sub>1</sub>)** - grupa, którą przez 10 tygodni żywiono dietą kontrolną AIN-93M (+K<sub>1</sub>), w której dzienne zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> zapewniono poprzez dodanie witaminy K<sub>1</sub> w dawce w ~ 0,75 mg/kg paszy.
- **Grupa AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>)** - grupa, którą przez 10 tygodni żywiono zmodyfikowaną dietą AIN-93M zgodnie z **Tabelą 2**; zawierająca płatki ryżowe, AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>), w której dzienne zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> zapewniono poprzez dodanie witaminy K<sub>1</sub> w dawce w ~ 0,75 mg/kg paszy.
- **Grupa AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)** - grupa, którą przez 10 tygodni żywiono zmodyfikowaną, dietą AIN-93M zawierającą płatki ryżowe, AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>); bez dodatku witaminy K<sub>1</sub>.
- **Grupa AIN-93M RYŻ(-/+K<sub>1</sub>)** - grupa, którą przez 5 tygodni żywiono dietą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>), bez dodatku witaminy K<sub>1</sub> a następnie przez kolejne 5 tygodni żywiono dietą AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>).

W celu oceny wpływu niedoboru witaminy K<sub>1</sub>, na wywołaną dyslipidemią dysfunkcję śródbłonna, 14-tygodniowe myszy E3L.CETP przydzielono do dwóch grup eksperymentalnych. Każda z grup była żywiona przez 10 tygodni w sposób zgodny z poniższym schematem. Wyniki porównano z wynikami uzyskanymi u dopasowanych wiekowo myszy C57BL/6J według tego samego schematu żywieniowego.

- **Grupa AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>)** - grupa, którą przez 10 tygodni żywiono dietą kontrolną AIN-93M (+K<sub>1</sub>), zawierającą witaminę K<sub>1</sub> w dawce w ~ 0,75 mg/kg paszy.
- **Grupa AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)** - grupa, którą przez 10 tygodni żywiono zmodyfikowaną dietą AIN-93M zawierającą płatki ryżowe, AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>); bez dodatku witaminy K<sub>1</sub>.

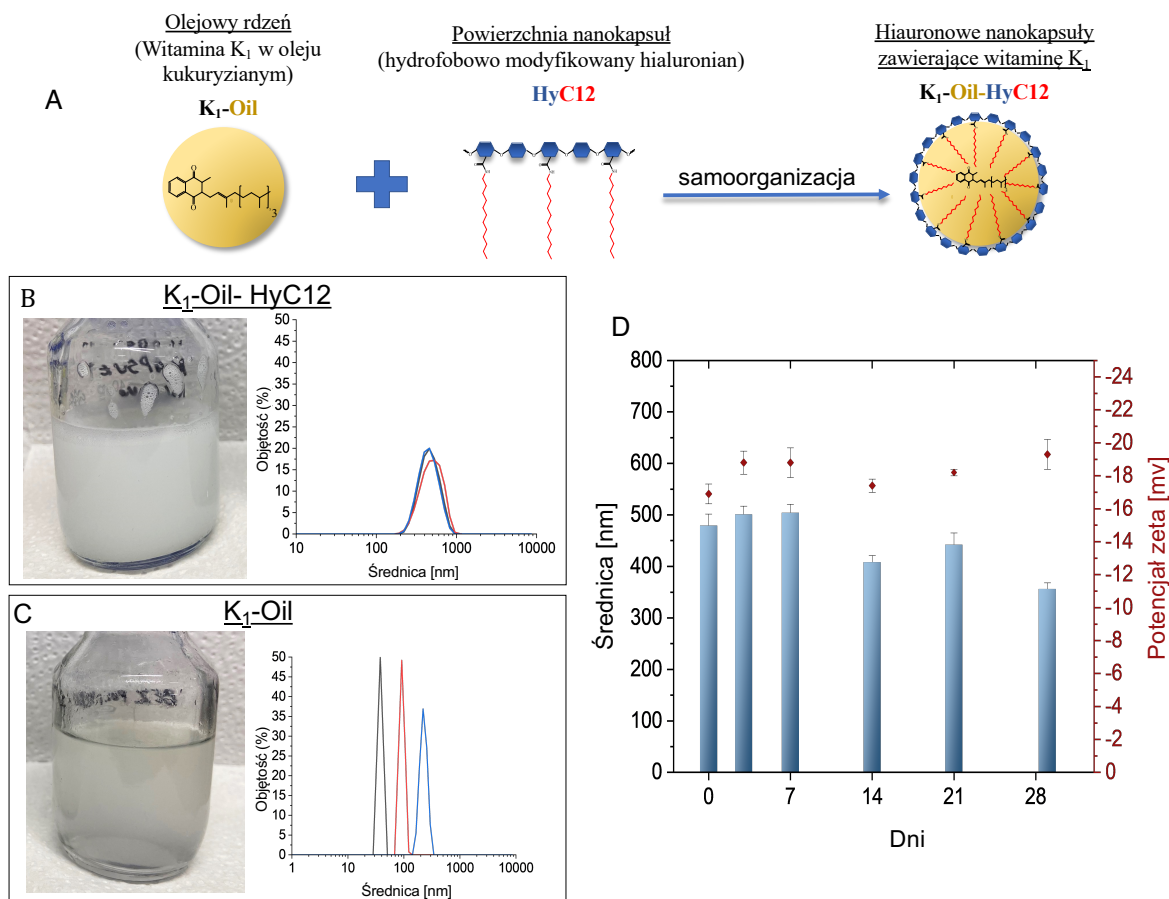


### 2.3 Model niedoboru witaminy K<sub>1</sub> u myszy normolipidemicznych C57BL/6J; zastosowanie hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu do dostarczania witaminy K<sub>1</sub> w celu poprawy efektywności odwracania skutków niedoboru witaminy K<sub>1</sub>

Hialuronowe nanokapsuły o olejowym rdzeniu zawierającym witaminę K<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12) zsyntetyzowano zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rycinie 2 A** i poprzednimi pracami opublikowanymi przez zespół Prof. Sz. Zapotoczego [85–88]. Hydrofobową pochodną kwasu hialuronowego (HyC12) otrzymano zgodnie z wcześniej opisanymi protokołami [85,86,88]. Wyboru rozpuszczalnika witaminy K<sub>1</sub> dokonano na podstawie pomiaru zawartości witaminy K w różnych olejach, aby zminimalizować dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> z rozpuszczalnika. Wybrano olej kukurydziany, który zawierał najniższe stężenie witaminy K<sub>1</sub> (0,443 mg/kg oleju) w porównaniu z olejem słonecznikowym (18,811 mg/kg oleju), czy olejem sojowym (10,340 mg/kg oleju). Nanokapsuły przygotowano przy użyciu procesu emulgowania wspomaganego ultradźwiękami. Wodny roztwór pochodnej polisacharydu (1 g/L w 0,01 M PBS, Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) zmieszano z fazą olejową zawierającą rozpuszczoną witaminę K<sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Boczne grupy alkilowe (dodecyl, C12) umożliwiły samoorganizację zmodyfikowanych łańcuchów polisacharydowych wokół nanokropelek oleju kukurydzianego w fazie wodnej, prowadząc do utworzenia otoczki nanokapsuł z zamkniętą w formie rdzenia witaminą K<sub>1</sub> rozpuszczoną w oleju (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12). Mieszaninę homogenizowano przy użyciu wytrząsarki wirowej, a następnie poddano działaniu ultradźwięków. Emulsję zawierającą witaminę K<sub>1</sub> rozpuszczoną w oleju kukurydzianym (K<sub>1</sub>-Oil) przygotowano bez polimeru lub innych środków stabilizujących i zastosowano jako kontrolę efektywności dostarczania witaminy K<sub>1</sub>. Zarówno nanokapsuły K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 jak i K<sub>1</sub>-Oil zawieszono w DPBS.

Charakterystyki nanokapsuł dokonano na podstawie pomiaru dynamicznego rozpraszania światła (DLS; *Dynamic light scattering*), wykonanego dla K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 (**Rycina 2 B**) oraz emulsji K<sub>1</sub>-Oil (**Rycina 2 C**). Ważone objętościowo rozkłady średnic K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 i K<sub>1</sub>-Oil wykazały, iż K<sub>1</sub>-Oil w środowisku wodnym była mniej stabilna w porównaniu do jednorodnej zawiesiny K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, co potwierdza również obserwacja zaprezentowana na reprezentatywnych zdjęciach obu formułacji (**Rycina 2 B, C**).

Stabilność K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 w czasie oceniano analizując zmiany wielkości i potencjału zeta za pomocą DLS w czasie (**Rycina 2 D**), a parametry te pozostawały stabilne nawet po 29 dniach przechowywania w temperaturze 4°C.



**Rycina 2. Charakterystyka nanokapsuł na bazie hialuronianu z rdzeniem olejowym zawierającym rozpuszczoną witaminę K<sub>1</sub>.** Nanokapsuły na bazie hialuronianu z rdzeniem z oleju kukurydzianego zawierające rozpuszczoną witaminę K<sub>1</sub> zsyntetyzowano, zgodnie z przedstawionym schematem graficznym (A). Wielkość cząstek zawierających K<sub>1</sub>: oceniono dla K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 (B) i K<sub>1</sub>-Oil (C). Stabilność nanokapsuł podczas przechowywania w temperaturze 4°C oceniano przez monitorowanie przez 28 dni zmian wielkości nanokapsuł i potencjału Zeta (D). (Syntezę nanokapsuł wykonano we współpracy z Dr M. Hazuka-Janik oraz Mgr J. Bednorz z Wydziału Chemii, UJ, Kraków).

### 3. Modele badawcze wykorzystane do badania naczynioprotekcyjnych efektów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>; badania *ex vivo*

#### 3.1 Model izolowanej mysiej aorty *ex vivo* traktowanej witaminą K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>

Uszkodzenie zależnej od śródbłonna odpowiedzi rozkurczowej naczynia *ex vivo* wywoływano poprzez 24 godziną inkubację krążków aorty w pożywce hodowlanej Minimum Essential Medium (MEM), (Gibco, Paisley, Szkocja, Wielka Brytania) wzbogaconej 20% FBS w obecności TNF (10ng/mL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone). Naczynioprotekcyjne działanie witaminy K<sub>1</sub> i witaminy K<sub>2</sub>(MK-7) (NattoPharma, part of Gnosis by Lesaffre, Lesaffre, France) *ex vivo* oceniano na podstawie odpowiedzi rozkurczowej naczynia po podaniu acetylocholino (Ach) i nitroprusydku sodu (SNP), przy użyciu miografu klasycznego, po 24 godzinnej inkubacji krążków aorty z TNF w obecności witamin K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub>(MK-7), (10μM), dla 6 osobników/grupę.

#### **4. Modele badawcze wykorzystane do badania naczynioprotekcyjnych efektów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>; badania *in vitro***

##### 4.1 Modele *in vitro* wykorzystane do badania senolitycznych efektów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>

###### 4.1.1 Model replikacyjnego starzenia się komórek PAEC i 04/35F/11A

Do oceny wpływu witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na proces replikacyjnego starzenia się komórek wykorzystano komórki śródbłonka PAEC oraz komórki mięśniówki gładkiej ściany naczynia 04/35F/11A. Starzenie się komórek w modelu replikacyjnego starzenia się osiągnięto poprzez kolejne pasażę skutkujące wielokrotną replikacją komórek. Fenotyp komórek PAEC uznano za starzejący się po piątym pasażu, natomiast w przypadku 04/35F/11A po dwudziestym pierwszym pasażu. Następnie komórki traktowano przez 24 godzin (PAEC) lub 48 godzin (04/35F/11A) witaminą K<sub>1</sub> lub witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) w stężeniu 5 lub 10 μM, po czym oceniano efekty senolityczne poprzez ocenę proliferacji, analizę aktywności związanej ze starzeniem β-galaktozydazy (SAβgal).

###### 4.1.2 Model starzenia się komórkach HAEC wywołanego promieniowaniem rentgenowskim

Komórki śródbłonka HAEC naświetlano przy użyciu promieniowania rentgenowskiego o mocy 10 Gy (we współpracy z Dr A. Panek z Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie). Do naświetlania promieniowaniem rentgenowskim zastosowano aparaturę MCN 323 (Philips, Hamburg, Niemcy) o parametrach 250 kV, 10 mA. Dozymetrię wykonano przy użyciu referencyjnego dozymetru UNIDOS oraz komory jonizacyjnej TM31013 (PTW, Freiburg, Niemcy). Wymiary pola promieniowania oszacowano na 20 x 20 cm<sup>2</sup>, a odległość źródła od powierzchni wynosiła 34,8 cm [89]. Butelki hodowlane z linią HAEC naświetlano na specjalnie zaprojektowanym fantomie z polimetakrylanu metylu. Średnia zmierzona moc dawki wynosiła 0,03 Gy/s, a całkowita dawka dostarczona do próbek wynosiła 10 Gy. Po ekspozycji komórki przenoszono do inkubatora komórkowego. Po 24 godzinach pożywkę hodowlaną wymieniano na pożywkę zawierającą witaminę K<sub>1</sub>, lub witaminę K<sub>2</sub>(MK-7) (10 μM), lub na pożywkę bez dodatku witamin. Przez cały okres starzenia się komórek, który oszacowano na 10 dni, pożywkę wymieniano codziennie na w celu utrzymania stałego poziomu witamin. Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na starzenie się komórek oraz uszkodzenie DNA wywołane promieniowaniem w tym

modelu oceniano poprzez analizę proteomiczną białek związanych z uszkodzeniem DNA, stresem oksydacyjnym oraz starzeniem się a także analizowano aktywność SAβgal.

#### 4.1.3 Model starzenia się komórek 04/35F/11A wywołane gromadzeniem prelaminy A

Starzenie się komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia 04/35F/11A osiągnano na dwa sposoby, w zależności od stosowanego następnie układu doświadczalnego: 1/poprzez wywołanie nadekspresji prelaminy A za pomocą wektora adenowirusowego, lub 2/poprzez wyciszenie za pomocą siRNA genu FACE-1 (*Farnesylated Protein Convertin Enzyme-1*), skutkującego zahamowaniem dojrzewania prelaminy A i w konsekwencji jej gromadzeniem.

1/ Procedurę transfekcji adenowirusem rozpoczynano gdy konfluencja komórek 04/35F/11A wynosiła 60%-70%. Miano wirusa użyte do transfekcji wynosiło około 40 jednostek wirusa na komórkę. Komórki infekowano rekombinowanymi adenowirusami znakowanymi FLAG, zawierającymi nierozszczepialną postać prelaminy A, zmodyfikowanej w miejscu cięcia Zmpste24 (L647R) (Ad/UC). Sekwencja została opracowana i zsyntetyzowana przez laboratorium Prof. C.M. Shanahan, King's Collage London w Londynie. Efektywność transfekcji oceniano przy pomocy barwienia immunocytochemicznego przeciwciałem anti-FLAG (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone). Oczekiwana efektywność transfekcji wynosiła około 80%.

Inkubację witaminą K<sub>1</sub> i witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) rozpoczynano po 40 minutach od momentu wprowadzenia wirusa i prowadzono przez 48 godzin. Pożywkę wymieniano co 24 godziny w celu zapewnienia stałego stężenia witaminy. Efekt senolitycznym witaminy K<sub>1</sub> i witaminy K<sub>2</sub>(MK-7) oceniano na podstawie analizy ekspresji genów związanych ze starzeniem się komórek oraz aktywności SAβgal.

2/ Procedurę wyciszania ekspresji FACE-1 rozpoczynano przy konfluencji 70%-80% 04/35F/11A. Małe interferujące RNA (siRNA; *small interference RNA*) FACE-1, w stężeniu 5 nM wprowadzano do komórek przy użyciu odczynnika do transfekcji HiPerfect (Qiagen, Manchesterze, Wielka Brytania). Traktowanie witaminami rozpoczynano po 24 godzinach po transfekcji, poprzez zmianę pożywki hodowlanej na pożywkę uzupełnioną 10 μM witaminą K<sub>1</sub> lub witaminą K<sub>2</sub>(MK-7). Inkubację prowadzono 24 godziny inkubację. Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na hamowanie uszkodzeń DNA analizowano immunocytochemicznie przy użyciu przeciwciała przeciwko fosforylowanemu histonowi H2A.X (Ser139) (Cell Signaling Technology, Wielka Brytania).

## 4.2 Modele *in vitro* wykorzystane do badania działania przeciwzapalnego witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>

### 4.2.1 Model zapalenia w komórkach śródbłónka (HAEC)

Ludzką linię komórek śródbłónka HAEC stymulowano prozapalnie przy użyciu TNF (10ng/mL) poprzez 24 godzinną inkubację. Inkubacja z witaminą, witaminą K<sub>2</sub>(MK-4) oraz witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) (10μM), obejmowała 24 godziną inkubację z witaminami przed stymulacją prozapalną oraz 24 godzinną inkubację razem z TNF. Następnie badano wpływ witaminy K<sub>1</sub> lub witaminy K<sub>2</sub> na adhezję monocytów do śródbłónka, ekspresję ICAM-1 i COX-2 oraz produkcję PGE<sub>2</sub>.

### 4.2.2 Model zapalenia w makrofagach (RAW 264.7)

Stan zapalny w makrofagach wywoływano poprzez 24 godzinną inkubację z LPS (serotypu Abortusequi Salmonella enterica) (1 ng/mL). W celu określenia działania przeciwzapalnego witaminy K, komórki inkubowano 48 godzin w obecności lub bez witamin K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) lub K<sub>2</sub>(MK-7) (10 μM), w tym 24 godziny przed stymulacją prozapalną oraz 24 godziny razem z LPS. Pożywkę zmieniano co 24 godziny, aby zapewnić stałe stężenie witamin. Działanie przeciwzapalne analizowano na podstawie markerów prozapalnych takich jak cytokiny (TNF, IL-6), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oraz PGE<sub>2</sub>.

## 5. Ocena efektów naczynioprotekcyjnych *in vivo*

### 5.1 Ocena czynności rozkurczowej naczynia *in vivo* za pomocą MRI

Zależną i niezależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczynia *in vivo* oceniano za pomocą MRI zgodnie z opublikowanymi wcześniej protokołami [90–93]. Obrazowanie MRI wykonano za pomocą skanera 9,4T (BioSpec 94/20 USR; Bruker BioSpin GmbH; Ettlingen, Niemcy) u myszy w anestezji ogólnej z użyciem izofluranu. W trakcie badania monitorowano parametry życiowe zwierząt takie jak rytm serca, oddech oraz temperatura ciała.

Zależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczynia oceniono w odpowiedzi na Ach, podawaną dootrzewnowo w dawce 16,6 mg/kg m. c. Niezależny od śródbłónka rozkurcz naczyń oceniano w odpowiedzi na SNP, podawany dożylnie w dawce 1 mg/kg m. c. Zależną i niezależną od śródbłónka odpowiedź naczynia w zależności od zastosowanego modelu oceniano w aorcie piersiowej i brzusznej lub w pniu ramiennie-głowym tętnicy szyjnej i lewej tętnicy szyjnej.

Rozkurcz naczyń w odpowiedzi na zwiększony przepływ krwi (FMD; *Flow mediated dilatation*) oceniano w tętnicy udowej, po krótkotrwałej okluzji naczynia (5 min) zgodnie z metodyką opisaną w poprzednich badaniach [94,95].

## 5.2 Oznaczenie stężenia witaminy K<sub>1</sub> i witamin z grupy K<sub>2</sub> w osoczu, wątrobie aorcie i kale myszy z zastosowaniem techniki UHPLC-APCI-MS/MS

Krew pobrano z prawej komory serca strzykawek opłaszczonych K2-EDTA, użytego jako środek przeciwzkrzepowy, a następnie odwirowano (664 x g, 12 min, 4 ° C) w celu oddzielenia osocza. Aorty perfundowano 0,9% roztworem chlorku sodu (NaCl), wyizolowano i oczyszczono z otaczających tkanek w tym z okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej (PVAT; *perivascular adipose tissue*). Wątroby izolowano po perfuzji przy użyciu 0,9% NaCl, izolowano, ważono i zabezpieczano płat ogonowy. Kał zbierano z klatek poszczególnych grup. Osocze, aortę i płat wątroby natychmiast zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszej analizy.

Stężenie witaminy: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4), K<sub>2</sub>(MK-5), K<sub>2</sub>(MK-6), K<sub>2</sub>(MK-7) oraz K<sub>2</sub>(MK-9) oznaczano w osoczu, aorcie, wątrobie i kale, oraz w badanych dietach z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z tandemową spektrometrią mas stosując jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (UHPLC-APCI-MS/MS), jak opisano wcześniej [12,20], z niewielkimi modyfikacjami. System UHPLC-APCI-MS/MS obejmował chromatograf cieczowy Ultimate 3000 UHPLC (Dionex; Sunnyvale, Kalifornia, Stany Zjednoczone) oraz spektrometr mas typu potrójny kwadrupol TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific). Aortę (ok. 7 mg), wybrany płat wątroby (ok. 150 mg) i kał (ok. 50 mg) automatycznie homogenizowano w 500 µl etanolu przy użyciu homogenizatora tkankowego Precellys Evolution (Bertin; Montigny-le-Bretonneux, Francja). Próbkę osocza rozcieńczano wodą dejonizowaną do objętości 500 µl. Zmodyfikowane diety AIN-93M rozdrabniano w moździerz ceramiczny, ważono (ok. 50 mg) i zawieszano w 500 µl etanolu.

Następnie do próbek dodawano 10 µl wzorca wewnętrznego (K<sub>1</sub>-d7; 1 µg/mL), mieszano i dodawano kolejną porcję etanolu (łącznie 1000 µl), wody dejonizowanej (łącznie 500 µl), i heksanu (łącznie 1000 µl). Po 10 minutach energicznego wytrząsania dodawano kolejne 2 mL heksanu, a następnie wytrząsano próbki przez 10 minut. Po odwirowaniu próbek (4500 obr/min, 10 min, 4 °C), zebrano górną warstwę organiczną i przeniesiono do czystej szklanej probówki, a procedurę ekstrakcji powtórzono stosując 3 mL heksanu. Połączone warstwy organiczne odparowano do sucha w strumieniu azotu (40 °C), a suchą pozostałość

próbki rozpuszczono w 50 µl 2-propanolu. Po zwirowaniu próbek (1000 obr/min, 5 min, 4 °C), supernatanty przeniesiono do fiolek chromatograficznych, i poddano analizie UHPLC-APCI-MS/MS. Rozdzielenie chromatograficzne witamin K prowadzono w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem kolumny analitycznej PFP (Kinetex 2,6 µm PFP, 100 Å, 100,0×3,0 mm; Phenomenex; Torrance, Kalifornia, Stany Zjednoczone), oraz elucji gradientowej przy użyciu 0,1% kwasu mrówkowego w 2-propanolu oraz 0,1% kwasu mrówkowego w 5 mM mrówczanie amonu jako faz ruchomych. Dokładne warunki prowadzenia analizy chromatograficznej oraz parametry spektrometru mas, a także wybrane monitorowane przejścia jonowe charakterystyczne dla witamin K zostały opisane w pracach [12,20].

### 5.3 Ocena parametrów krzepnięcia krwi na podstawie pomiaru stężenia kompleksu trombina-antytrombina (TAT)

Krew pobierano z prawej komory serca do strzykawkę opłaszczonych 3,8% cytrynianem sodu jako środka przeciwzakrzepowego, a następnie odwirowano (664 x g, 12 min, 4 ° C) w celu oddzielenia osocza. Stężenie TAT w osoczu, oceniano ilościowo za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu do immunoenzymatycznego (ELISA) (EMT1020-1; AssayPro; St. Charles, Missouri, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją producenta. Na podstawie stężenia TAT oceniano aktywność układu krzepnięcia.

## 6. Ocena efektów naczynioprotekcyjnych *ex vivo*

### 6.1 Ocena odpowiedzi rozkurczowej naczyń *ex vivo* za pomocą miografu klasycznego

Do pomiarów z użyciem miografu klasycznego, aorty oczyszczono w zimnym roztworze Krebsa-Henseleita (KB) przedmuchiwanym 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> (pH = 7,4), a następnie cięto na krążki. Krążki inkubowano zgodnie z wyżej opisanym protokołem (**III Materiały i metody; rozdział 3.1**)

Krążki aorty montowano w systemie miografu Mulvany'ego (620 M, Danish Myo Technology, Dania), a następnie dokonano oceny zależnego i niezależnego od śródbłonka rozszerzenia naczyń *ex vivo*, zgodnie z opisanym wcześniej protokołem [92,96]. W skrócie wstępnie wywoływano skurcz krążków aorty przy pomocy fenylefryny, a następnie mierzono odpowiedź rozkurczową na Ach (0.01-10 μM), odzwierciedlającą odpowiedź zależną od śródbłonka, oraz odpowiedź rozkurczową na SNP (0,001–1 μM), jako odpowiedź niezależna od śródbłonka.

## 7. Ocena efektów naczynioprotekcyjnych *in vitro*

### 7.1 Analiza efektów naczynioprotekcyjnych związanych ze starzeniem się komórek

#### 7.1.1 Analizę aktywności β-galaktozydazy

W celu potwierdzenia fenotypu komórek starzejących się a także senolitycznego działania witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> określano aktywność SAβ-gal, przy pomocy komercyjnie dostępnych testów (Cell Signalling Technology, Wielka Brytania lub Sigma Aldrich, Polska) zgodnie z protokołem producenta. Barwienie prowadzono w inkubatorze komórkowym w wilgotnej atmosferze w temperaturze 37°C, bez CO<sub>2</sub>.

#### 7.1.2 Analiza zmian ekspresji genów związanych ze starzeniem się komórek metodą PCR

Zmiany ekspresji genów związanych ze starzeniem określono przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *Polymerase chain reaction*) w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją. Całkowitą pulę RNA wyizolowano z komórek przy użyciu RNA-STAT-60 (Amsbio, Cambridge, MA, Stany Zjednoczone), zgodnie z protokołem producenta. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, Stany Zjednoczone). Ilościową



analizę PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono za pomocą termocyklera Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, Stany Zjednoczone) z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Bioscience, Carlsbad, CA, Stany Zjednoczone) umożliwiającej ilościowe monitorowanie produktu reakcji. Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej. Zastosowano następujące ustawienia cyklu: 95°C przez 10 minut a następnie 40 cykli obejmujących 95°C przez 5 sekund i 60°C przez 1 minutę. Ekspresję genów związanych ze starzeniem się komórek (p16, p21 oraz IL-6) oceniono przy użyciu specyficznych starterów (**Tabela 3**). Wyniki znormalizowano na ekspresję genu podjednostki 18S rybosomalnego RNA; genu referencyjnego (ang. *Housekeeping gene*).

**Tabela 3. Wykaz Starterów PCR zastosowanych w badaniach**

<b><i>Ludzkie startery PCR</i></b>	
podjednostka 18S rybosomalnego RNA	QT00199367 Hs_RRN18S_1_SG QuantiTect Primer Assay
p21	QT00062090 Hs_CDKN1A_1_SG QuantiTect Primer Assay
p16	QT00998459 Hs_CDKN2A_vb.1_SG QuantiTect Primer Assay
IL-6	QT00083720 Hs_IL6_1_SG QuantiTect Primer Assay

### 7.1.3 Proteomiczna ocena zmian profilu białek związanych ze starzeniem się komórek

W celu oceny zmian profilu białek związanych ze starzeniem się komórek HAEC w modelu starzenia się indukowanego promieniowaniem rentgenowskim wykonano niecelowaną różnicową analizę proteomiczną typu "label-free". Liza komórek została przeprowadzona w buforze zawierającym 7 M mocznik, 2 M tiomocznik oraz 30 mM Tris-HCl (pH 8.0). Białka poddano procesom redukcji, alkilacji i dwuetapowemu trawieniu enzymatycznemu (LysC, trypsyna) z zastosowaniem zmodyfikowanej metody FASP. Analizę proteomiczną przeprowadzono z zastosowaniem systemu LC-MS składającego się z nano-HPLC – Ultimate 3000 (Dionex), połączonego z wysokorozdzielczym spektrometrem mas Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Pomiary LC-MS wykonano we współpracy z Dr Moniką Pietrowską w Pracowni Proteomiki Klinicznej, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, NIO PIB, Oddział w Gliwicach. Analiza biostatystyczna oraz wizualizacja uzyskanych wyników została

wykonana m.in. przy pomocy programów MaxQuant, Perseus, String DB, Panther DB oraz ShinyGO.

#### 7.1.4 Ocena wpływu witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na proliferację komórek

Oceny zmian proliferacji komórek dokonano za pomocą testu zarastania rany dla komórek śródbłonna HAEC lub poprzez ręczne zliczanie komórek przy pomocy komory Bürkera.

Test zarastania rany na komórkach w czasie rzeczywistym, połączony z analizą ilościową, przeprowadzono z zastosowaniem macierzy 96W1E+ ECIS (Applied BioPhysics, Troy, NY, Stany Zjednoczone), zgodnie ze wcześniejszym protokołem [97]. Przed wysianiem komórek płytkę 96W1E+ traktowano wstępnie przez 10 minut L-cysteiną (10 mM), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) w temperaturze pokojowej i przemyto dwukrotnie ultraczystą wodą. Po przemyciu do każdej studzienki dodano 200  $\mu$ l pożywki DMEM, aby sprawdzić podstawowe wartości rezystancji ( $\Omega$ ), pojemności ( $\mu$ F) i impedancji ( $\Omega$ ). Następnie zarówno komórki PAEC, jak i HAEC wysiano z gęstością  $3,5 \times 10^4$  na studzienkę w końcowej objętości 300  $\mu$ l. Wartości rezystancji, pojemności i impedancji rejestrowano przy częstotliwościach od 250 Hz do 64 kHz (250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16 000, 32 000 i 64 000 Hz) przy użyciu trybu wielu częstotliwości w czasie. Wolne od komórek studzienki służyły jako kontrola negatywna, aby zapewnić podstawowe zmiany impedancji dla wszystkich eksperymentów. Gdy sygnał impedancji osiągnął wartość stacjonarną, (po 2–3 dniach od wysiania komórek) wypalano „ranę” przez przyłożenie prądu przemiennego 3000  $\mu$ A, 4 kHz przez 30 sekund, uśmiercając komórki na powierzchni elektrody. Martwe komórki wypłukiwano DPBS, a następnie oceniano gojenie się rany poprzez ciągłe pomiary oporności przez 48 godzin w obecności witaminy K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7) w stężeniu 5 lub 10  $\mu$ M. Pożywkę zmieniano co 24 godziny, aby zapewnić stałe stężenie witaminy K. Eksperyment przeprowadzono w nawilżanym inkubatorze z 5% CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C i powtórzono trzykrotnie w 3-4 powtórzeniach technicznych. Powierzchnię pod krzywą (AUC) określono ilościowo a wyniki znormalizowano w stosunku do nietraktowanej kontroli.

Proliferację komórki 04/35F/11A oceniano na podstawie zliczania ilości komórek przy pomocy komory Bürkera [98] po zebraniu komórek z dołków płytki przy pomocy trypsiny (Gibco, Paisley, Szkocja, Wielka Brytania).

## 7.2 Analiza efektów naczynioprotekcyjnych związanych z zapaleniem

### 7.2.1 Pomiary produkcji tlenku azotu w pożywce pochodowlanej

Produkcję NO oceniano na podstawie pomiarów stężenia azotynów ( $\text{NO}_2^-$ ) w pożywce pochodowlanej za pomocą analizatora ENO-20 NOx Analyzer (Amuza Inc, San Diego, CA, Stany Zjednoczone) [99]. System ENO-20 działa w oparciu o technikę chromatografii cieczerwowej z derywatyzacją pokolumnową z użyciem odczynnika Griessa. Azotyny i azotany są oddzielane od innych substancji w matrycach na kolumnie NO-PAK. Następnie azotany są redukowane do azotynów na kolumnie kadmowo-miedzianej (NO-RED, Amuza, Inc., San Diego, CA, Stany Zjednoczone). Azotyny w połączeniu z odczynnikiem Griessa tworzą purpurowy produkt, którego absorpcję mierzona jest dla długości fali 540 nm

### 7.2.2 Analiza produkcji $\text{PGE}_2$ , IL-6 i TNF metodą ELISA w pożywce pochodowlanej

Pomiary stężenia markerów zapalnych w pożywce pochodowlanej, IL-6 (R&D system, Abingdon, Wielka Brytania), TNF (R&D system, Abingdon, Wielka Brytania) i  $\text{PGE}_2$  (ENZO, Lausen, Switzerland) wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnych immunoenzymatycznych testów ELISA zgodnie z protokołami rekomendowanymi przez producenta.

### 7.2.3 Test adhezji komórek

Test adhezji monocytów do aktywowanego prozapalnie śródbłonna przeprowadzono w warunkach statycznych. Stan zapalny w komórkach HAEC wywołano poprzez 24 godziną inkubację z TNF (10 ng/mL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone). Komórki inkubowano z witaminą  $\text{K}_1$ ,  $\text{K}_2(\text{MK-4})$  lub  $\text{K}_2(\text{MK-7})$ , (10  $\mu\text{M}$ ) przez 48 godzin (24 godziny przez i 24 godziny razem z TNF). Przed adhezją, komórki monocytów U937 przemyto DPBS i barwiono roztworem kalceiny AM (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Stany Zjednoczone) przez 30 minut. Komórki U937 wybarwione kalceiną, jak również stymulowane komórki HAEC przemyto DPBS. Następnie komórki U937 dodano do studzienek mikroplątki w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek na studzienkę i pozostawiono w celu adhezji na 30 minut w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Po inkubacji komórki przemyto delikatnie dwukrotnie DPBS w celu usunięcia komórek nieadherentnych. Następnie komórki barwiono Hoechst 33342, w celu uwidocznienia jąder komórkowych. Obrazy mikroskopowe z 6 pól mikroskopowych uzyskano przy użyciu systemu do analizy Yokogawa CQ1 (lasery wzbudzające 405/488 nm i filtry emisyjne 452/45 i 525/50). Obrazy analizowano w oprogramowaniu Columbus 2.4.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Stany Zjednoczone). Komórki U937 identyfikowano na podstawie

wysokiej fluorescencji kalceiny podczas gdy komórki śródbłonna zliczano na podstawie wysokiej fluorescencji Hoechst.

#### 7.2.4 Immunohistochemiczna analiza białek związanych z zapaleniem

Analizę immunohistochemiczną ekspresji ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), cyklooksygenazy-2 (COX-2) oraz NFκB wykonano z użyciem przeciwciał pierwszorzędowych: ICAM-1 (BD Pharmingen, San Jose, CA, Stany Zjednoczone) COX-2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone) i NFκB (Santa Cruz Biotechnology, Niemcy) oraz dopasowanych przeciwciał drugorzędowych sprzęgniętych z barwnikami fluorescencyjnymi: przeciwciało kozie anti-królicze znakowane Cy3 (111-165-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Stany Zjednoczone) lub kozie anti-królicze znakowane AlexaFluor488 (111-545-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Stany Zjednoczone). W razie potrzeby, jądra komórkowe barwiono przy użyciu Hoechst33342 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone). Obrazy mikroskopowe uzyskano przy użyciu monochromatycznego odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego AxioCam i Kamery AxioObserver 22 D1 (Carl Zeiss Jena, Oberkochen, Niemcy). Obrazy z 5 randomowych pól 3 powtórzeń technicznych, 3 niezależnych, biologicznych prób analizowano w oprogramowaniu Columbus 2.4.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Stany Zjednoczone). Jądra komórkowe barwiono przy użyciu Hoechst33342 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone). Oceny translokacji jądrowej NFκB dokonano poprzez zliczenie NFκB-immunopozytywnych jąder komórkowych w stosunku wszystkich jąder komórkowych przy użyciu oprogramowania Columbus 2.4.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Stany Zjednoczone).

#### 7.2.5 Ocena produkcji eikozanoidów w pożywce pochodzącej metodą UHPLC-APCI-MS/MS

Stężenie PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 11β-PGF<sub>2α</sub>, 15-deoksy-PGJ<sub>2</sub> i 8-izo-PGF<sub>2α</sub> oznaczano za pomocą systemu chromatografu cieczowego UFLC Nexera (Shimadzu, Kioto, Japonia) połączonego z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol QTrap 5500 (Sciex, Framingham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Do próbki dodano mieszaninę wzorców wewnętrznych (IS), i poddano ekstrakcji do fazy ciekłej stosując octan etylu (EtOAc) zakwaszony kwasem octowym. Po energicznym wytrząsaniu, próbki odwirowano i górną warstwę organiczną zebrano do czystych probówek, i odparowano do sucha w strumieniu azotu

(37 °C). Suchą pozostałość rozpuszczono w etanolu przepłukany azotem, i po zwirowaniu próbki poddano analizie UHPLC-MS/MS. Anality rozdzielano na kolumnie chromatograficznej Aquity UPLC BEH C18 (3,0x100 mm, 1,7 µm, Waters, Milford) w trybie elucji gradientowej. Detekcja MS badanych eikozanoidów i ich deuterowanych wzorców wewnętrznych została przeprowadzona w trybie elektrorozpylania w jonizacji ujemnej, z zastosowaniem trybu monitorowania wielu reakcji fragmentacji (MRM). Szczegółowe warunki prowadzenia analizy chromatograficznej oraz detekcji MS zostały opisane we wcześniejszych pracach [20].

Oznaczenie stężenia poszczególnych eikozanoidów przeprowadzono w oparciu o krzywe kalibracyjne, wykreślone dla każdego analitu, jako zależność między stosunkiem powierzchni pików analitu/IS do nominalnego stężenia analitu. Poziomy eikozanoidów w próbkach pożywki komórkowej obliczono na podstawie równań regresji liniowej oszacowanych dla każdego analitu.

## **8. Badanie wychwytu witaminy K<sub>1</sub> oraz produkcji endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w warunkach *ex vivo* oraz *in vitro***

Izolowaną oczyszczoną i przeciętą wzdłuż aortę, inkubowano przez 24 godziny witaminą K<sub>1</sub> lub witaminą K<sub>3</sub> (5µM). Komórki śródbłonna HAEC i komórki mięśniówki gładkiej aorty MOVAS inkubowano przez 24 godziny z witaminą K<sub>1</sub> lub witaminą K<sub>3</sub> (1µM). Makrofagi (RAW 264.7) inkubowano przez 24 godziny z witaminą K<sub>1</sub> lub witaminą K<sub>3</sub> (10 µM).

W celu zbadania mechanizmu endogennej produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) prenylację witaminy K<sub>3</sub> hamowano poprzez równoczesną inkubację aorty z witaminą K<sub>3</sub> razem z atorwastatyną (ATO) w stężeniu 1µM przez 24 godzinny.

Następnie aortę automatycznie homogenizowano w 500 µl etanolu przy użyciu homogenizatora tkankowego Precellys Evolution (Bertin; Montigny-le-Bretonneux, Francja). Komórki zdrapywano w 500 µL wody destylowanej, po czym lizowano poprzez sonikację (10 min). Wychwyty witaminy K<sub>1</sub> oraz endogenną produkcję witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) oceniano na podstawie pomiaru poziomu witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) w homogenatach tkankowych lub lizatach komórkowych metodą UHPLC-APCI-MS/MS, zgodnie z procedurą opisaną powyżej **(III Materiały i metody; rozdział 5.2).**

## 9. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu GraphPad Prism 9 lub Perseus software - MaxQuant. W zależności od rozkładu danych, testowanego za pomocą testu Shapiro-Wilka lub D'Agostino-Pearsona, stosowano testy parametryczne: jednoczynnikowa oraz dwuczynnikowa ANOVA lub nieparametryczny test Krukala Wallisa. W zależności od eksperymentu, dane przedstawiono jako średnie z przedziałem ufności  $\pm 95\%$  (CI), średnie  $\pm$  SD lub medianę  $\pm$  IQR, co szczegółowo zaznaczono w opisach rycin. Wartości  $p < 0,05$  uzyskane w testach post hoc uznano za istotne statycznie.

## IV WYNIKI

### 1. Profil naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelach *ex vivo* oraz *in vivo*

Wpływ witaminy K<sub>1</sub> oraz K<sub>2</sub> na zależną od śródbłonka naczyniowego odpowiedź rozkurczową naczyń krwionośnych (wywołaną przez Ach) zbadano w izolowanej aortie *ex vivo* (w modelu dysfunkcji śródbłonka wywołanej przez TNF) oraz *in vivo* u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> z hipercholesterolemią, rozwijających spontanicznie dysfunkcję śródbłonka, a w późniejszym etapie blaszki miażdżycowe [20].

W modelu *ex vivo*, 24 godzinna inkubacja krążków mysiej aorty z TNF (10 ng/mL) wywołała upośledzenie rozkurczu aorty w odpowiedzi na Ach (**Rycina 3 A**). W obecności witaminy K<sub>1</sub> (10  $\mu$ M, 24 godziny inkubacji) upośledzenie rozkurczu aorty w odpowiedzi na Ach wywołane przez TNF było niemal całkowicie zniesione (**Rycina 3 A**). Podobną tendencję odnotowano w przypadku inkubacji aorty z TNF razem z witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) (10  $\mu$ M), jednak obserwowany efekt był słabszy i nie odnotowano istotności statystycznej (**Rycina 3 A**).

Inkubacja krążków aorty przez 24 godziny z TNF, wywoływała również upośledzenie rozkurczu wywołanego przez SNP (**Rycina 3 B**), ale stopień tego upośledzenia był mniej wyraźny, niż odpowiedź na Ach (**Rycina 3 A**). Zarówno witamina K<sub>1</sub> jak i K<sub>2</sub> nieznacznie poprawiały rozkurcz aorty w odpowiedzi na SNP. Istotną statystycznie różnicę, wskazującą na zachowanie niezależnej od śródbłonka odpowiedzi rozkurczowej aorty obserwowano jedynie w przypadku krążków aorty inkubowanych z witaminą K<sub>1</sub>, tylko przy stężeniu SNP wynoszącym 0,01  $\mu$ M (**Rycina 3 B**).

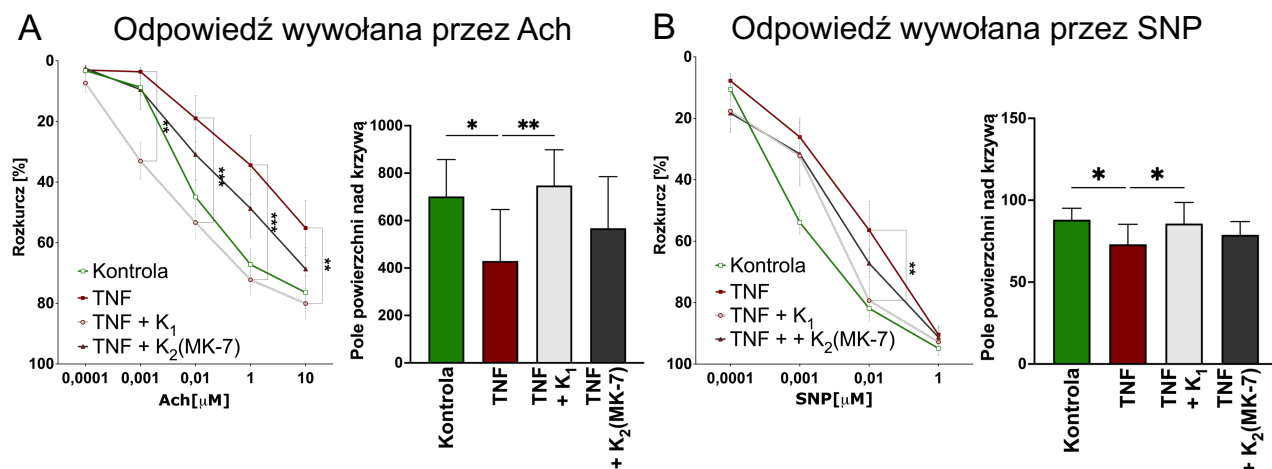
W modelu *in vivo*, myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> w wieku 24 tygodni wykazywały zaawansowaną dysfunkcję śródbłonka, o czym świadczył brak odpowiedzi rozkurczowej

naczynia w odpowiedzi na podanie Ach, oceniany za pomocą MRI w pniu ramiennogłowym tętnicy szyjnej (BCA; *Brachiocephalic artery*), jak również w lewej tętnicy szyjnej (LCA, *left carotid artery*). W miejsce prawidłowego rozkurczu wywoływanego przez Ach u zdrowych myszy C57BL/6J, u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> występował skurcz, który wynosił odpowiednio -9,13 % (BCA) i -25,71 % (LCA).

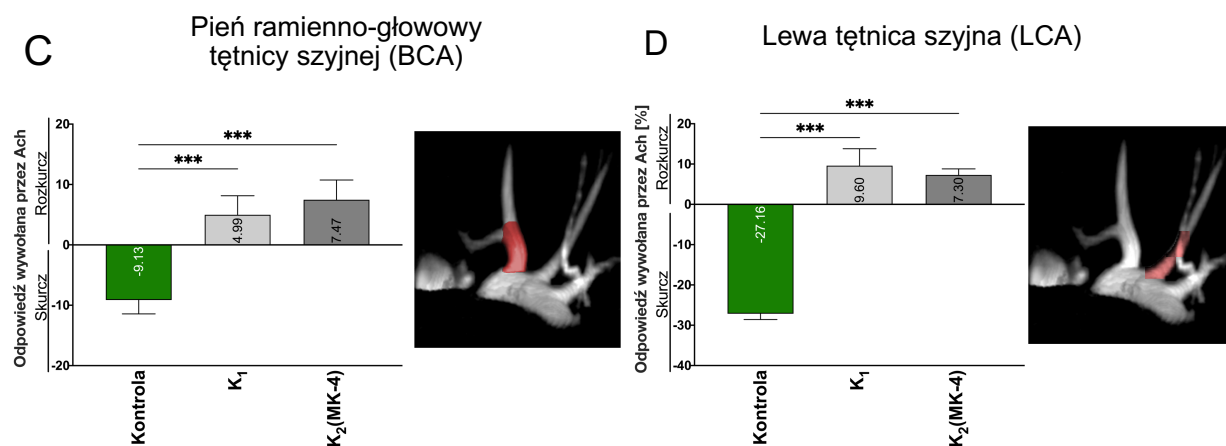
We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez A. Bar i wsp.(w zespole JCET), wykazano, że 8 tygodniowe żywienie myszy dietą wzbogaconą w witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) w dawce 10 mg/kg m. c., poprawiało czynność śródbłonna [20].

W ramach niniejszej pracy oceniono czynność śródbłonna u myszy ApoE /LDLR<sup>-/-</sup> w wieku 24 tygodni, których dietę wzbogacono w witaminę K<sub>1</sub> lub w witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) w dawce 10 mg/kg m. c., podobnie jak we wcześniejszych badaniach dotyczących witaminy K<sub>2</sub>(MK-7). Jak przedstawiono na **Rycinie 3**, 8 tygodniowa dieta wzbogacona tak w witaminę K<sub>1</sub>, jak i witaminę K<sub>2</sub>(MK-4), znacząco poprawiała zależny od śródbłonna rozkurcz naczyń w odpowiedzi na Ach. U myszy żywionych dietą wzbogaconą witaminą K<sub>1</sub>, w miejsce skurczu, zarówno w BCA, jak i w LCA, pojawiał się rozkurcz naczyń po podaniu Ach, który wynosił 4,99% w BCA oraz 9,70% w LCA (**Rycina 3 C, D**). U myszy żywionych dietą wzbogaconą witaminą K<sub>2</sub>(MK-4) rozkurcz naczyń wynosił 7,47% w BCA i 7,48% w LCA (**Rycina 3 C, D**). Wartości rozkurczu w BCA i LCA w odpowiedzi na podanie Ach, u myszy ApoE /LDLR<sup>-/-</sup>, żywionych dietą wzbogaconą w witaminę K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub>(MK-4) były porównywalne do wartości uzyskiwanych u zdrowych myszy C57BL/6J [94].

## Aorta traktowana TNF (ex vivo)



## Myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> (in vivo)



**Rycina 3. Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na czynność śródbłonnka w modelu mysiej aorty *ex vivo* (A, B) oraz w modelu *in vivo* u myszy ApoE/LDL<sup>-/-</sup>, oceniany na podstawie odpowiedzi rozkurczowej naczyń krwionośnych wywołanej przez acetylocholinę. Odpowiedź rozkurczową aorty zależną- (A) i dla porównania niezależną od śródbłonnka (B) mierzono *ex vivo* przy użyciu miografu po 24 godzinnej inkubacji z TNF w obecności lub bez witaminy K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub>(MK-7). Wpływ diety wzbogaconej witaminą K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) na funkcję rozkurczową naczyń krwionośnych u myszy ApoE/LDL<sup>-/-</sup> *in vivo* mierzono w pniu ramiennie-głównym tętnicy szyjnej (BCA) (C) oraz lewej tętnicy szyjnej (LCA) (D) przy użyciu rezonansu magnetycznego (MRI) u myszy żywionych przez 8 tygodni paszą kontrolną w porównaniu do myszy żywionych wzbogaconą witaminą K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub>(MK-4). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=6-10. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej lub dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta w odniesieniu do stymulowanej prozapalnie kontroli. Symbole \*,\*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05; 0,01 i 0,001. (Pomiary przy użyciu miografu wykonano we współpracy z Mgr T. Mohaissen, pomiary MRI wykonano we współpracy z Dr A. Bar z JCET, Kraków).**



## **2. Mechanizmy naczynioprotekcyjne witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> *in vitro*; działanie senolityczne i hamujące uszkodzenie DNA**

W celu zbadania mechanizmu naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> oraz K<sub>2</sub> oceniono wpływ tych witamin na proces starzenia się komórek. W badaniach wykorzystano trzy modele doświadczalne: 1/ starzenie replikacyjne, będące następstwem licznych podziałów komórek, 2/ starzenie wywołane promieniowaniem rentgenowskim oraz 3/ starzenie wywołane akumulacją prelaminy A.

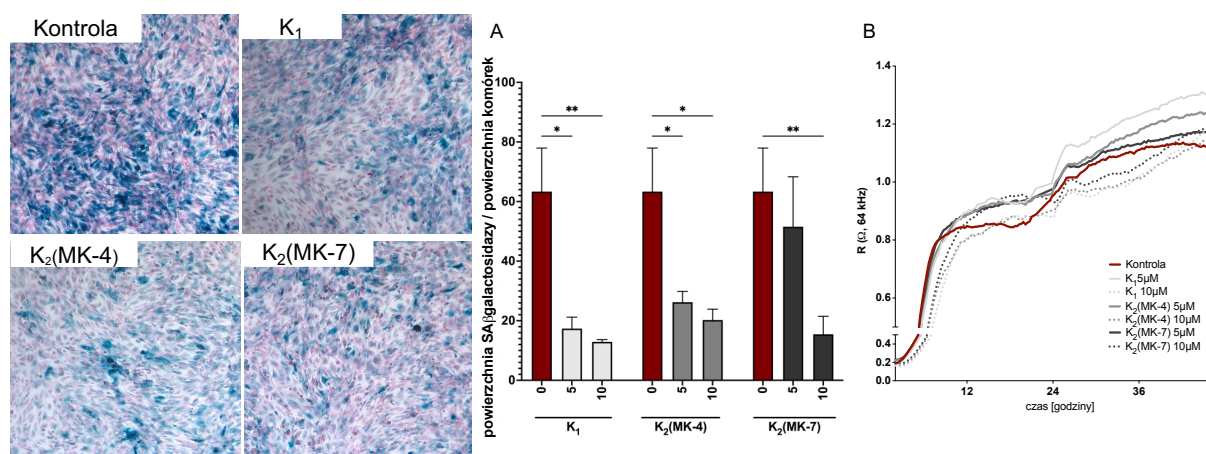
### **2.1 Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu replikacyjnego starzenia się komórek śródbłonka (PAEC) i komórek mięśniówki gładkiej (04/35F/11A)**

Replikacyjne starzenie się w komórkach śródbłonka PAEC i w komórkach mięśniówki gładkiej 04/35F/11A wywoływano poprzez długotrwałą hodowlę i kolejne pasażę komórek, a proces starzenia się komórek, monitorowano na podstawie aktywności β-galaktozydazy (SAβ-gal) oraz tempa ich proliferacji.

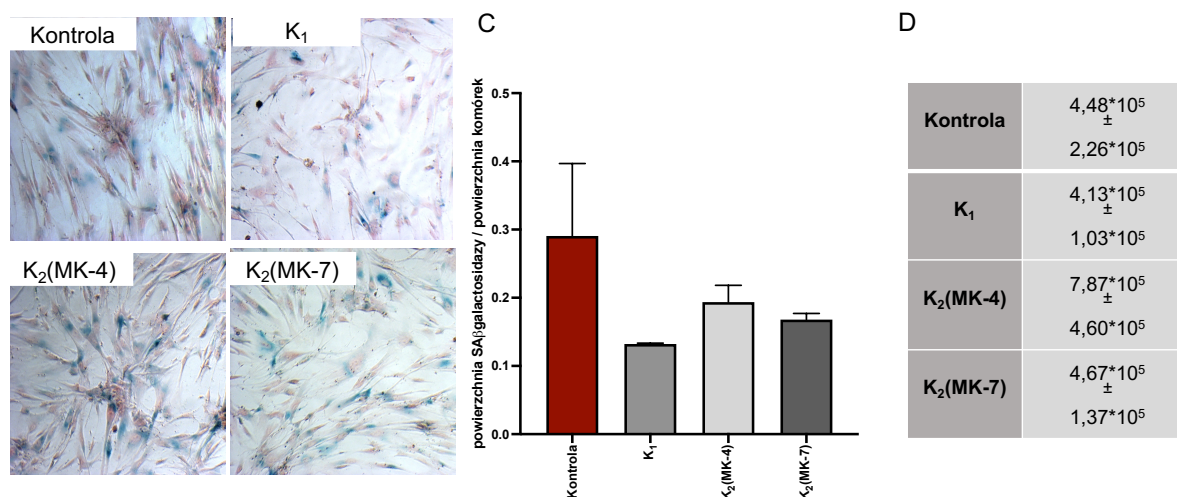
Po 48 godzinnej inkubacji starzejących się komórek PAEC z witaminą K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) lub K<sub>2</sub>(MK-7) (10 μM) odnotowano statystycznie istotne obniżenie aktywności SAβ-gal, wynoszące około 30% w stosunku do aktywności SAβ-gal w nietraktowanej kontroli (**Rycina 4 A**). Witamina K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) (5μM) hamowały aktywność SAβ-gal w podobnym stopniu. W przypadku wyższego stężenia (10μM) wszystkie badane witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7) hamowały aktywność SAβ-gal w podobnym stopniu wynoszącym około 70%. W przeciwieństwie do wyraźnego działania na aktywność SAβ-gal, żadna z badanych witamin: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7), ani w stężeniu 5μM ani 10μM nie zwiększała istotnie tempa proliferacji komórek w teście zarastania rany, po 48 godzinnej inkubacji (**Rycina 4 B**).

W modelu replikacyjnego starzenia się komórek mięśniówki gładkiej 04/35F/11A, 48 godzinna inkubacja z witaminą K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7) w stężeniu 10μM, obniżała aktywność SAβ-gal w podobnym stopniu, wynoszącym około 40-50% aktywności odnotowanej dla nietraktowanej kontroli (**Rycina 4 C**). Jednak, żadna z badanych witamin (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7), podobnie jak w przypadku komórek śródbłonka, nie miała istotnego wpływu na tempo proliferacji, który w tym przypadku było oceniane poprzez manualne zliczanie komórek za pomocą komory Bürkera (**Rycina 4 D**), (dla 04/35F/11A wykonano dwa niezależne powtórzenia biologiczne, dlatego nie zaznaczono istotności statystycznej).

## Replikacyjne starzenie się komórek PAEC



## Replikacyjne starzenie się komórek 04/35F/11A



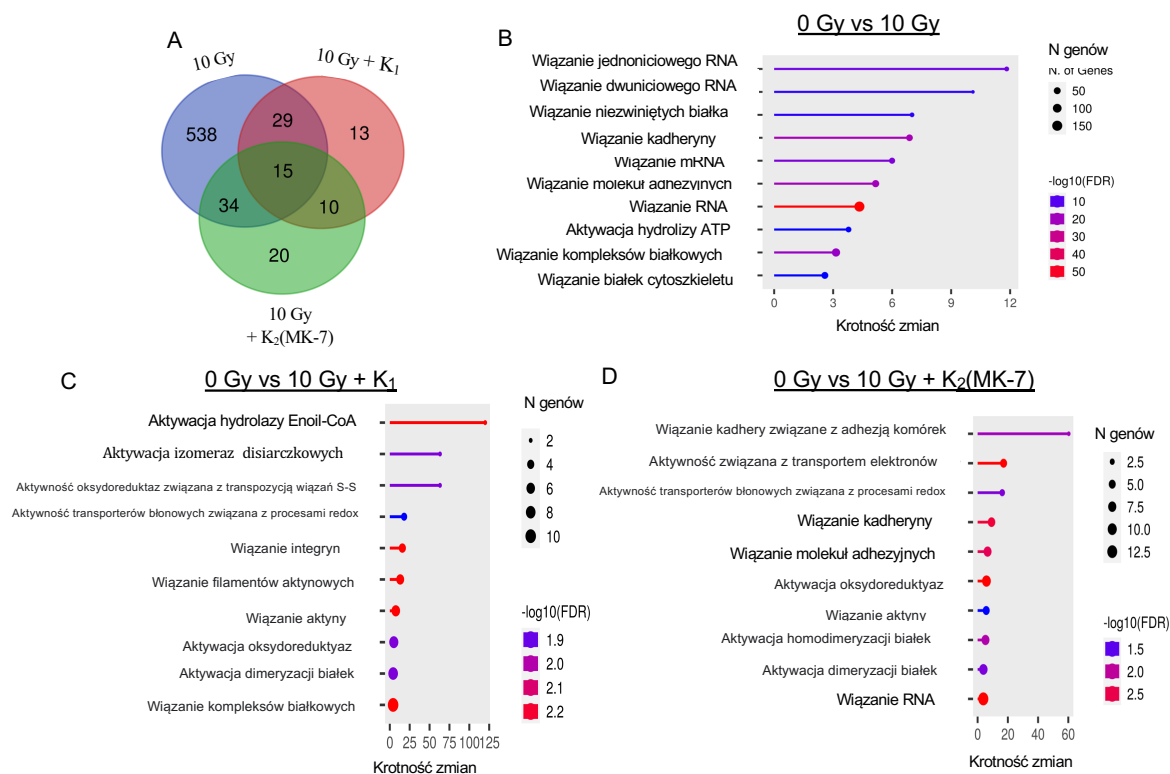
**Rycina 4.** Działanie senolityczne witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu replikacyjnego starzenia się komórek śródbłonka PAEC oraz w modelu replikacyjnego starzenia się komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia 04/35F/11A, oceniane na podstawie aktywności SAβ-gal oraz tempa proliferacji. Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na aktywność związanej ze starzeniem β-galaktozydazy (**A**) oraz proliferację komórek śródbłonka w teście zarastania rany (**B**) analizowano po 48 godzinach inkubacji z witaminą K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) lub K<sub>2</sub>(MK-7) (5 lub 10µM). Podobnie w replikacyjnym modelu starzenia się komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia 04/35F/11A, senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) lub K<sub>2</sub>(MK-7) (10µM) po 48 godzinach inkubacji oceniano na analizie proliferacji za pomocą manualnego zliczania liczby komórek (**C**) oraz analizę aktywności β-galaktozydazy (**D**). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Symbole \* i \*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05 i 0,01. Dla komórek mięśniówki wykonano 2 niezależne eksperymenty biologiczne, dlatego nie zaznaczono istotności statystycznej. (Pomiary ECIS wykonano we współpracy z Dr M. Stojak z JCET, Kraków).

## 2.2 Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu starzenia się komórek śródbłónka (HAEC) wywołanego promieniowaniem rentgenowskim

Starzenie się komórek HAEC wywołano poprzez uszkodzenie DNA, naświetlając komórki wiązką promieniowania rentgenowskiego o mocy 10 Gy. Po naświetleniu, monitorowano aktywność SA $\beta$ -gal w celu określenia czasu starzenia się komórek. Fenotyp komórek HAEC w modelu starzenia się wywołanego promieniowaniem rentgenowskim oceniono jako starzejący się po 10 dniach od momentu naświetlenia komórek, bowiem po takim czasie aktywność SA $\beta$ -gal była znacznie podwyższona (obserwowano 80-90% komórek SA $\beta$ -gal pozytywnych).

W modelu starzenia się wywoływanego przy użyciu promieniowania rentgenowskiego (10 Gy) w HAEC, po 10 dniach odnotowano zmianę profilu aż 616 białek (**Rycina 5 A**). Zidentyfikowano, że najwięcej białek można było przypisać zaangażowaniu w procesy takie jak: translacja, synteza i formowanie białek, adhezja i przebudowa cytoszkieletu (**Rycina 5 B**). Traktowanie komórek witaminą K<sub>1</sub> (5 $\mu$ M) przez 10 dni (10 Gy + K<sub>1</sub>) zmieniało profil 67 białek związanych z formowaniem, wiązaniem oraz aktywnością białek oraz organizacją cytoszkieletu (**Rycina 5 C**). Analogiczne traktowanie komórek naświetlonych witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) (5 $\mu$ M), (10 Gy + K<sub>2</sub>(MK-7)) zmieniało profil 79 białek związanych z adhezją komórek, transportem elektronów, wiązaniem aktyn, dimeryzacją białek oraz wiązaniem RNA (**Rycina 5 D**).

Zmiany ekspresji białek w modelu starzenia się komórek HAEC wywołanego promieniowaniem rentgenowskim



**Rycina 5. Zmiany ekspresji białek wywołane przez witaminę K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-7) w komórkach śródbłonka HAEC w modelu starzenia się komórek wywołanego przez promieniowanie rentgenowskie.** Diagram Venna (A) obrazuje liczbę białek, których ekspresja zmieniła się statystycznie istotnie w odpowiedzi na naświetlanie (10 Gy) -niebieski, oraz w odpowiedzi na traktowanie witaminą K<sub>1</sub> (10 Gy +K<sub>1</sub>) - czerwony lub witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) (10 Gy +K<sub>2</sub>(MK-7)) - zielony. Na schematach B-D przedstawiono procesy, którym przypisano najwięcej spośród różniących się białek, i które zmieniły się istotnie w naświetlonych komórkach (10 Gy) w stosunku do komórek nie naświetlanych 0 Gy (B) oraz w naświetlonych komórkach inkubowanych z witaminą K<sub>1</sub> (10 Gy +K<sub>1</sub>) (C) lub witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) (10 Gy +K<sub>2</sub>(MK-7)) (D), w porównaniu do nietraktowanych, naświetlanych, starzejących się komórek (10 Gy). Białka różniące się statystycznie istotnie zidentyfikowano przy pomocy programu Perseus z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań wielokrotnych Tukey'a i. (Analizę proteomiczną wykonano we współpracy z Dr A. Kurpińską z JCET, Kraków i Dr M. Pietrowską z CDNIO, Gliwice).

Listę 41 białek, których ekspresja zmieniła się istotnie statystycznie jedynie w komórkach, które po naświetlaniu inkubowano z witaminą K<sub>1</sub>, ale nie z witaminą K<sub>2</sub>(MK-7) przedstawiono w Tabeli 4. Białka, których ekspresja zmieniła się istotnie statystycznie jedynie w komórkach, które po naświetleniu inkubowano z witaminą K<sub>2</sub>(MK-7), ale nie z witaminą K<sub>1</sub> wymieniono w Tabeli 5. Lista obejmuje 52 białek. Natomiast listę 25 białek, regulowanych zarówno przez witaminę K<sub>1</sub> jak i witaminę K<sub>2</sub>(MK-7) w naświetlonych komórkach wymieniono w Tabeli 6.

Analiza funkcji białek, których ekspresja zmieniła się w odpowiedzi na traktowanie witaminą K<sub>1</sub> i/lub K<sub>2</sub>(MK-7) w naświetlonych komórkach, wykazała, że wiele z nich było zaangażowanych bezpośrednio lub pośrednio w regulację starzenia się komórek. Białka

zaangażowane w odpowiedź na uszkodzenie lub naprawę DNA zaznaczono niebieskim kółkiem. Białka związane z regulacją odpowiedzi na stres oksydacyjny zaznaczono zielonym kółkiem. Białka zaangażowane bezpośrednio w regulację starzenia się komórek zaznaczono kółkiem w kolorze fukcji (Tabela 4-6).

**Tabela 4. Lista białek, których ekspresja zmieniła się statystycznie istotnie w odpowiedzi na traktowanie komórek naświetlanych witaminą K<sub>1</sub> (10Gy+ K<sub>1</sub>), w porównaniu do starzejących się naświetlonych komórek nie traktowanych witaminą K<sub>1</sub> ani witaminą K<sub>2</sub>.** Tabela obejmuje wyłącznie białka, których ekspresja zmieniła się specyficznie w odpowiedzi na witaminę K<sub>1</sub>. Lista nie obejmuje białek, których ekspresja zmieniła się w zarówno pod wpływem witaminy K<sub>1</sub> jak i K<sub>2</sub>. (Analizę proteomiczną wykonano we współpracy z Dr A Kurpińską z JCET, Kraków i Dr M. Pietrowską z NIO PIB, Gliwice).

	Nazwa białka	ID Genu			
1	SPARC	SPARC	●	●	●
2	Gelsolin	AGEL	●	●	●
3	Protein disulfide-isomerase	P4HB	●	●	●
4	Peroxidasin homolog	PXDN	●	●	●
5	RNA-binding protein 3	RBM3	●	●	●
6	Alpha-actinin-4	ACTN4	●	●	●
7	Transaldolase	TALDO1	●	●	●
8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	PSMD14	●	●	●
9	Tubulin beta-4B chain	TUBB2C;TUBB4B	●	●	●
10	Interstitial collagenase;22 kDa interstitial collagenase;27 kDa interstitial collagenase	MMP1	●	●	●
11	Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6	●	●	
12	Prostaglandin Reductase 1	LTB4DH;PTGR1	●	●	
13	DNA damage-binding protein 1	DDB1	●	●	
14	Sorcin	SRI	●		●
15	CD59 glycoprotein	CD59	●		●
16	Phosphoserine phosphatase	PSPH		●	●
17	Nucleobindin-2;Nesfatin-1	NUCB2;Nucb2			●
18	Beta-2-microglobulin;Beta-2-microglobulin;	B2M			●
19	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1;HDJ2			●
20	Ubiquitin thioesterase OTUB1	OTUB1;DKFZp564E242			●
21	Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP			●
22	Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP	●		
23	Myeloid-associated differentiation marker	MYADM;hCG_1640809	●		
24	Myosin regulatory light chain 12A;Myosin regulatory light chain 12B	MYL12A;MYL12B	●		
25	Serine hydroxymethyltransferase;Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHMT2;HEL-S-51e;DKFZp686P09201	●		
26	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	●		
27	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5	●		
28	RNA-binding protein 12B	RBM12B	●		
29	Annexin;Annexin A5	HEL-S-7;ANXA5	●		
30	39S ribosomal protein L39, mitochondrial	MRPL39	●		

**Tabela 4. Ciąg dalszy.**

	<b>Nazwa białka</b>	<b>ID Genu</b>			
31	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL	•		
32	Dihydrolipoyl dehydrogenase;Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLD		•	
33	Septin-9	SEPT9		•	
34	Importin subunit alpha;Importin subunit alpha-1	KPNA2		•	
35	Solute carrier family 35 member F6	C2orf18;SLC35F6		•	
36	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	UQCRQ		•	
37	Fructose-bisphosphate aldolase;Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC			
38	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1			
39	Beta-centractin	ACTR1B			
40	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUFB4			
41	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	SLC25A13			

**Tabela 5. Lista białek, których ekspresja zmieniła się statystycznie istotnie w odpowiedzi na traktowanie witaminą K<sub>2</sub> (10Gy+ K<sub>2</sub>(MK-7)) w porównaniu do starzejących się naświetlonych komórek (10Gy) nie traktowanych witaminą K<sub>1</sub> ani witaminą K<sub>2</sub>. Tabela obejmuje wyłącznie białka, których ekspresja zmieniła się specyficznie w odpowiedzi na witaminę K<sub>2</sub>(MK-7). Lista nie obejmuje białek, których ekspresja zmieniła się w zarówno pod wpływem witaminy K<sub>1</sub> jak i K<sub>2</sub>. (Analizę proteomiczną wykonano we współpracy z Dr A. Kurpińską z JCET, Kraków i Dr M. Pietrowską z NIO PIB, Gliwice).**

	<b>Nazwa białka</b>	<b>ID Genu</b>			
1	Ferritin;Ferritin heavy chain;Ferritin heavy chain, N-terminally processed	FTH1	●	●	●
2	DNA helicase;DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	●	●	●
3	60S ribosomal protein L13	RPL13	●	●	●
4	PDZ and LIM domain protein 1	HEL-S-112;PDLIM1	●	●	●
5	Ezrin	EZR;HEL-S-105	●	●	●
6	Filamin-A	FLNA	●	●	●
7	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta;Signal transducer and activator of transcription	STAT1	●	●	●
8	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	ASPH	●	●	●
9	Calponin-3;Calponin	CNN3	●	●	●
10	Zyxin	ZYX	●	●	●
11	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	LPCAT2	●	●	●
12	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	SAMHD1	●	●	●
13	Hexokinase;Hexokinase-1	HK1	●	●	●
14	Galectin;Galectin-3	LGALS3;hCG_22119	●	●	●
15	Aminopeptidase N	ANPEP	●	●	●
16	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	●	●	●
17	Glutaredoxin-3	GLRX3	●	●	●
18	Cathepsin D;Cathepsin D light chain;Cathepsin D heavy chain	HEL-S-130P;CTSD	●	●	●
19	Thioredoxin	TXN	●	●	●
20	Histone H2A.V;Histone H2A.Z;Histone H2A	H2AFV;H2AFZ	●	●	●
21	Actin-modulator 2	B7Z992			
22	Malate dehydrogenase;Malate dehydrogenase, cytoplasmic	HEL-S-32;MDH1		●	●
23	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1		●	●
24	40S ribosomal protein S8	RPS8	●		●
25	HLA class I histocompatibility antigen, B-41 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-49 alpha chain	HLA-B;HLA-B41	●		●
26	Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial	LACTB	●		●

**Tabela 5. Ciąg dalszy**

	<b>Nazwa białka</b>	<b>ID Genu</b>			
27	Putative phospholipase B-like 2;Putative phospholipase B-like 2 32 kDa form;Putative phospholipase B-like 2 45 kDa form	PLBD2	●		●
28	Oligoribonuclease, mitochondrial	REXO2	●		
29	60S ribosomal protein L21	RPL21	●		
30	60S ribosomal protein L23	RPL23	●		
31	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2	●		
32	Glia maturation factor gamma	GMFG	●		
33	Glutathione S-transferase omega-1	HEL-S-21;GSTO1	●		
34	Proteasome subunit beta type-3	PSMB3	●		
35	60S ribosomal protein L27	RPL27		●	
36	60S ribosomal protein L29	RPL29		●	
37	60S ribosomal protein L4	RPL4		●	
38	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	SLC25A24		●	
39	Adenylyl cyclase-associated protein;Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1		●	
40	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3;DKFZp586K0821		●	
41	MICOS complex subunit MIC60	IMMT		●	
42	EH domain-containing protein 4	EHD4			●
43	Beta-hexosaminidase;Beta-hexosaminidase subunit beta;Beta-hexosaminidase subunit beta chain B;Beta-hexosaminidase subunit beta chain A	HEXB			●
44	Alpha-mannosidase;Lysosomal alpha-mannosidase A peptide;Lysosomal alpha-mannosidase B peptide;Lysosomal alpha-mannosidase C peptide;Lysosomal alpha-mannosidase D peptide;Lysosomal alpha-mannosidase E peptide	MAN2B1			●
45	Pentraxin-related protein PTX3	PTX3			●
46	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1;EPFP1			
47	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	PAFAH1B3			
48	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1;Glucosamine-6-phosphate isomerase	GNPDA1			
49	Transcription elongation factor B polypeptide 2	TCEB2			
50	Niemann-Pick C1 protein	NPC1			
51	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA			
52	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;	UQCRFS1;UQCRFS1P1			



**Tabela 6.** Lista białek, których ekspresja zmieniła się statystycznie istotnie zarówno w odpowiedzi na traktowanie witaminą K<sub>1</sub> (10Gy+ K<sub>1</sub>), jak i w odpowiedzi na traktowanie witaminą K<sub>2</sub> (10Gy+ K<sub>2</sub>(MK-7)), w porównaniu do naświetlonych, starzejących się, komórek (10Gy) nie traktowanych witaminą K<sub>1</sub> ani K<sub>2</sub>. (Analizę proteomiczną wykonano we współpracy z Dr A. Kurpińską z JCET, Kraków i Dr M. Pietrowską z NIO PIB, Gliwice).

	Nazwa białka	ID Genu			
1	Actin-related protein 2	ACTR2	●	●	●
2	Dipeptidyl peptidase 2	DPP2	●	●	●
3	Major vault protein	MVP	●	●	●
4	Thrombospondin-1	THBS1	●	●	●
5	HLA class I histocompatibility antigen, B-41 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen,	HLA-B;HLA-B41	●	●	●
6	DnaJ homolog subfamily B member 4	DNAJB4	●	●	
7	Cytosol aminopeptidase	HEL-S-106;LAP3		●	●
8	Prohibitin-2	PHB2		●	●
9	Myosin-9	MYH9	●		●
10	Protein NDRG1	TRG14;NDRG1	●		●
11	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	●		
12	Proteasome subunit alpha type; Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	●		
13	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	DKFZp686E12166;GNS		●	
14	Glycine--tRNA ligase	GARS		●	
15	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	HEL-S-55;PRDX5		●	
16	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3			●
17	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	NDUFB9;DKFZp566O173			●
18	Luc7-like protein 3	CROP;LUC7L3			
19	Fatty acid-binding protein, adipocyte	FABP4			
20	PDZ and LIM domain protein 5	PDLIM5;LIM			
21	60S ribosomal protein L38	RPL38			
22	Selenide, water dikinase 1	SEPHS1			
23	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial;3-ketoacyl-CoA thiolase	HADHB			
24	Protein AHNAK2	AHNAK2			
25	Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic	LARS			

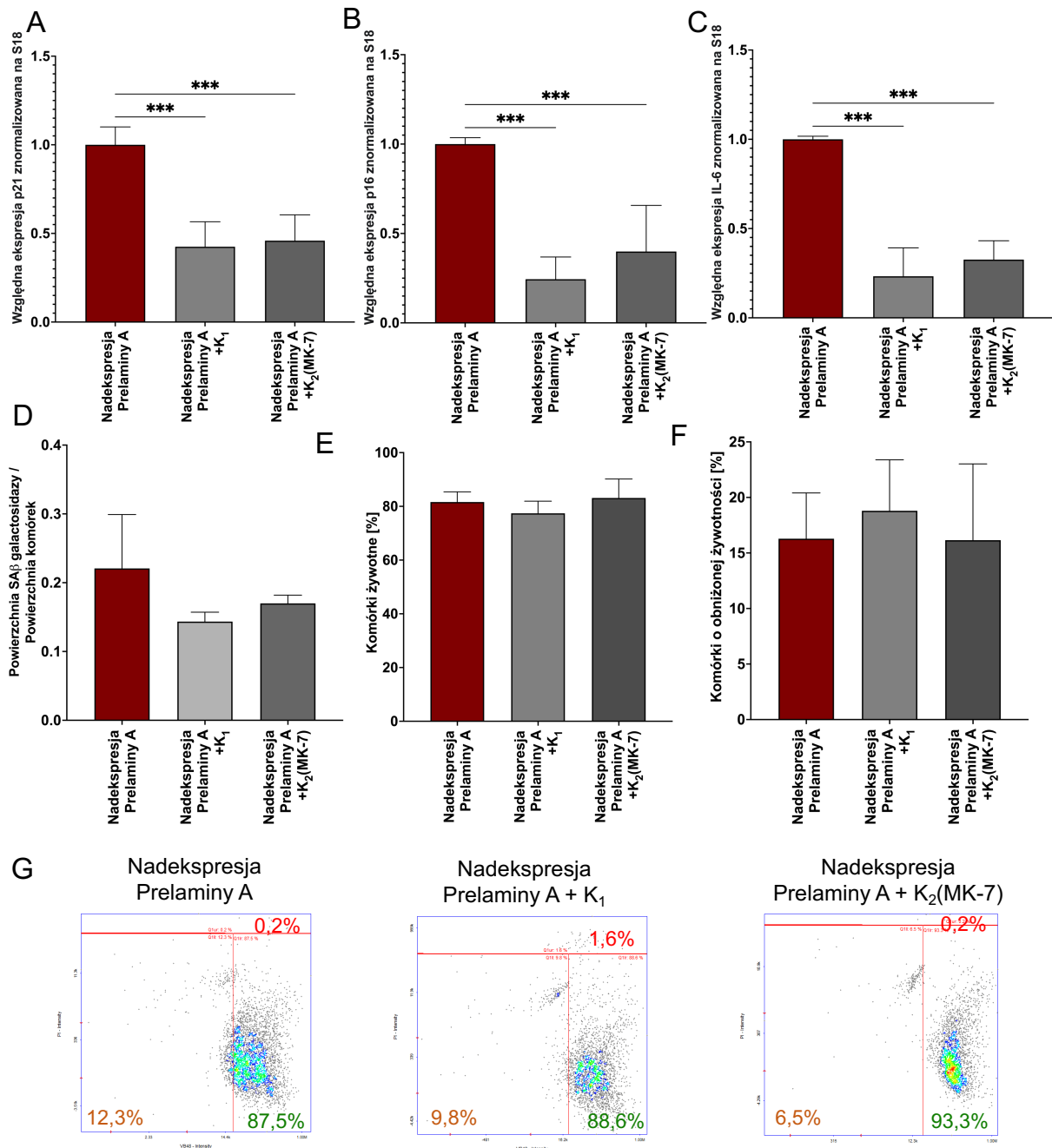
Podsumowując, analiza proteomiczna wykazała, że większość białek, dla których odnotowano istotne statystycznie zmiany w odpowiedzi na traktowanie witaminą K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub>(MK-7) w stosunku do starzejących się, naświetlonych HAEC (10 Gy) w modelu starzenia się wywołanego przez promieniowanie rentgenowskie, były bezpośrednio związane z regulacją procesu starzenia się komórek, lub związane z odpowiedzią na uszkodzenie DNA lub regulacją stresu oksydacyjnego, związane ze starzeniem się komórek (**Tabele 4-6**).

2.3 Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu starzenia się komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia (04/35F/11A), u których starzenie się wywołano gromadzeniem prelaminy A

W celu wywołania starzenia się komórek związanego z akumulacją prelaminy A w komórkach 04/35F/11A, stosowano dwa protokoły, w zależności od dalszego przeznaczenia komórek; 1/ transfekcję komórek przy użyciu wektora adenowirusowego, skutkującej nadekspresją prelaminy A, 2/ wyciszenie ekspresji białka FACE-1 przy pomocy siRNA, uniemożliwiając dojrzewanie prelaminy A i powodując w konsekwencji jej akumulację. Proces starzenia się komórek monitorowano poprzez analizę aktywności SA $\beta$ -gal i zmianę ekspresji genów związanych ze starzeniem (p16, p21, IL-6).

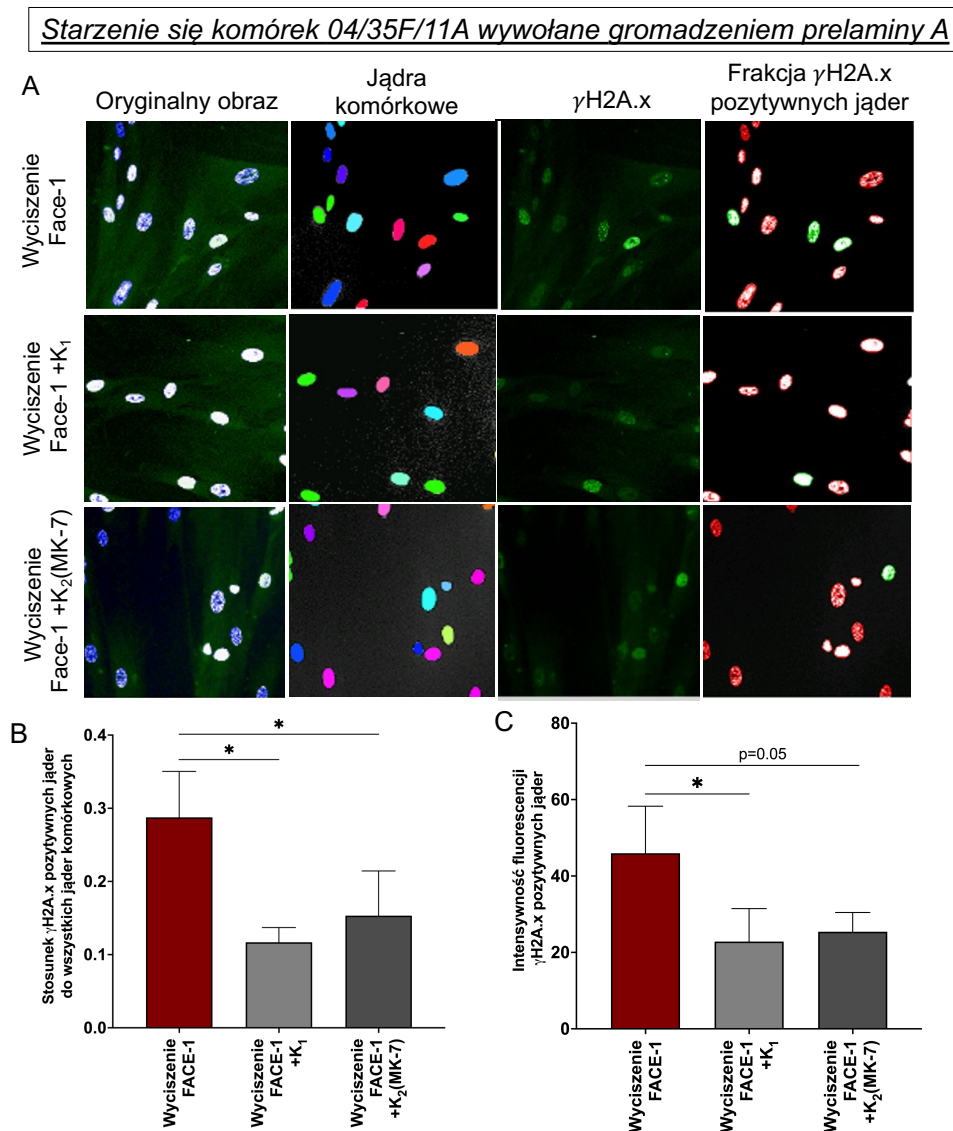
W modelu starzenia się wywołanego gromadzeniem się prelaminy A w komórkach 04/35F/11A, po 48 godzinach inkubacji zarówno z witaminą K<sub>1</sub>, jak i K<sub>2</sub>(MK-7) odnotowano obniżenie ekspresji genów związanych ze starzeniem się komórek, takich jak: p21 (**Rycina 6 A**), p16 (**Rycina 6 B**), oraz IL-6 (**Rycina 6 C**). Witamina K<sub>1</sub> oraz witamina K<sub>2</sub>(MK-7), miały także tendencje do hamowania aktywności SA $\beta$ -gal, jednak w żadnym przypadku nie osiągnięto istotności statystycznej (**Rycina 6 D**). Inkubacja komórek 04/35F/11A z witaminami K<sub>1</sub> jak i K<sub>2</sub>(MK-7) przez 48 godzin po transfekcji, nie miała bezpośredniego wpływu na żywotność komórek (**Rycina 6 E-G**).

## Starzenie się komórek 04/35F/11A wywołane gromadzeniem Prelaminy A



**Rycina 6.** Działanie senolitycznej witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu starzenia się komórek mięśniówki gładkiej 04/35F/11A, wywołanego gromadzeniem Prelaminy A, oceniane na podstawie zmian ekspresji genów związanych ze starzeniem się komórek p21, p16 i IL-6, aktywności SAβ gal a także żywotności komórek. Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-7) na starzenie się komórek z nadekspresją Prelaminy A oceniono na podstawie zmian ekspresji genów związanych ze starzeniem: p21(A), p16 (B), IL-6 (C) oraz aktywności SAβgal (D). Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-7) na żywotność komórek 04/35F/11A (E-G) oceniono na podstawie intensywności fluorescencji VB-48 zgodnie z protokołem opisanym w Materiałach i metodach. Bramkowanie dla wszystkich pomiarów cytometrycznych wyznaczono analogicznie jak na reprezentatywnych obrazach (G). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Symbol \*\*\* oznacza istotność statystyczną, przy p < 0.001. (Opracowanie metodologii nadekspresji Prelaminy A we współpracy z dr A. Cobb z KCL, Londyn)

Akumulacja prelaminy A w komórkach 04/35F/11A wywołana wyciszeniem ekspresji FACE-1 (niezbędnego w procesie dojrzewania prelaminy A) korelowała z wysokim odsetkiem jąder komórkowych z wysoką ekspresją fosforylowanego histonu  $\gamma$ H2A.x (**Rycina 7 A, B**), związaną z uszkodzeniem DNA [100,101] i wysoką ekspresją  $\gamma$ H2A.x, mierzoną jako intensywność fluorescencji  $\gamma$ H2A.x-immunopozytywnych jąder (**Rycina 7 C**). Inkubacja transfekowanych komórek z witaminą K<sub>1</sub> obniżała ilość  $\gamma$ H2A.x-immunopozytywnych w podobnym stopniu do działania witaminy K<sub>2</sub> wynoszącym około 50% poziomu ekspresji dla kontroli (komórek z wyciszeniem FACE-1 nie traktowanych witaminami) (**Rycina 7 B, C**).



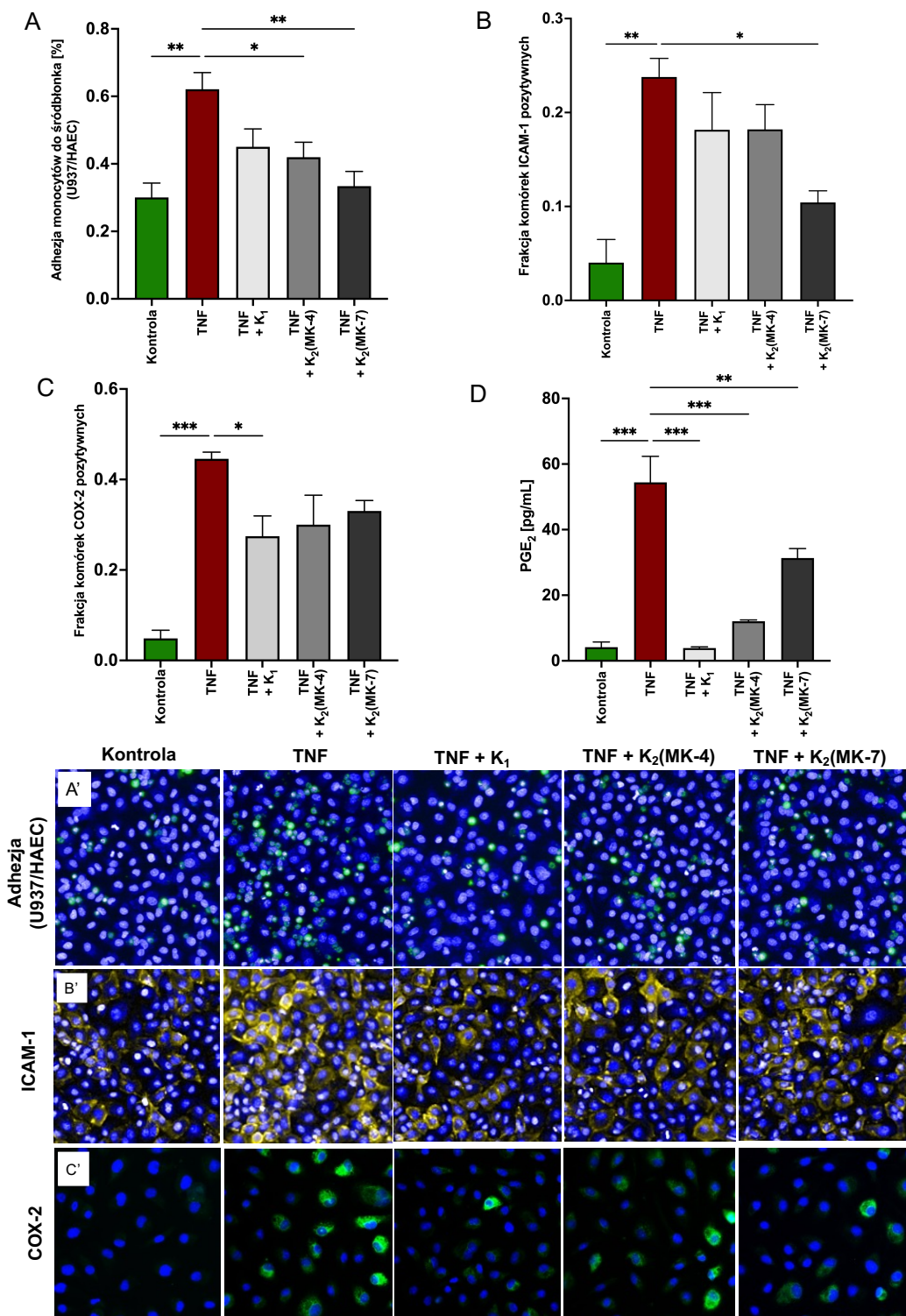
**Rycina 7. Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na hamowanie uszkodzenia DNA w modelu starzenia się komórek mięśniówki gładkiej 04/35F/11A, wywołanego gromadzeniem prelaminy A, oceniany na podstawie ekspresji fosforylowanego histonu  $\gamma$ H2A.x.** Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na uszkodzenie DNA oszacowano na podstawie ekspresji  $\gamma$ H2A.x analizowanej immunofluorescencyjnie (**A**) poprzez zliczenie immunopozytywnych jąder komórkowych (**B**), i analizę intensywności fluorescencji tych jąder (**C**). Działanie algorytmu przedstawiono na reprezentatywnych obrazach (**A**). Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD n=3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Symbol \* oznacza istotność statystyczną, przy  $p < 0.05$ .

### **3. Mechanizmy naczynioprotekcyjne witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>; działanie przeciwzapalne**

W celu oceny przeciwzapalnego działania witaminy K<sub>1</sub> oraz witaminy K<sub>2</sub> przeanalizowano wpływ witaminy K w dwóch modelach zapalenia: w komórkach śródbłonka HAEC w których stan zapalny wywołano przy użyciu TNF oraz w komórkach makrofagów RAW 264.7, w których stan zapalny wywołano przez podanie LPS.

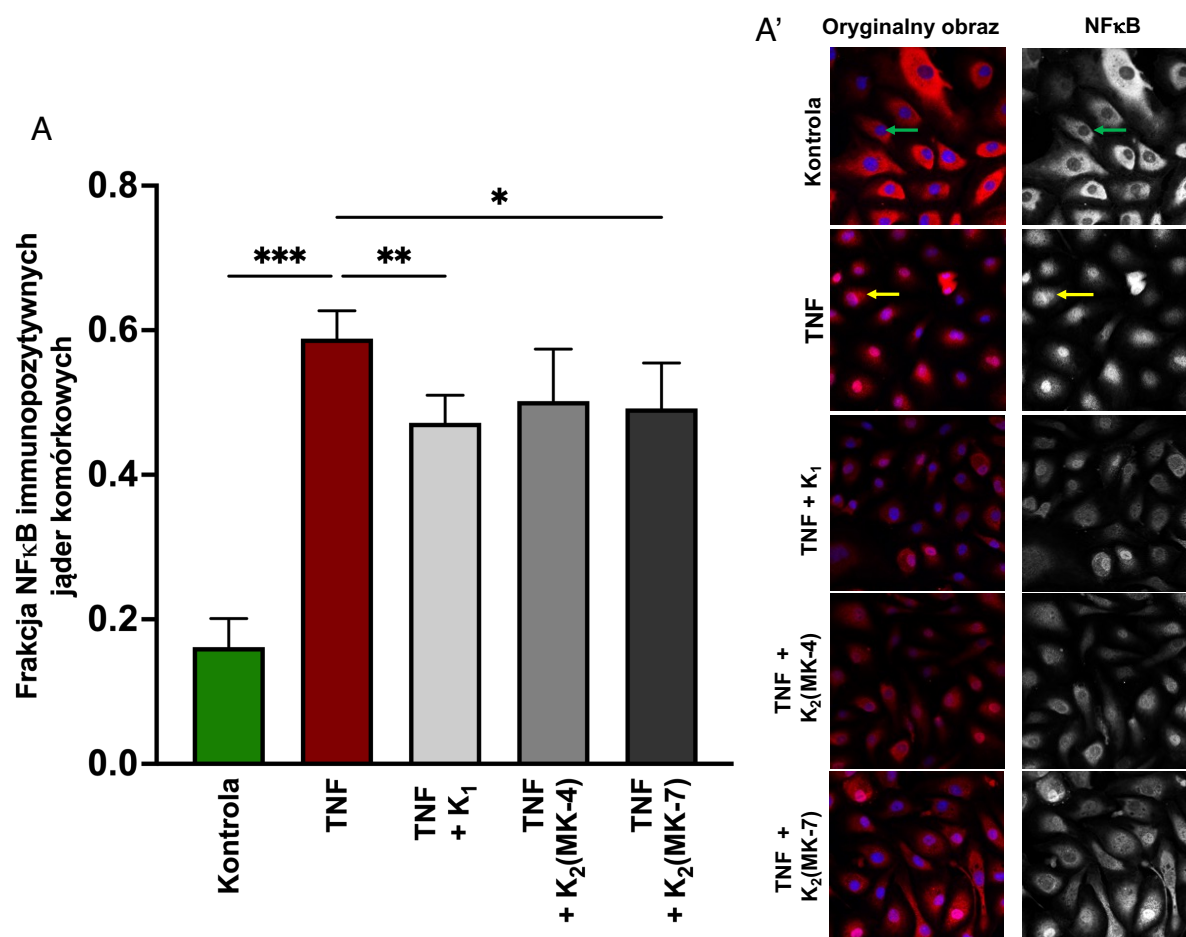
#### **3.1 Przeciwzapalne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w komórkach śródbłonka (HAEC)**

W komórkach śródbłonka (HAEC), gdzie zapalenie wywoływano przy użyciu TNF (24 godzinna inkubacja, stężenie TNF 1ng / mL), witaminą K<sub>1</sub> oraz witamina K<sub>2</sub>: K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7) (10μM) hamowały adhezję monocytów do śródbłonka stymulowanego prozapalnie przez TNF oraz hamowały również ekspresję molekuly adhezyjnej, ICAM-1 (po 48 godzinnej inkubacji obejmującej 24 godzinną preinkubację przed TNF oraz 24 godzinną inkubację razem z TNF), **(Rycina 8 A, B)**. Ekspresja COX-2 i produkcja PGE<sub>2</sub> wywołane przez TNF, również były hamowane przez witaminę K<sub>1</sub> oraz przez witaminę K<sub>2</sub>. W tym przypadku nieco silniejszy efekt odnotowano dla witaminy K<sub>1</sub> obniżającej produkcję PGE<sub>2</sub> do poziomu kontroli, podczas gdy witamina K<sub>2</sub>(MK-4) obniżała wywołaną TNF produkcję PGE<sub>2</sub> o około 70% a witamina K<sub>2</sub>(MK-7) o około 50% **(Rycina 8 C, D)**.



**Rycina 8. Działanie przeciwzapalne witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w ludzkich komórkach śródbłonnka (HAEC) stymulowanych prozapalnie przez TNF, oceniane na podstawie analizy adhezji monocytów do aktywowanego prozapalnie śródbłonnka, ekspresji ICAM-1 i COX-2 oraz produkcji PGE<sub>2</sub>. Przeciwzapalne działanie witaminy K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4), i K<sub>2</sub>(MK-7) określono poprzez zbadanie wpływu na hamowanie adhezji monocytów do aktywowanego zapalnie śródbłonnka (A i A'), hamowanie ekspresji ICAM-1 (B i B') i COX-2 (C i C') a także hamowanie produkcji PGE<sub>2</sub> (D). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta w odniesieniu do stymulowanej prozapalnie kontroli. Wyniki zostały przedstawione jako średnie SEM z 3 niezależnych eksperymentów biologicznych obejmujących co najmniej 3 powtórzenia techniczne. Symbole \*,\*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05; 0,01 i 0,001. (Analizę adhezji monocytów wykonano we współpracy z Dr M. Grosickim z JCET, Kraków)**

Prozapalna stymulacja komórek śródbłonna przez TNF (1ng/mL) wywołała około 3-krotny wzrost poziomu translokacji jądrowej czynnika transkrypcyjnego NFκB. Wszystkie badane formy witaminy K: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) i K<sub>2</sub>(MK-7) hamowały w podobnym, stopniu aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB ocenianą na podstawie jego jądrowej translokacji (**Rycina 9**), przy czym istotność statystyczną odnotowano dla witamin K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-7).

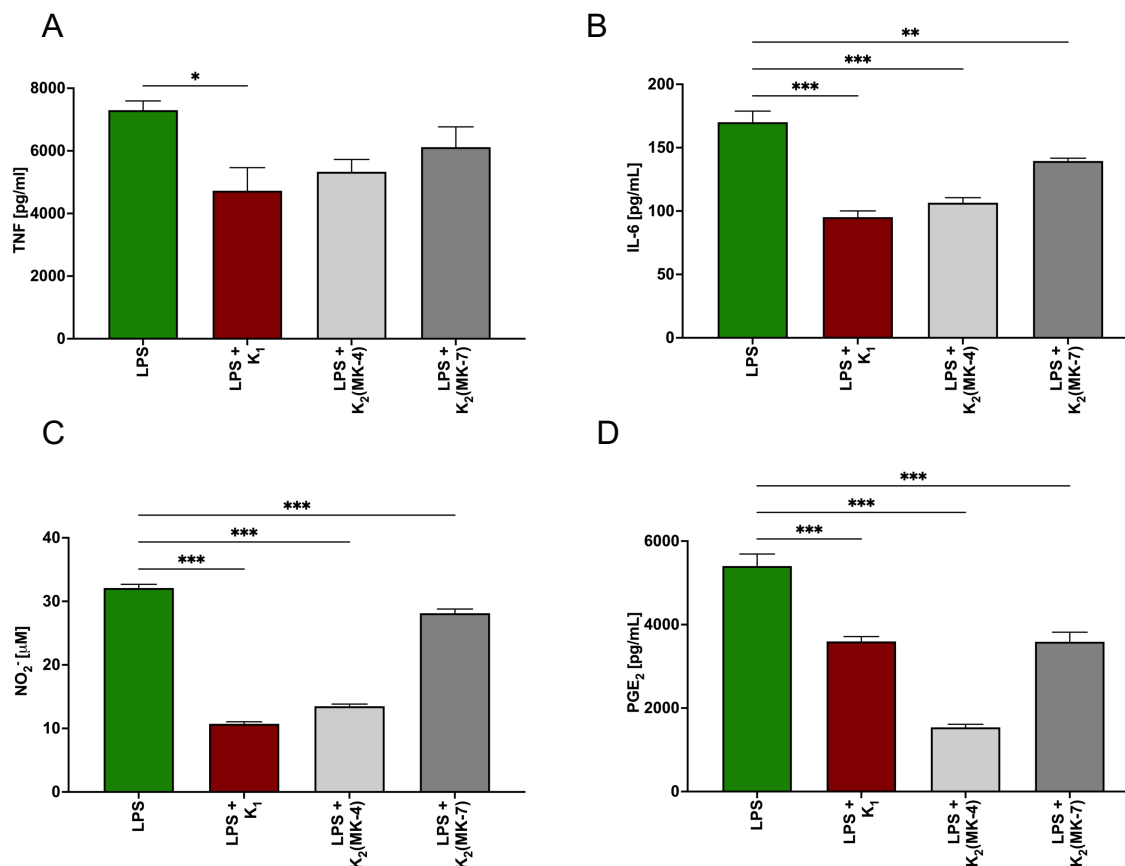


**Rycina 9.** Wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na aktywność czynnika transkrypcyjnego NFκB w komórkach śródbłonna (HAEC) stymulowanych prozapalnie przy użyciu TNF, oceniany immunocytochemicznie na podstawie translokacji jądrowej NFκB. Translokację jądrową czynnika transkrypcyjnego NFκB (A i A') określono poprzez zliczenie NFκB immunopozytywnych jąder komórkowych (żółta strzałka) w stosunku do liczby wszystkich jąder komórkowych (zielona strzałka). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Symbole \*,\*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05; 0,01 i 0,001.

### 3.2 Przeciwwzapalne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w makrofagach (RAW 264.7)

W makrofagach RAW 264.7, w których stan zapalny wywołano przy użyciu LPS (1 ng/mL), obserwowano istotnie statystycznie hamowanie produkcji TNF w odpowiedzi na witaminę K<sub>1</sub> i nieznaczne hamowanie produkcji TNF przez witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) oraz K<sub>2</sub>(MK-7) (**Rycina 10 A**). Inna cytokina prozapalna IL-6 (**Rycina 10 B**), a także NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (**Rycina**

**10 C)** i prostaglandyna PGE<sub>2</sub> (**Rycina 10 D**) były istotnie statystycznie hamowane przez wszystkie badane witaminy: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>(MK-4) oraz K<sub>2</sub>(MK-7) [12].



**Rycina 10. Działanie przeciwzapalne witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w mysich makrofagach RAW 264.7 stymulowanych prozapalnie przez LPS, oceniane na podstawie poziomu TNF, IL-6, (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) oraz PGE<sub>2</sub> w pożywce pochodowlanej.** Przeciwzapalne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>: K<sub>2</sub>(MK-4), K<sub>2</sub>(MK-7) określono poprzez ocenę hamowania produkcji cytokin prozapalnych: TNF (A), IL-6 (B), syntezy NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (C) oraz produkcji PGE<sub>2</sub> (D) przez makrofagi stymulowane prozapalnie LPS (1 ng/mL). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=3. Symbole \*,\*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05 ; 0,01 i 0,001. (Oznaczenia stężenia eikozanoidów metodą UHPLC-APCI-MS/MS wykonano we współpracy z Dr A .Kij z JCET, Kraków). Rycina na podstawie A. Kieronska-Rudek i wsp., 2021; zmodyfikowano [12].

#### 4. Naczyniowe skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> i odwrócenia niedoboru witaminy K<sub>1</sub> u myszy z normolipidemią C57BL/6J oraz u myszy E3L.CETP z dyslipidemią.

W celu zbadania wpływu niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonna, myszy C57BL/6J oraz myszy E3L.CETP żywiono przez 5 lub 10 tygodni dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub>-AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>). Grupy kontrolne stanowiły zwierzęta żywione dietami zaspokajającymi codzienne zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub>: AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) oraz AIN-93M(+K<sub>1</sub>). Dwie grupy kontrole miały na celu potwierdzenie wyłącznego wpływu



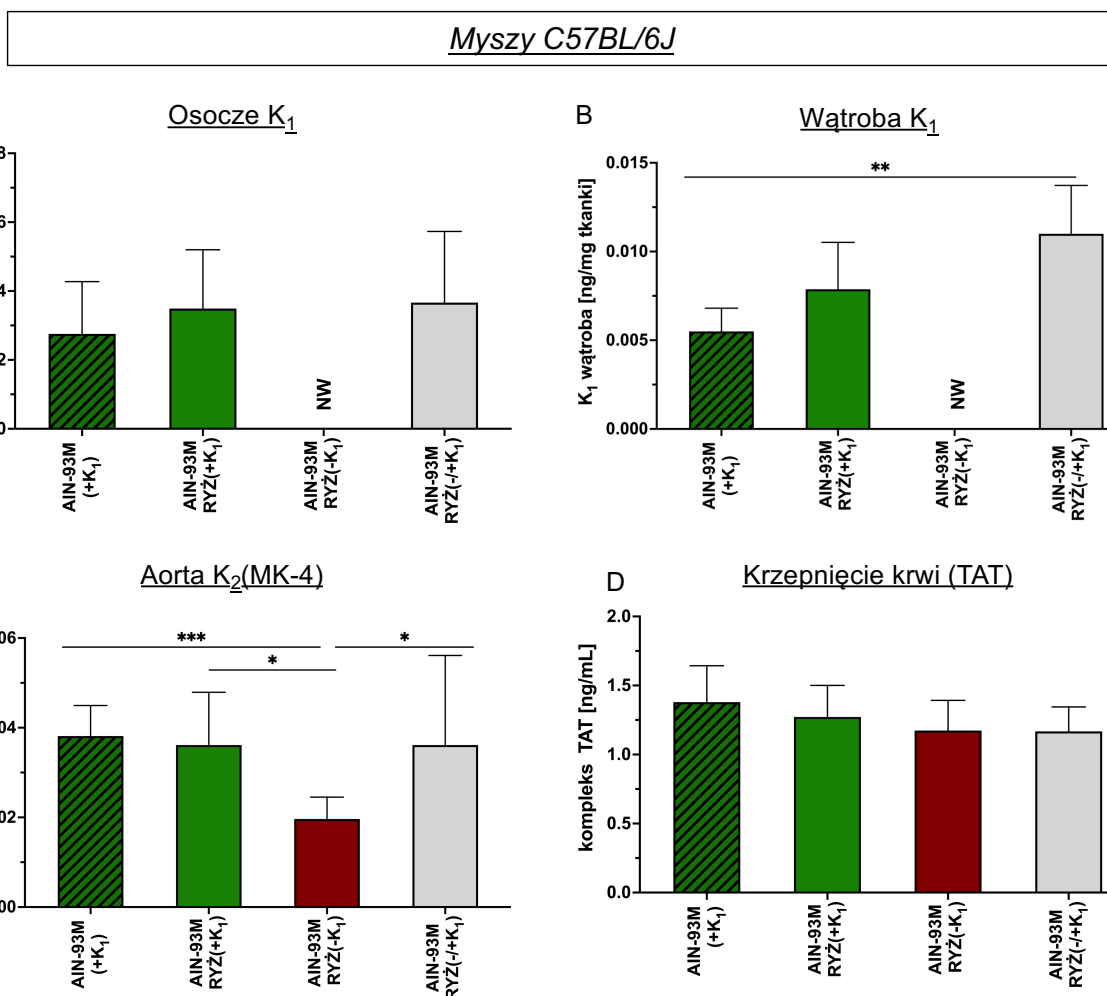
zawartości witaminy K<sub>1</sub> i wykluczenie wpływu zmiany innych składników diety takich jak źródło tłuszczu i białka na czynność śródbłonka.

W celu określenia czy skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonka można odwrócić poprzez uzupełnienie niedoboru tej witaminy, myszy C57BL/6J po 5 tygodniach żywienia dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)), przez kolejne 5 tygodni otrzymywały dietę zaspokajającą zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub>: AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>). Po 10 tygodniach żywienia we wszystkich wyżej wymienionych grupach doświadczalnych zmierzono poziomy witaminy K<sub>1</sub> i endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w osoczu, wątrobie i aorcie oraz zbadano czynność śródbłonka *in vivo* za pomocą MRI.

#### 4.1 Naczyniowe skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> i odwrócenia niedoboru witaminy K<sub>1</sub>: analiza poziomów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) w narządach oraz wpływ na parametry układu krzepnięcia u myszy z normolipidemią C57BL/6J oraz u myszy z dyslipidemią E3L.CETP

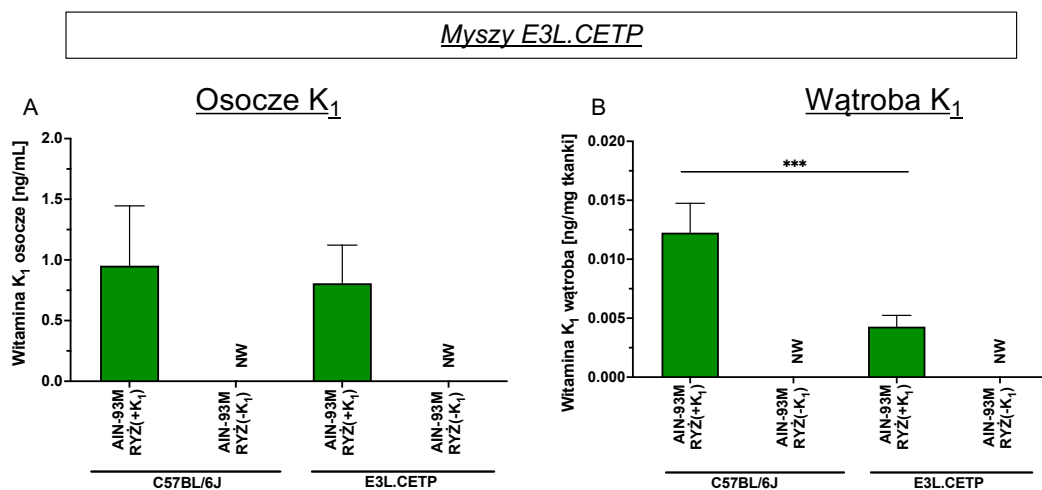
Żywienie myszy dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> - AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) obniżyło poziom witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie (**Rycina 11 A**) i w osoczu (**Rycina 11 B**) poniżej progu oznaczalności stosowanej metody. Poziomy witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w osoczu i wątrobie nie były wykrywalne w żadnej grupie doświadczalnej.

W aorcie, poziom witaminy K<sub>1</sub> nie był wykrywalny w żadnej z grup doświadczalnych, niezależnie od zawartości witaminy K<sub>1</sub> w diecie. Główną formą witaminy K obecną w aorcie była witamina K<sub>2</sub>(MK-4), a niedobór witaminy K<sub>1</sub> obniżał jej zawartość w aorcie (**Rycina 11 C**). Obniżone poziomy witaminy K<sub>1</sub> w osoczu i wątrobie oraz obniżony poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w aorcie u myszy żywionych dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> zostały całkowicie przywrócone do poziomów kontrolnych po 5 tygodniach żywienia dietą zaspokajającą dzienne zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>)) (**Rycina 11 A-C**). Dziesięć tygodni żywienia dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> pozostawało bez wpływu na aktywności trombiny, na co wskazuje niezmiennione stężenie kompleksu TAT w osoczu (**Rycina 11 D**).



**Rycina 11.** Skutki żywienia dietą ubogą w witaminę  $K_1$ , oceniane na podstawie pomiaru poziomu witaminy  $K_1$  w osoczu i wątrobie, poziomu witaminy  $K_2$ (MK-4) w aorcie oraz pomiar stężenia TAT u myszy C57BL/J6. Stężenie witaminy  $K_1$  zmierzono w osoczu (A), wątrobie (B) i aorcie (stężenie poniżej progu oznaczalności). Stężenie witaminy  $K_2$ (MK-4) również oznaczono w osoczu (stężenie poniżej progu oznaczalności), wątrobie (stężenie poniżej progu oznaczalności) i aorcie (C). Aktywność układu krzepnięcia oceniono na podstawie stężenia kompleksu TAT (D). Pomiaru wykonano po 10 tygodniach żywienia dietą AIN-93M(+K) (zielono-czarne słupki), AIN-93M RYZ(+K) (zielone słupki), AIN-93M RYZ(-K) (czerwone słupki) AIN-93M RYZ(-K)/AIN-93M RYZ(+K) 5 tyg/5 tyg (szare słupki). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  95% CI n=5-8. Symbole \*,\*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy  $p < 0,05$  ; 0,01 i 0,001. NW – poziom niewykrywalny (Pomiary poziomu witaminy K metodą UHPLC-APCI-MS/MS oraz oznaczenia TAT wykonano we współpracy z Dr A. Kij z JCET, Kraków)

Podobnie jak u myszy C57BL/6J, również u myszy E3L.CETP żywienie dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> – AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>), wywołało spadek stężenia witaminy K<sub>1</sub> w osoczu (**Rycina 12 A**) oraz w wątrobie (**Rycina 12 B**) poniżej progu oznaczalności.



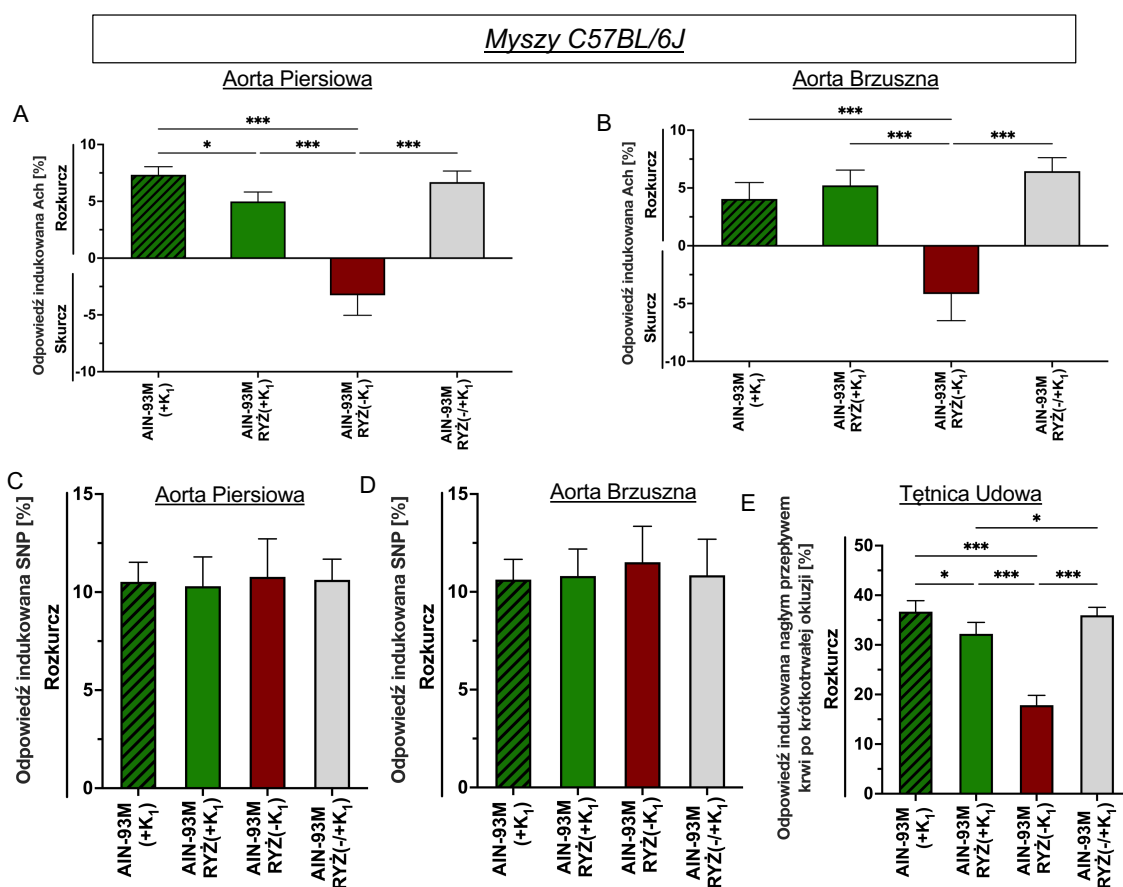
**Rycina 12.** Skutki żywienia dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> u myszy z dyslipidemią (E3L.CETP), oceniane poprzez pomiar poziomu witaminy K<sub>1</sub> w osoczu i wątrobie. Efekt żywienia dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> u myszy z dyslipidemią E3L.CETP w porównaniu do myszy z normolipideemią C57BL/6J oceniano jako poziom K<sub>1</sub> w osoczu (A) i wątrobie (B) żywionych przez 10 tygodni dietą kontrolną AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) (zielone słupki) lub dietą ubogą w witaminę K AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) (poziomy niewykrywalny). Wyniki przedstawiono jako średnią ± 95% CI n=5-8. Symbol \*\*\* oznacza istotność statystyczną odpowiedni przy p <0,001; NW- poziom niewykrywalny. (Pomiary poziomu witaminy K metodą UHPLC-APCI-MS/MS wykonane we współpracy z Dr A. Kij z JCET, Kraków).

#### 4.2 Naczyniowe skutki niedoboru witaminy K<sub>1</sub> i odwrócenia niedoboru witaminy K<sub>1</sub>; badanie czynności śródbłonna *in vivo* u myszy z normolipidemią C57BL/6J oraz u myszy z dyslipidemią E3L.CETP

Myszy karmione dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)) zarówno przez 5 (**Rycina 18 A, B**) jak i przez 10 tygodni (**Rycina 13 A, B**) wykazywały znaczące upośledzenie czynności śródbłonna. Dysfunkcja śródbłonna była widoczna, jako upośledzenie odpowiedzi rozkurczowej w odpowiedzi na podanie Ach w aorcie piersiowej (**Rycina 13 A**) i brzusznej (**Rycina 13 B**), w miejsce odpowiedzi rozkurczowej w grupach myszy żywionych dietami zaspokajającymi zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> AIN-93M(+K<sub>1</sub>) i AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) przez 10 tygodni. Dieta AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) prowadziła również do upośledzenia odpowiedzi rozkurczowej FMD w tętnicy udowej (**Rycina 13 C**).

Dostępność witaminy K<sub>1</sub> w diecie nie miała wpływu na niezależny od śródbłonna rozkurcz naczyń wywołany przez SNP w aorcie piersiowej (**Rycina 13 D**) i w aorcie brzusznej (**Rycina 13 E**).

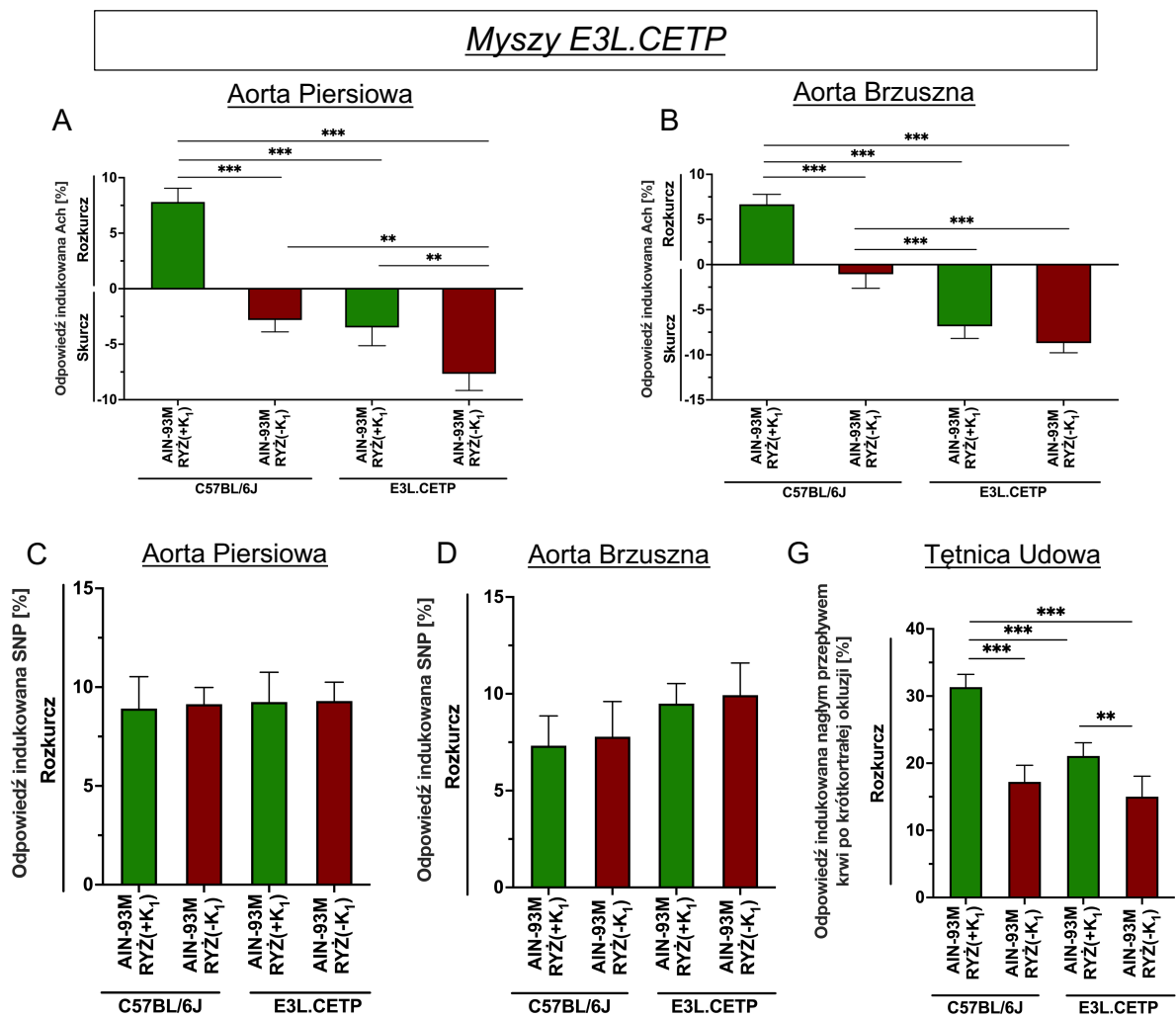
W przypadku, gdy po 5 tygodniach żywienia dietą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>), dietę zmieniono na kolejne 5 tygodni na dietę AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>), obserwowano całkowite odwrócenie dysfunkcji śródbłonna wywołanej niedoborem witaminy K<sub>1</sub>, o czym świadczy przywrócenie odpowiedzi rozkurczowej naczynia w odpowiedzi na podanie Ach zarówno w piersiowej jak i w brzusznej części aorty do poziomu porównywalnego jak u mysz żywionych przez 10 tygodni dietą AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) (**Rycina 13 A-B**). Uzupełnienie witaminy K<sub>1</sub> w diecie odwróciło również całkowicie upośledzenie odpowiedzi FMD w tętnicy udowej wynikające z niedoboru witaminy K<sub>1</sub> (**Rycina 13 E**).



**Rycina 13.** Wpływ niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonna u myszy C57BL/6J, ocenianą na podstawie odpowiedzi rozkurczowej naczyń krwionośnych wywołanej przez Ach w porównaniu do odpowiedzi na SNP w aorcie piersiowej i brzusznej oraz odpowiedzi FMD w tętnicy udowej oraz odwrócenie wywołanych zmian czynnościowych poprzez uzupełnienie niedoboru witaminy K<sub>1</sub>. Zależny- i niezależny od śródbłonna rozkurcz naczyń oceniano *in vivo* za pomocą MRI jako odpowiedzi na podanie Ach i SNP w aorcie piersiowej (**A, C**) i aorcie brzusznej (**B, D**). Ponadto oceniono odpowiedź rozkurczową naczynia indukowaną nagłym przepływem krwi po krótkotrwałej okluzji w tętnicy udowej (**E**). Pomiary MRI wykonano po 10 tygodniach żywienia dietą AIN-93M(+K) (zielono-czarne słupki), AIN-93M RYŻ(+K) (zielone słupki), AIN-93M RYŻ(-K) (czerwone słupki) i AIN-93M RYŻ(-K)/AIN-93M RYŻ(+K) 5tyg. /5 tyg. (szare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią ± 95% CI, n=5-6. Symbole \* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05 i 0,001. (Pomiary MRI wykonane we współpracy z Dr A. Bar z JCET, Kraków).

Jak pokazano na **Rycinie 14**, u myszy E3L.CETP w porównaniu do myszy C57BL/6J żywionych dietą zaspokajająca zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ (+K<sub>1</sub>)), czynność śródbłonna była upośledzona, o czym świadczyła zmniejszona odpowiedź

rozkurczowa na Ach w aorcie piersiowej i brzusznej oraz mniejsza odpowiedź FMD w tętnicy udowej. Żywienie myszy E3L.CETP dietą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) przez 10 tygodni dodatkowo pogłębiało upośledzenie czynność śródbłonna, oceniane w aorcie piersiowej (**Rycina 14 A**) i brzusznej (**Rycina 14 B**) oraz w tętnicy udowej (**Rycina 14 E**). Niezależna od śródbłonna odpowiedź rozkurczona w aorcie piersiowej (**Rycina 14 C**) i brzusznej (**Rycina 14 D**) nie różniła się u myszy E3L.CETP w porównaniu do myszy C57BL/6J. Nie obserwowano również wpływu zawartości witaminy K<sub>1</sub> w diecie na niezależną od śródbłonna odpowiedź rozkurczową wywołaną przez SNP w żadnej z badanych części aorty (**Rycina 14 C, D**).



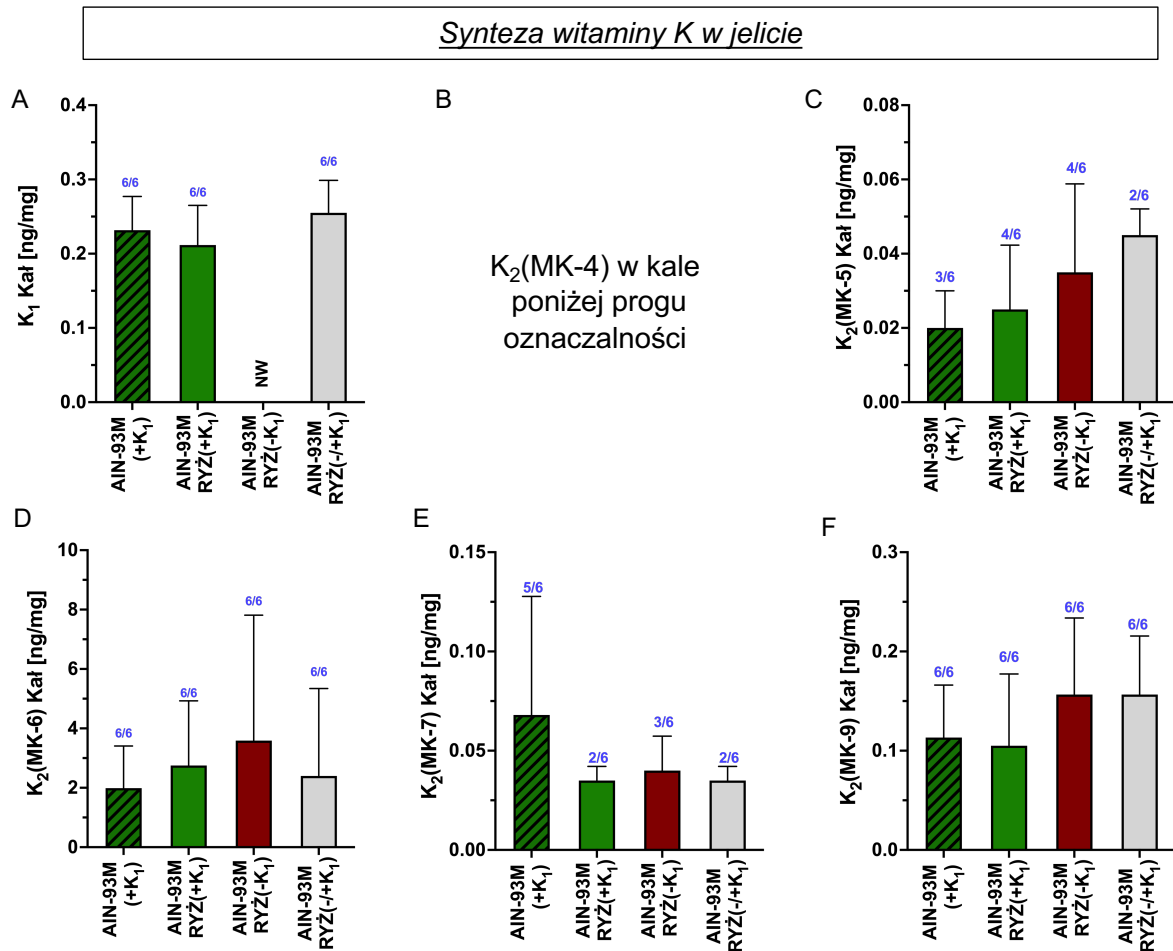
**Rycina 14.** Wpływ niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonna u myszy z normolipidemią C57BL/6J i u myszy z dyslipidemią E3L.CETP, ocenianą na podstawie odpowiedzi rozkurczowej naczyń krwionośnych wywołanej przez Ach w porównaniu do odpowiedzi wywołanej przez SNP w aorcie piersiowej i brzusznej oraz odpowiedzi FMD w tętnicy udowej. Zależne- i niezależne od śródbłonna rozszerzenie naczyń oceniano *in vivo* za pomocą MRI jako odpowiedź na podanie Ach i SNP w aorcie piersiowej (**A, C**) i aorcie brzusznej (**B, D**). Ponadto oceniono odpowiedź rozkurczową naczyń indukowaną nagłym przepływem krwi po krótkotrwałej okluzji w tętnicy udowej (**E**). Pomiarów MRI wykonano po 10 tygodniach żywienia dietą AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) (zielone słupki) lub dietą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) (czerwone słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią ± 95% CI, n=5-6. Symbole \* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05 i 0,001. (Pomiary MRI wykonano we współpracy z Dr A. Bar z JCET, Kraków)

## 5 Endogenna produkcja witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w ścianie naczyń

W celu wyjaśnienia czy witamina K<sub>1</sub> jest przekształcana przez bakterie jelitowe w witaminę z grupy K<sub>2</sub>, które mogłyby stanowić źródło witaminy K<sub>2</sub> dla ściany naczyń, przeanalizowano poziom szeregu form witaminy K<sub>2</sub>: K<sub>2</sub>(MK-4), K<sub>2</sub>(MK-5), K<sub>2</sub>(MK-6), K<sub>2</sub>(MK-7) i K<sub>2</sub>(MK-9) w kale myszy żywionych dietami o różnej zawartości witaminy K<sub>1</sub>. Natomiast w celu wyjaśnienia czy synteza endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) zachodzi w mysiej aortalnej, zbadano zdolność komórek ściany naczyń (śródbłona i komórek mięśniówki gładkiej) a dla porównania także makrofagów, do produkcji endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4).

### 5.1 Endogenna produkcja witaminy K<sub>2</sub> przez bakterie jelitowe

Witamina K<sub>1</sub> była oznaczalna ilościowo jedynie w próbkach kału myszy otrzymujących dietę zawierającą witaminę K<sub>1</sub>, ale nie została wykryta w próbkach kału myszy karmionych dietą z niedoborem witaminy K<sub>1</sub> (**Rycina 15 A**). Poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) był poniżej progu oznaczalności metody we wszystkich grupach niezależnie od rodzaju żywienia, wskazując, że bakterie jelitowe nie są źródłem najpowszechniejszej występującej w ścianie naczyń formy witaminy K<sub>2</sub> (**Rycina 15 B**). Pozostałe badane formy witaminy K<sub>2</sub>: K<sub>2</sub>(MK-5) (**Rycina 15 C**), K<sub>2</sub>(MK-7) (**Rycina 15 E**) oraz K<sub>2</sub>(MK-9) (**Rycina 15 F**) utrzymywały się na podobnym poziomie niezależnie od rodzaju żywienia, tak więc niedobór witaminy K<sub>1</sub> nie zmienił syntezy żadnej z badanych witamin K<sub>2</sub> przez mikroflorę jelitową, w szczególności K<sub>2</sub>(MK-4) (**Rycina 15 B-F**). Najwyższy poziom w kale odnotowano dla witaminy K<sub>2</sub>(MK-6) (**Rycina 15 D**).



**Rycina 15. Wpływ niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na biosyntezę witaminy K<sub>2</sub> przez bakterie jelitowe u myszy, oceniany na podstawie poziomów różnych form witaminy K w kale myszy.** Biosyntezę witaminy K przez mikroflorę jelitową oceniono na podstawie poziomów witaminy K<sub>1</sub> (A), K<sub>2</sub>(MK-4) (B), K<sub>2</sub>(MK-5) (C), K<sub>2</sub>(MK-6) (D), K<sub>2</sub>(MK-7) (E) i K<sub>2</sub>(MK-9) (F) w kale myszy. Pomiary wykonano po 10 tygodniach żywienia dietą AIN-93M(+K) (zielono-czarne słupki), AIN-93M RYŻ(+K) (zielone słupki), AIN-93M RYŻ(-K) (czerwone słupki) i AIN-93M RYŻ(-/+K)/AIN-93M RYŻ(+K) 5tyg./5 tyg. (szare słupki). Ponieważ zawartość niektórych z badanych form witaminy K<sub>2</sub> w kale nie była wykrywalna we wszystkich próbkach, liczbę analizowanych próbek na grupę (n≤6) pokazano na niebiesko. Wyniki przedstawiono jako średnią ± 95% CI. NW- poziom niewykrywalny. (Pomiary poziomu witaminy K metodą UHPLC-APCI-MS/MS wykonano we współpracy z Dr A. Kij).

## 5.2 Endogenna produkcja witaminy K<sub>2</sub>(MK-4); badanie wychwytu witaminy K<sub>1</sub> i produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) przez ścianę naczyń, komórki śródbłonna, komórki mięśniówki gładkiej ściany naczyń oraz przez makrofagi

Wychwyt witaminy K<sub>1</sub> i endogenną konwersję witaminy K<sub>1</sub> w witaminę K<sub>2</sub>(MK-4), oceniano po 24 godzinnej inkubacji krążków mysiej aorty (Rycina 16 A, E), komórek śródbłonna HAEC (Rycina 16 B), komórek mięśniówki gładkiej ściany naczyń MOVAS (Rycina 16 C) oraz makrofagów RAW 264.7 (Rycina 15 D) [12] i z witaminą K<sub>1</sub> w stężeniu: aorta (5 μM), HAEC i MOVAS (1 μM) oraz RAW 264.7 (10 μM).

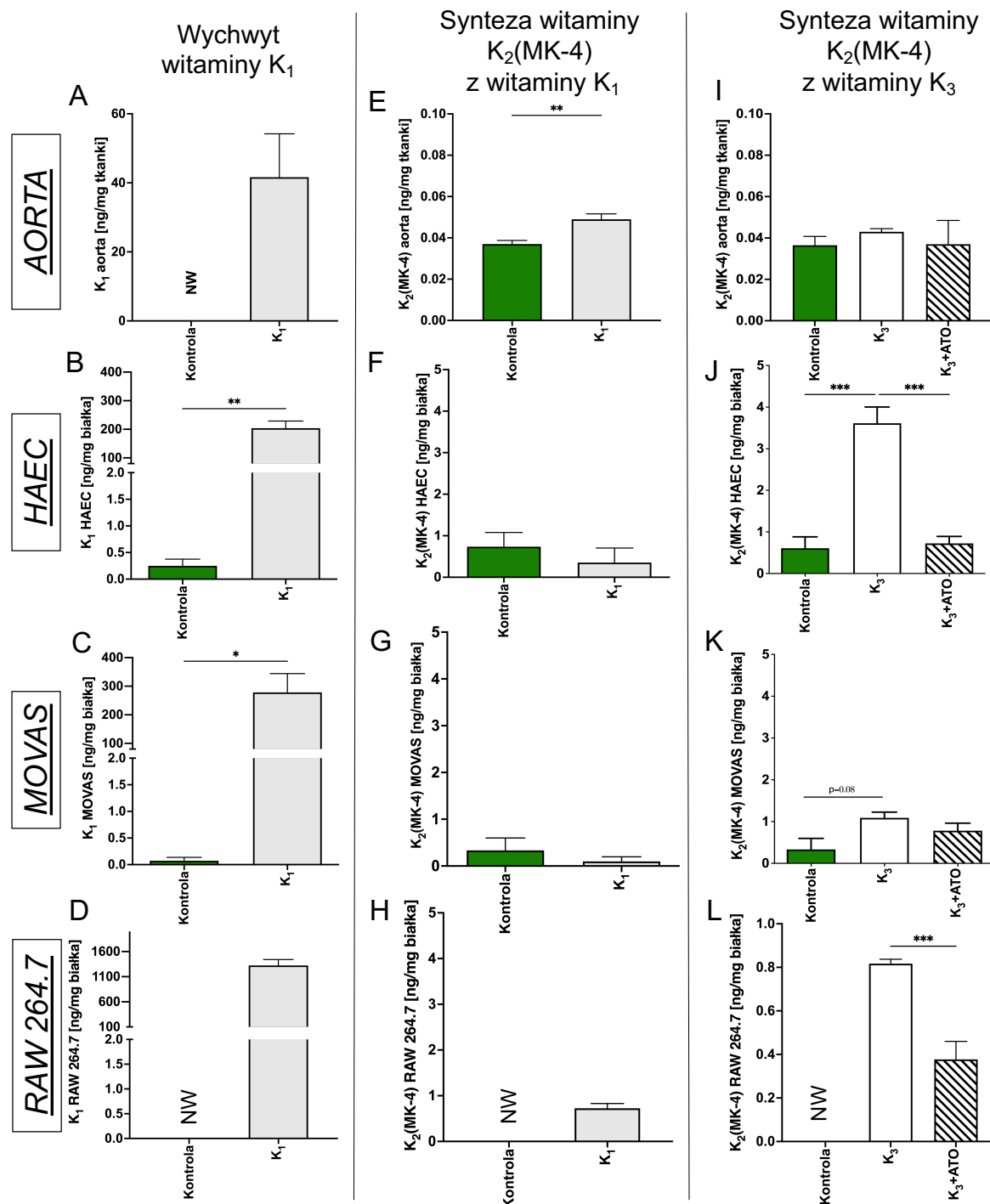
Jak przedstawiono na **Rycinie 16** ściana aorty (**Rycina 16 A**), HAEC (**Rycina 16 B**), MOVAS (**Rycina 16 C**), a także RAW 264.7 (**Rycina 16 D**) [12] były zdolne do wychwytu egzogennej witaminy K<sub>1</sub>.

Po 24 godzinach inkubacji z witaminą K<sub>1</sub> (5 μM), stwierdzono także statystycznie istotny wzrost poziomu endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w mysiej aorcie (**Rycina 16 E**). W przypadku linii komórkowych: HAEC (**Rycina 16 F**) i MOVAS (**Rycina 16 G**) witaminą K<sub>1</sub> (1 μM), nie miała wpływu na poziom endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4), której stężenie było porównywalne do stężenia zmierzonego w komórkach kontrolnych inkubowanych w medium bez witaminy K<sub>1</sub>. W makrofagach RAW 264.7, inkubowanych bez witaminy K<sub>1</sub> zawartość witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) była poniżej progu oznaczalności, natomiast inkubacja z witaminą K<sub>1</sub> (10 μM) przez 24 godziny wywoływała istotny wzrost zawartości witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) (**Rycina 16 H**) [12].

Inkubacja izolowanej aorty mysiej *ex vivo* z menadionem (K<sub>3</sub>, 5 μM) nie wpłynęła na poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w aorcie (**Rycina 16 I**). Podczas gdy witamina K<sub>3</sub> wywoływała wzrostem poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) po 24 godzinach inkubacji we wszystkich badanych liniach komórkowych: HAEC (**Rycina 16 J**) i MOVAS z K<sub>3</sub> (1 μM) (**Rycina 16 K**) oraz RAW 264.7 z K<sub>3</sub> (10 μM) (**Rycina 16 L**) [12] i tylko w przypadku komórek MOVAS, ten wzrost był na granicy istotności statystycznej (p=0.08).

Obecność atorwastatyny (ATO, 1μM) podczas inkubacji mysiej aorty z witaminą K<sub>3</sub>, użyta w celu zahamowania mechanizmów prenylacji, nie wpłynęła na poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w aorcie (**Rycina 16 I**). Podobnie ATO (1μM) nie hamowała produkcji endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w komórkach mięśniówki gładkiej MOVAS (**Rycina 16 K**). W przypadku HAEC (**Rycina 16 J**), oraz RAW 264.7 (**Rycina 16 L**) [12] obecność ATO (1μM) podczas inkubacji komórek z witaminą K<sub>3</sub> hamowała endogenną produkcję K<sub>2</sub>(MK-4), o czym świadczy obniżenie poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) o około 70% dla HAEC i 50 % dla RAW 264.7, w stosunku do komórek inkubowanych z witaminą K<sub>3</sub> bez ATO [12].





**Rycina 16. Wychwył witaminy K<sub>1</sub> i produkcja endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4), oceniany na podstawie poziomu witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) w mysiej aortce, komórkach śródbłonna HAEC, komórkach mięśniówki gładkiej ściany naczyń MOVAS oraz w makrofagach RAW 264.7** Zdolność wychwytu egzogennej witaminy K<sub>1</sub> (A-D), oraz możliwość syntezy endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) z witaminy K<sub>1</sub> (E-H) lub gotowego do prenylacji menadionu (witaminy K<sub>3</sub>) (I-L) oceniano w aortce (A, E, I), komórkach śródbłonna HAEC (B, F, J), komórkach mięśniówki gładkiej ściany naczyń MOVAS (C, G, K) oraz makrofagach RAW 264.7 (D, H, L). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD n=3. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Symbole \*, \*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05; 0,01 i 0,001. NW - poziom niewykrywalny. (Pomiary poziomu witaminy K metodą UHPLC-APCI-MS/MS wykonano we współpracy z Dr A. Kij z JCET, Kraków). Rycina 16 D, H i L na podstawie A. Kieronska-Rudek i wsp., 2021 (zmodyfikowano) [12].

## **6. Analiza biodostępności i działania naczynioprotekcyjnego witaminy K<sub>1</sub>, dostarczanej przy pomocy hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12) u myszy z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>**

Wcześniejsze wyniki wykazały, że dieta uboga w witaminę K<sub>1</sub> – AIN-93M RYŻ (-K<sub>1</sub>) wywołuje niedobór witaminy K<sub>1</sub> u myszy, oraz skutkuje upośledzeniem zależnej od śródbłonka odpowiedź rozkurczowej aorty, które można odwrócić poprzez uzupełnienie niedoboru witaminy K<sub>1</sub>. W niniejszym badaniu określono czy podawanie witaminy K<sub>1</sub> w postaci hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu zawierającym witaminę K<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12), może przyspieszyć odwrócenie dysfunkcji śródbłonka wynikającej z niedoboru witaminy K<sub>1</sub>. Witaminę K<sub>1</sub> podawano myszom z niedoborem witaminy K<sub>1</sub> przez 2 oraz 7 dni w postaci hialuronowych nanokapsuł K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 lub witaminy K<sub>1</sub> rozpuszczonej w oleju bez polimeru (K<sub>1</sub>-Oil), po czym określano poziom witaminy K<sub>1</sub> i endogennej formy K<sub>2</sub>(MK-4) w osoczu, wątrobie i aorcie oraz badano czynność śródbłonka *in vivo* metodą MRI.

### **6.1 Efekt dostarczania witaminy K<sub>1</sub> w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 na jej biodostępność w osoczu, wątrobie oraz aorcie u myszy C57BL/6J z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>**

Żywienie myszy C57BL/6J przez 5 tygodni dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)) wywoływało spadek stężenia witaminy K<sub>1</sub> w osoczu (**Rycina 17 A**) oraz w wątrobie (**Rycina 17 B**) do poziomu poniżej granicy wykrywalności metody UHPLC-APCI-MS/MS.

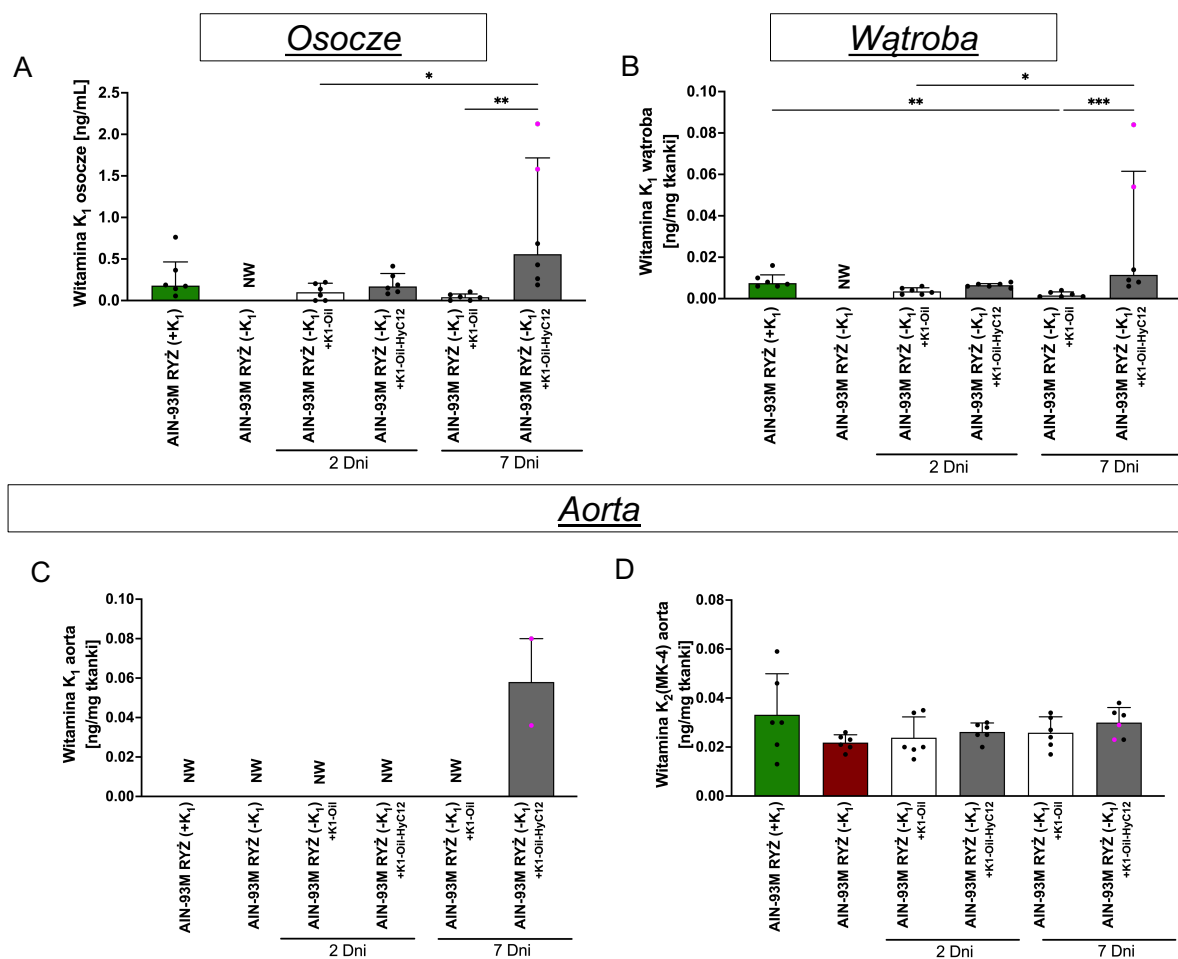
Podanie witaminy K<sub>1</sub> w formie rozpuszczonej w oleju (K<sub>1</sub>-Oil) spowodowało nieznaczny wzrost stężenia witaminy K<sub>1</sub> w osoczu, które było porównywalne po 2 i 7 dniach podawania K<sub>1</sub>-Oil. W grupie myszy, którym witaminę K<sub>1</sub> podawano w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 stężenie witaminy K<sub>1</sub> w osoczu po 2 dniach było nieznacznie wyższe, niż u myszy, którym podawano K<sub>1</sub>-Oil, przez 2 dni. Natomiast, po 7 dniach podawania K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, stężenie witaminy K<sub>1</sub> w osoczu było statystycznie istotnie wyższe, niż w przypadku podawania K<sub>1</sub>-Oil przez taki sam okres czasu (0,04 ng/mL dla K<sub>1</sub>-Oil w porównaniu do 0,88 ng/mL dla K<sub>1</sub>-Oil-HyC12) (**Rycina 17 A**).

Podobnie w wątrobie podawanie witaminy K<sub>1</sub> w postaci K<sub>1</sub>-Oil nieznacznie zwiększyło zawartość witaminy K<sub>1</sub>, pozostając na porównywalnym poziomie niezależnie od długości terapii (2 lub 7 dni). W grupie, której podawano K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, po 2 dniach odnotowano wzrost stężenia witaminy K<sub>1</sub> porównywalny do K<sub>1</sub>-Oil po tym samym czasie, natomiast przedłużenie terapii do 7 dni skutkowało istotnie statystycznie wyższym poziomem witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie

w porównaniu z 7 dniową terapią K<sub>1</sub>-Oil (0,002 ng/mg tkanki dla K<sub>1</sub>-Oil w porównaniu do 0,029 ng/mg tkanki dla K<sub>1</sub>-Oil- HyC12) **(Rycina 17 B)**.

Nie stwierdzono obecności witaminy K<sub>1</sub> w aorcie myszy żywionych dietą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) ani AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>), podobnie jak w żadnej z grup, którym witaminę K<sub>1</sub> podawano przez 2 dni (ani w formie K<sub>1</sub>-Oil, ani w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12). Poziom witaminy K<sub>1</sub> był również niewykrywalny w aorcie myszy, którym witaminę K<sub>1</sub> podawano przez 7 dni w formie K<sub>1</sub>-Oil. Jedynie w grupie, której podawano witaminę K<sub>1</sub> przez 7 dni w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 odnotowano stosunkowo wysokie stężenie witaminy K<sub>1</sub> w aorcie u 2 z 6 myszy **(Rycina 17 C)**.

W przeciwieństwie do witaminy K<sub>1</sub>, obecność witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) stwierdzono w aorcie, we wszystkich badanych grupach myszy. Poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) był najniższy w aorcie myszy żywionych dietą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>), ale nie różnił się istotnie od poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) oznaczonego w aorcie myszy żywionych dietą AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>). Uzupełnienie niedoboru witaminy K<sub>1</sub> zarówno w formie K<sub>1</sub>-Oil jak i K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 nieznacznie podnosiło poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w aorcie, niezależnie od czasu podawania. Najwyższy poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w aorcie stwierdzono w grupie eksperymentalnej, której przez 7 dni podawano K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, ale różnica nie była istotna statystycznie w porównaniu z grupą AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) **(Rycina 17 D)**.



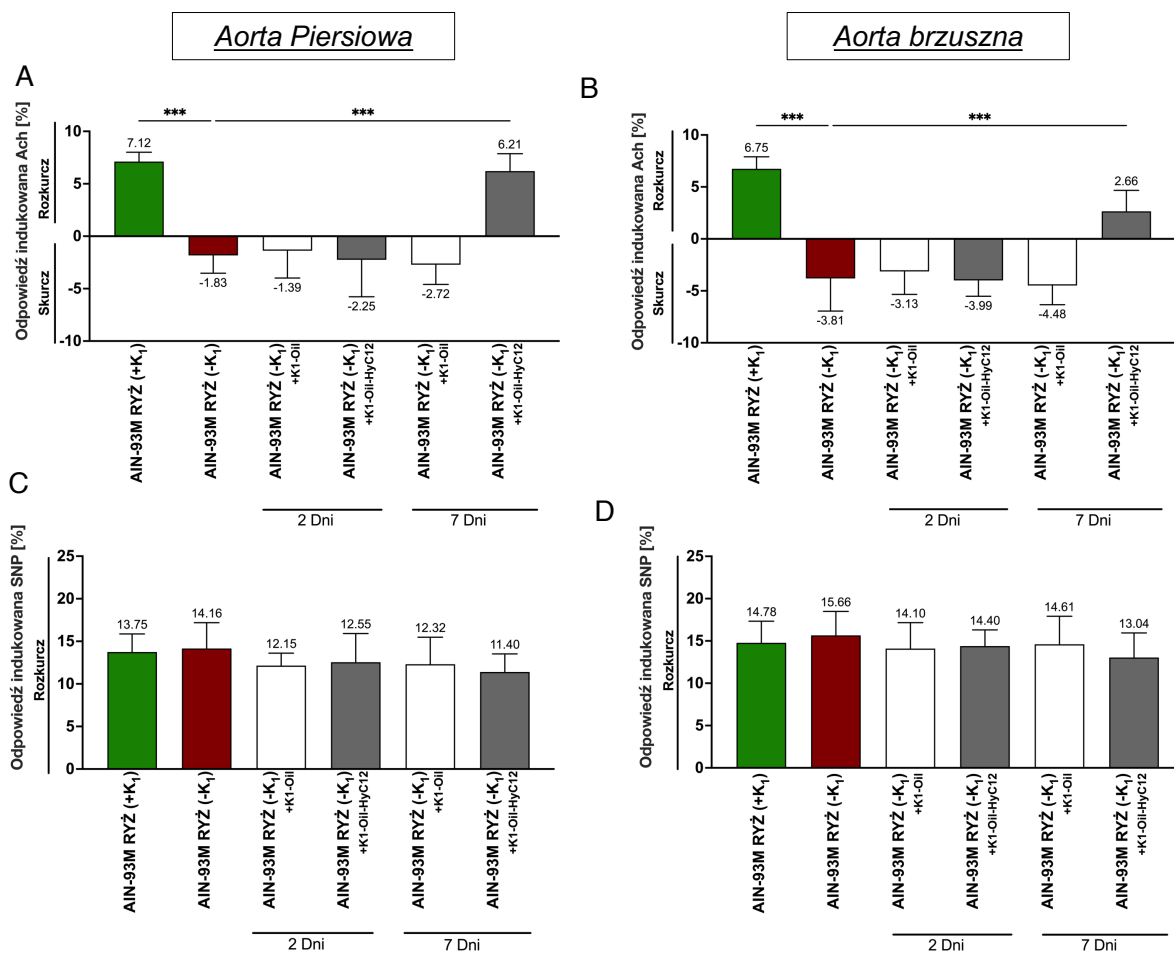
**Rycina 17. Wpływ dostarczania witaminy K<sub>1</sub> przy pomocy hialuronowych kapsuł o olejowym rdzeniu zawierających witaminę K<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12) na odwracanie niedoboru witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie, osoczu i aorcie w porównaniu do witaminy K<sub>1</sub> podawanej w formie rozpuszczonej w oleju bez polimeru (K<sub>1</sub>-Oil). Efekt podania witaminy K<sub>1</sub> w postaci K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 (szare słupki) w porównaniu do K<sub>1</sub>-Oil (białe słupki) u myszy żywionych przez 5 tygodni dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> – AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>) (Czerwone słupki). Efekty odwracania niedoboru witaminy K<sub>1</sub> oceniano poprzez analizę poziomy witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) w osoczu (A), wątrobie (B) oraz aorcie (C-D). Kontrolny poziom witaminy K oceniono na podstawie poziomów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>(MK-4) w osoczu (A), wątrobie (B) oraz aorcie (C-D) u myszy żywionych dietą AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) (zielone słupki). Dane przedstawiono jako medianę ± ICQ (n=6). Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu Kruskala Wallisa, z testem wielokrotnych porównań Dunetta. Symbole \*,\*\* i \*\*\* oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy p < 0,05; 0,01 i 0,001. NW- poziom nie wykrywalny. (Pomiary poziomu witaminy K w narządach wykonano we współpracy z Dr A. Kij)**

6.2 Efekt dostarczania witaminy K<sub>1</sub> w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 na czynność śródbłonka *in vivo* u myszy C57BJ/6J z niedoborem witaminy K<sub>1</sub>

Żywienie myszy C57BL/6J przez 5 tygodni dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)) wywoływało upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie piersiowej (**Rycina 18 A**) i brzusznej (**Rycina 18 B**), objawiające się jako odpowiedź skurczowa wywołana przez Ach, w miejsce odpowiedzi rozkurczowej u myszy żywionych dietą zaspokajającą zapotrzebowanie na witaminę K<sub>1</sub> - AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>). Skurcz w aorcie piersiowej (**Rycina 18 A**) i brzusznej części aorty (**Rycina 18 B**) oceniane za pomocą MRI *in vivo*, wynosił odpowiednio -1,83% i -3,81%.

Witamina K<sub>1</sub> podawana przez 2 dni zarówno w formie K<sub>1</sub>-Oil jak i w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 była nieskuteczna w odwracaniu wywołanego niedoborem K<sub>1</sub> upośledzenia czynności śródbłonka (**Rycina 18 A, B**). Przedłużenie podawania witaminy K<sub>1</sub> w formie K<sub>1</sub>-Oil do 7 dni również nie wpłynęło na odwrócenie dysfunkcji śródbłonka wynikającej z niedoboru witaminy K<sub>1</sub>. Natomiast podawanie witaminy K<sub>1</sub> w postaci K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 przez 7 dni spowodowało całkowicie odwrócenie upośledzenia czynności śródbłonka wywołanego niedoborem witaminy K<sub>1</sub> do poziomu porównywalnego jak u myszy, żywionych dietą AIN-93M RYŻ(+K<sub>1</sub>) w aorcie piersiowej (6,21%) i częściowe odwrócenie upośledzenia czynności śródbłonka w aorcie brzusznej (2,66%) (**Rycina 18 A, B**).

Niezależna od śródbłonka, odpowiedź rozkurczowa, wywołana przez SNP, w aorcie piersiowej (**Rycina 18 C**) i brzusznej (**Rycina 18 D**) pozostała niezmieniona, niezależnie od dostępności witaminy K<sub>1</sub> w diecie i nie zmieniała się również w odpowiedzi na podawanie witaminy K<sub>1</sub> w żadnej z form: K<sub>1</sub>-Oil ani K<sub>1</sub>-Oil-HyC12.



**Rycina 18.** Wpływ podawania witaminy K<sub>1</sub> przy pomocy hialuronowych kapsuł o olejowym rdzeniu zawierających witaminę K<sub>1</sub> (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12) w porównaniu do witaminy K<sub>1</sub> w formie rozpuszczonej w oleju bez polimeru (K<sub>1</sub>-Oil) na odwracanie dysfunkcji śródbłonna wynikającej z niedoboru witaminy K<sub>1</sub>. Oceniano odpowiedź rozkurczową naczyń krwionośnych wywołaną przez Ach lub SNP w aorcie piersiowej i brzusznej. Zależny (A-B) i niezależny (C-D) od śródbłonna rozkurcz naczyń krwionośnych oceniano *in vivo* za pomocą MRI w aorcie piersiowej (A i C) i brzusznej (B i D). Pomiar MRI wykonano po 5 tygodniach żywienia myszy C57BL/6J dietą AIN-93M RYŻ(+K) (zielono- słupki) lub AIN-93M RYŻ(-K) (czerwone słupki), oraz u myszy żywionych 5 tygodni dietą AIN-93M RYŻ(-K), którym następnie podawano witaminę K<sub>1</sub> w formie K<sub>1</sub>-Oil (białe słupki) lub K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 (szare słupki) przez 2 lub 7 dni. Każdy pomiar był wykonywany po 22-26 godzinach po ostatnim podaniu witaminy K<sub>1</sub> po 2 lub 7 dniach podawania witaminy K<sub>1</sub>. Dane przedstawiono jako średnie ± SD (n=6). Istotność statystyczną oceniano za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA, z testem wielokrotnych porównań Dunetta Symbol \*\*\* oznacza istotność statystyczną przy p < 0.001. (Pomiary MRI wykonano we współpracy z Dr A. Bar z JCET, Kraków)

## V Dyskusja

Witamina K<sub>1</sub> przez wiele lat była kojarzona głównie z potranslacyjną karboksylacją czynników krzepnięcia w wątrobie, podczas gdy wyniki nielicznych badań dotyczących jej pozawątrobowego działania pozostawały niespójne. Jedne prace wykluczały naczynioprotekcyjne działanie witaminy K<sub>1</sub> [58,65], natomiast inne je potwierdzały [23,66]. Biorąc pod uwagę, liczne czynniki, które mogą ograniczać dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do tkanek pozawątrobowych, wydaje się, że ta niespójność mogła wynikać z ograniczonej biodostępności witaminy K<sub>1</sub> dla tkanki naczyniowej [28,74,102].

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej potwierdziły, że witamina K<sub>1</sub>, podobnie jak witamina K<sub>2</sub> ma działanie naczynioprotekcyjne, które może wynikać z mechanizmu senolitycznego, związanego z hamowaniem uszkodzeń DNA w ścianie naczyń oraz przeciwzapalnego obejmującego regulację szerokiego spektrum szlaków zapalnych w tym hamowanie aktywacji NFκB.

Dowodem potwierdzającym istotny udział witaminy K<sub>1</sub> w regulacji czynności śródbłonna były badania przeprowadzone z wykorzystaniem diety ubogiej w witaminę K<sub>1</sub> które wykazały, że niedobór witaminy K<sub>1</sub> w diecie wywołał dysfunkcję śródbłonna, która była odwracana poprzez uzupełnienie niedoboru witaminy K<sub>1</sub>.

Niedobór witaminy K<sub>1</sub> wywoływał także spadek poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK4) w aorcie, sugerując, że działanie witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń krwionośnych może być związane z endogenną syntezą witaminy K<sub>2</sub>(MK-4), co może także stanowić wyjaśnienie porównywalnego działania witaminy K<sub>1</sub> w aktywnościach przypisywanych dotąd witaminie K<sub>2</sub>. Dodatkowo, w ramach niniejszej pracy udowodniono, że dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> za pomocą hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu poprawiło biodostępność witaminy K<sub>1</sub> i znacząco przyśpieszyło odwrócenie dysfunkcji śródbłonna wywołanej niedoborem witaminy K<sub>1</sub>. Wyniki te nie tylko sugerują, że hialuronowe nanokapsuły stanowią obiecujący nośnik witaminy K<sub>1</sub> do zastosowania we wspieraniu terapii chorób sercowo-naczyniowych, ale przede wszystkim potwierdzają że wysoka biodostępność witaminy K<sub>1</sub> istotnie wpływa na efekt terapeutyczny, co może tłumaczyć wcześniejsze niespójne doniesienia dotyczące naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub>.

## **1. Działanie naczynioprotekcyjne witaminy K<sub>1</sub>**

Poszukiwanie nowych strategii prewencji chorób sercowo-naczyniowych stanowi jedno z najistotniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Od lat witamina K, a konkretnie witamina K<sub>2</sub>, była uważana za obiecującą substancję o działaniu kardio- i naczynioprotekcyjnym, związanym z hamowaniem wapnienia naczyń krwionośnych i zastawek. Najnowsze badania wykazały, że pozytywne działanie witaminy K<sub>2</sub> na ścianę naczyń może być szersze i niezależne od regulacji wapnienia. Mianowicie, wykazano, że dieta wzbogacona witaminą K<sub>2</sub> poprawiała zależną od śródbłonna odpowiedź rozkurczową naczyń u myszy ApoE/LDL<sup>-/-</sup> poprzez regulację produkcji tlenu azotu [20].

Badania *in vivo* u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, żywionych dietą wzbogaconą w witaminę K<sub>1</sub> lub K<sub>2</sub> potwierdziły, odnotowany wcześniej [20] wpływ witaminy K<sub>2</sub>, tu K<sub>2</sub>(MK-4) na poprawę czynności śródbłonna w odpowiedzi na Ach (**Rycina 3 C, D**). Co jednak najciekawsze, po raz

pierwszy w tej pracy doktorskiej wykazano wpływ witaminy K<sub>1</sub> na poprawę czynności śródbłonna *in vivo* (**Rycina 3 C, D**).

Wiedząc, że w przebiegu właściwie wszystkich chorób sercowo-naczyniowych występuje ostre lub przewlekłe zapalenie [37,103] wyniki badań *in vivo*, zweryfikowano badaniem funkcjonalnym *ex vivo*, gdzie upośledzenie czynności rozkurczowej naczynia i dysfunkcje śródbłonna wywoływano przy użyciu TNF. Podobnie jak w badaniach *in vivo*, witamina K<sub>1</sub>, wykazywała działanie naczynioprotekcyjne, powodując całkowite zachowanie zależnego od śródbłonna (**Rycina 3 A**), a także częściowe zachowanie niezależnego od śródbłonna rozkurczu naczyń krwionośnych w warunkach zapalenia ściany naczynia wywołanego przez TNF (**Rycina 3 B**).

Wyniki dotyczące naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> przedstawione na **Rycinie 3** zostały wsparte dodatkowo badaniami dotyczącymi wpływu niedoboru witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonna *in vivo*. Niedobór witaminy K<sub>1</sub>, skutkowało upośledzeniem rozkurczu aorty wywołanego przez Ach (**Rycina 13 A, B oraz Rycina 14 C, D**) oraz upośledzeniem odpowiedzi FMD (**Rycina 13 E oraz Rycina 14 G**). Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami wcześniejszej obserwacji u ludzi, wskazującej na to, że niski poziom witaminy K<sub>1</sub>, korelował ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym u starszych pacjentów z nadciśnieniem [23]. Potwierdzeniem istotnej roli witaminy K<sub>1</sub> w utrzymaniu czynności śródbłonna, było wykazanie, że uzupełnienie niedoboru witaminy K<sub>1</sub> u myszy z niedoborem witaminy K<sub>1</sub> skutkowało przywróceniem czynności śródbłonna (**Rycina 13 A, B, E**).

Wiedząc, że witamina K<sub>1</sub>, jest uważana za odpowiedzialną za krzepnięcie krwi, wątrobową formę witaminy K, może wydawać się nieco zaskakujące, że u myszy żywionych dietą ubogą w witaminę K<sub>1</sub> (AIN-93M RYŻ(-K<sub>1</sub>)), nie odnotowano upośledzenia krzepnięcia krwi [104] (**Rycina 11 D**). Należy jednak podkreślić, że w przeprowadzonym badaniu ograniczano wyłącznie dostępność witaminy K<sub>1</sub>, a nie witaminy K<sub>2</sub> w diecie. Myszy wykorzystane w badaniach, były zwierzętami posiadającymi fizjologiczną jelitową florę bakteryjną, zdolną do produkcji endogennych witamin K<sub>2</sub>. Dodatkowo nie limitowano w żaden sposób koprofagii, która jest powszechna u gryzoni i może stanowić źródło witamin z grupy K<sub>2</sub> [105], co z resztą potwierdzono przez wykazanie obecności witaminy K<sub>2</sub> w kale (**Rycina 15**). Co więcej, pomimo tego, że witamina K<sub>1</sub> jest uważana za kluczową w procesie krzepnięcia, istnieją badania wskazujące na podobne powinowactwo witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> do enzymu VKOR, uczestniczącego w karboksylacji czynników krzepnięcia, co potwierdza, że niedobór witaminy K<sub>1</sub> może być częściowo kompensowany obecnością witaminy K<sub>2</sub> [106]. Dodatkowym argumentem potwierdzającym możliwość zaangażowania witaminy K<sub>2</sub> w utrzymanie procesu



krzepnięcia krwi, są badania przeprowadzone na szczurach pozbawionych bakterii jelitowych, u których niedobór witaminy K<sub>1</sub> powodował masywne krwawienia a nawet doprowadzał do śmierci zwierząt z powodu krwotoków wewnętrznych, w odróżnieniu do zwierząt kontrolnych posiadających fizjologiczną florę bakteryjną [107].

Wyniki niniejszych badań wykazały, że u myszy żywionych dietą AIN-93M RYŻ(+K), zawartość witaminy K<sub>1</sub> w osoczu była na podobnym poziomie u myszy E3L.CETP i C57BL/6J. W odróżnieniu do osocza, w wątrobie poziom witaminy K<sub>1</sub> u myszy E3L.CETP był niższy niż u myszy C57BL/6J. Obniżony poziom witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie, można najprawdopodobniej wyjaśnić opóźnieniem szlaku klirensu lipoprotein, obecnym w modelu E3L.CETP [108], który stanowi główny szlak transportu witaminy K<sub>1</sub> do wątroby.

Biorąc pod uwagę, że witamina K<sub>1</sub> jest transportowana głównie przez lipoproteiny [72], profil lipidowy oraz leki obniżające stężenie lipidów mają istotny wpływ na dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do tkanek docelowych [109]. Wyniki niniejszej pracy wykazały, że u myszy z dyslipidemią E3L.CETP, żywionych dietą AIN-93M RYŻ(+K) (**Rycina 14 A, B**) czynność śródbłonna była upośledzona w stosunku do myszy z normolipidemią C57BL/6J (**Rycina 13 A, B**). Niedobór witaminy K<sub>1</sub> dodatkowo pogłębiał dysfunkcję śródbłonna u myszy z dyslipidemią E3L.CETP (**Rycina 14 A, B**), sugerując istotne znaczenie witaminy K<sub>1</sub> w utrzymaniu czynności śródbłonna, także w warunkach dyslipidemii.

Wyniki niniejszej pracy, mogą więc mieć wartość translacyjną, wskazując, że zaburzenia profilu lipidowego występujące u pacjentów z dyslipidemią, jak mutacja APOE\*3-Leiden [80,81], może powodować zaburzenia transportu witaminy K<sub>1</sub>, a w konsekwencji przyczyniać się do rozwoju dysfunkcji śródbłonna wynikającej z niedoboru witaminy K<sub>1</sub>.

## **2. Analiza mechanizmów naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub>**

### **2.1 Działanie senolityczne witaminy K<sub>1</sub> w komórkach ściany naczynia**

Starzenie się komórek, z angielskiego *senescence*, jest złożonym procesem związanym z zahamowaniem podziałów komórkowych, skracaniem telomerów oraz wydzielaniem przez komórki białek związanych ze starzeniem się (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*) takich jak cytokiny prozapalne [43]. Gromadzenie się w tkance starzejących się komórek leży u podstaw licznych chorób, takich jak choroby sercowo-naczyniowe. W związku z tym poszukiwanie substancji o działaniu senolitycznym jest jednym z istotnych wyzwań współczesnej nauki.

W języku polskim nie istnieje trafne określenie opisujące działanie polegające na hamowaniu starzenia się komórek. Używanie stwierdzeń „działanie przeciwstarzeniowe” czy „efekt przeciwstarzeniowy” jest często mylnie interpretowane jako odpowiednik angielskiego stwierdzenia *anti-aging*, stosowanego w kontekście hamowania efektów starzenia związanego z wiekiem np. w kosmetologii, ale nie starzenia się komórek. W związku z tym w tej pracy doktorskiej konsekwentnie i świadomie, używano spolszczonych stwierdzeń „działanie senolityczne” lub „efekt senolityczny” w kontekście hamowania starzenia się komórek, aby uniknąć błędnej interpretacji.

Jak wspomniano wyżej, z wiekiem może dochodzić do nagromadzenia starzejących się komórek w sercu i ścianie naczyń krwionośnych, co w konsekwencji – jak pokazują badania – prowadzi do rozwoju i progresji chorób sercowo-naczyniowych [110]. W związku z tym, starzenie się komórek jest uważane za istotny czynnik zaangażowany w rozwój chorób sercowo-naczyniowych [111]. Mimo, że istnieją dane, wskazujące na to że, niski poziom witaminy K<sub>2</sub> może być zaangażowany w rozwój chorób związanych z wiekiem, dotychczasowe badania ograniczały się wyłącznie do analizy wpływu witaminy K<sub>2</sub> na rozwój chorób neurodegeneracyjnych [112,113]. Istnieje więc luka w wiedzy, dotycząca badań wpływu witaminy K (szczególnie witaminy K<sub>1</sub>) na inne choroby związane z wiekiem, takie jak choroby sercowo-naczyniowe.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej oceniono działanie senolityczne witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w komórkach śródbłonna oraz komórkach mięśniówki gładkiej ściany naczynia. Wyniki przeprowadzonych badań (**Rycina 4**) dowiodły, że witamina K<sub>1</sub> podobnie jak witamina K<sub>2</sub> obniża aktywność związanej ze starzeniem  $\beta$ -galaktozydazy, w modelu replikacyjnego starzenia się zarówno w komórkach śródbłonna jak i w komórkach mięśniówki gładkiej ściany naczynia, co potwierdza senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>. Aktywność  $\beta$ -galaktozydazy stanowi jeden ze złotych markerów komórek starzejących się, dlatego też wynik ten wskazuje na senolityczne działanie witaminy K. Podobnej obserwacji dokonał Cirilli i wsp. (2020), wykazując że witamina K<sub>2</sub>(MK-7) hamowała aktywność  $\beta$ -galaktozydazy w starzejących się komórkach śródbłonna żyły pępowinowej gdzie starzenie wywołano poprzez inkubację komórek z ekstraktem dymu papierosowego [19]. Jednak zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej, po raz pierwszy wykazały, wpływ witaminy K<sub>1</sub> na aktywność SA $\beta$ -gal. Senolityczne działanie witaminy K<sub>1</sub> potwierdzono dodatkowo w modelu starzenia się komórek mięśniówki gładkiej 04/35F/11A, gdzie starzenie się wywołano gromadzeniem prelaminy A, powodujące uszkodzenie DNA [101,114].

Wykazano, że witamina K<sub>1</sub>, tak samo jak witamina K<sub>2</sub> obniżała ekspresję genów związanych ze starzeniem (p16, p21 i IL-6) (**Rycina 6**).

Jedną z cech komórek starzejących się jest zahamowanie proliferacji [115]. Może więc wydawać się zaskakujące, że hamowanie aktywności β-galaktozydazy po inkubacji z witaminą K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> w modelu replikacyjnego starzenia się komórek nie korelowało z poprawą zdolności proliferacji komórek (**Rycina 4**). Należy jednak podkreślić, iż badanie to obejmowało krótki czas inkubacji z witaminą K, wynoszący odpowiednio 24 godziny dla śródbłonna lub 48 godzin dla komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia. Biorąc pod uwagę, że średni obserwowany czas podwojenia liczby komórek w fazie nazywanej „pre-senescence”, czyli fazie obejmującej 3-4 pasażę przed całkowitym zahamowaniem proliferacji, wynosił 5-6 dni, sugerujemy, że dłuższa obserwacja po podaniu witaminy K, lub wydłużenie czasu inkubacji z witaminami mogłoby pozwolić na zaobserwowanie również efektów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> związanych z proliferacją.

Jednym z głównych wyzwalaczy kaskad sygnałowych prowadzących w konsekwencji do starzenia się komórek jest uszkodzenie DNA [116], którego przyczyną może być też stres oksydacyjny [117]. Jednocześnie, powszechnie wiadomo, że witamina K jest silnym antyoksydantem [118]. W związku z tym, w celu zbadania mechanizmu senolitycznego działania witaminy K, w ramach niniejszej pracy przeanalizowano wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na hamowanie uszkodzeń DNA. Analiza proteomiczna zmian ekspresji białek w komórkach śródbłonna, gdzie uszkodzenie DNA wywołano promieniowaniem rentgenowskim wykazała, że inkubacja naświetlonych komórek zarówno witaminą K<sub>1</sub> jak i K<sub>2</sub> powodowała statystycznie istotne zmiany ekspresji szerokiego spektrum białek zaangażowanych w regulację starzenia się komórek, uszkodzenia/naprawy DNA oraz białek zaangażowanych w odpowiedzi na stres oksydacyjny (**Tabela 4-6**). Podobnie, badania przeprowadzone na komórkach mięśniówki gładkiej ściany naczynia 04/35F/11A, gdzie uszkodzenie DNA wywołano poprzez akumulację prelaminy A, wykazały, że zarówno witaminy K<sub>1</sub>, jak i K<sub>2</sub> zmniejszały ekspresję γH2A.x, związanego z uszkodzeniem DNA. Co ciekawe, jedyne znane dane dotyczące wpływu witaminy K na uszkodzenie DNA dotyczyły działania K<sub>3</sub>. Badania te wykazały, że wysokie dawki witaminy K<sub>3</sub>, działają toksycznie i przyczyniają się do powstawania uszkodzeń DNA [119]. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania nie tylko po raz pierwszy pokazują ochronną funkcję witaminy K w kontekście uszkodzenia DNA, ale również mogą stanowić punkt wyjścia do kolejnych badań, sugerując, że mechanizm ochronny działania witaminy K jest związany z obecnością bocznych łańcuchów prenylowych.

W niniejszych badaniach postawiono hipotezę, że senolityczne działanie witaminy K może być związane z działaniem antyoksydacyjnym. Badania przeprowadzone w modelu starzenia się komórek śródbłonka wywołanego promieniowaniem rentgenowskim faktycznie wykazały, że inkubacja z witaminą K<sub>1</sub>, jak i K<sub>2</sub> zmieniała ekspresję białek zaangażowanych w regulację odpowiedzi na stres oksydacyjny. Jednak, w modelu starzenia wywołanym gromadzeniem prelaminy A w komórkach 04/35F/11A nie obserwowano efektu antyoksydacyjnego żadnej z badanych form witaminy K. Należy jednak nadmienić, iż metoda zastosowana do oceny kondycji komórek, wykorzystująca potrójne barwienie VB-48<sup>TM</sup>•PI•AO pozwala na ocenę aktywności peroksydazy glutationowej. Nie daje więc pełnej informacji o efekcie antyoksydacyjnym, takim jak chociażby wpływ na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej czy katalazy [120,121]. Biorąc pod uwagę obecną w literaturze dyskusję, wskazującą, że witamina K hamuje stres oksydacyjny poprzez regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego Nrf (*Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2*) [112]. W przyszłości należałoby poszerzyć liczbę markerów, aby w pełni odpowiedzieć czy witamina K może ograniczać uszkodzenia DNA poprzez hamowanie stresu oksydacyjnego.

Podsumowując, wyniki badań przeprowadzonych w modelach replikacyjnego starzenia się komórek śródbłonka i replikacyjnego starzenia się komórek mięśniówki gładniej ściany naczynia, wykazały, że zarówno witamina K<sub>1</sub>, jak i K<sub>2</sub> hamowały starzenie się komórek. Za pomocą modeli starzenia się komórek wywołanych uszkodzeniem DNA, wykazano, że mechanizm senolitycznego działania witaminy K był związany z hamowaniem uszkodzeń DNA lub regulacją mechanizmów naprawy DNA.

## 2.2 Działanie przeciwzapalne witaminy K<sub>1</sub> w komórkach ściany naczynia

Stan zapalny towarzyszy większości chorób sercowo-naczyniowych i może istotnie zwiększać ryzyko wystąpienia incydentów sercowych oraz naczyniowych [122–125]. Przyczynia się do tego, nie tylko napływ komórek odpowiedzi immunologicznej, ale również zapalna aktywacja komórek ściany naczynia. Penetracja tkanki przez makrofagi, jest uważana za jeden z wyzwalaczy wczesnych faz procesu miażdżycowego. Makrofagi na obszarze blaszki miażdżycowej są następnie przekształcane w komórki piankowate, przyczyniając się w konsekwencji do progresji miażdżycy [126]. Poza napływem komórek zapalnych, równie ważnym czynnikiem ryzyka wystąpienia i rozwoju chorób sercowo-naczyniowych jest proces zapalny dotyczący samej tkanki naczyniowej. Szereg badań potwierdza, że wysoki poziom molekuł adhezyjnych oraz aktywacja metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej koreluje ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym [127–131].

Prawdą jest, że już wcześniej wykazano, iż witamina K może hamować aktywację komórek odpowiedzi zapalnej, jednak, dotychczasowe prace obejmowały wyłącznie wpływ witaminy K na produkcję cytokin [17,18,132] i skupiały się głównie na analizie działania przeciwzapalnego witaminy K<sub>2</sub>. W ramach niniejszej pracy, rozszerzono analizę dotyczącą przeciwzapalnego działania witaminy K również o witaminę: K<sub>1</sub>. Badania wykazały, że poza opisanym wcześniej hamowaniem produkcji cytokin [17], zarówno witamina K<sub>1</sub> jak i K<sub>2</sub> regulowały aktywację szlaków zapalnych NOS-2 i COX-2, a także obniżały ekspresję związanych z zapaleniem metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. Co ciekawe, mimo wcześniejszych doniesień, przypisujących działanie przeciwzapalne głównie witaminie K<sub>2</sub>, dla większości badanych markerów zapalenia takich jak: produkcja tlenku azotu, produkcja eikozanoidów oraz cytokin odnotowano silniejsze działanie przeciwzapalne witaminy K<sub>1</sub>, niż K<sub>2</sub>, wskazując że również witamina K<sub>1</sub> działa przeciwzapalnie.

Pomimo tego, że znacząca większość dotychczasowych publikacji, dotyczących przeciwzapalnego działania witaminy K skupiała się na komórkach stanu zapalnego, to istniały przesłanki, że działanie to może obejmować również hamowanie prozapalnej aktywacji innych typów komórek, takich jak fibroblasty czy osteocyty [133,134]. Co więcej, badania *in vivo*, u ludzi, wykazały także, że poziom witaminy K<sub>1</sub> odwrotnie korelował ze stężeniem ICAM-1 we krwi (Shea et al. 2008). W związku z tym, w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej poszerzono analizę przeciwzapalnych efektów witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> o zbadania ich wpływu na komórki śródbłonna stymulowane prozapalnie przy użyciu TNF. Wyniki zaprezentowane na **Rycinie 8**, potwierdziły, że zarówno witamina K<sub>1</sub>, jak i witamina K<sub>2</sub>, hamowały adhezję monocytów do aktywowanych prozapalnie komórek śródbłonna oraz ekspresję ICAM-1, co jest zgodne z wcześniejszą obserwacją Shea i wsp. (2008) dotyczącą wpływu witaminy K<sub>1</sub> na regulację ekspresji molekuł adhezyjnych [41].

Wartym podkreślenia jest fakt, iż podobnie jak w aktywowanych prozapalnie makrofagach (**Rycina 10**), również w śródbłonku, zarówno witamina K<sub>1</sub>, jak i K<sub>2</sub> hamowały ekspresję białka COX-2 oraz produkcję PGE<sub>2</sub>. Co prawda wcześniej istniały już badania wskazujące na to, że w mysich komórkach mikrogleju witamina K<sub>2</sub>(MK-4) zmniejszała wywołaną rotenonem ekspresję COX-2 (linii komórkowej BV2) oraz produkcję prostaglandy H w komórkach osteoblastów [133,135]. Jednak, uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wyniki, według naszej wiedzy, po raz pierwszy opisują wpływ witaminy K<sub>1</sub> na regulację ekspresji COX-2 i produkcję eikozanoidów w komórkach śródbłonna. Zgromadzone wyniki uzyskane w dwóch różnych modelach zapalenia, pozwalają przypuszczać, że korzystne

działanie witaminy K<sub>2</sub> [133,135], ale również witaminy K<sub>1</sub> na śródbłonek naczyniowy, może być związane z ich działaniem przeciwzapalnym.

Jak wspomniano we wstępie, głównym mechanizmem działania witaminy K jest funkcja kofaktora enzymu VKOR w zależnej od witaminy K potranslacyjnej karboksylacji białek [136]. W kontekście mechanizmu przeciwzapalnego działania witaminy K, udział zależnej od witaminy K karboksylacji białek został podany w wątpliwość. Początkowo, co prawda wskazywano, że białko GRP, należące do grupy białek zależnych od witaminy K może hamować zapalenie, jednakże, przeciwzapalne działanie tego białka odnotowano zarówno dla formy karboksylowej, jak i niekarboksylowanej [137]. Podobnie, w komórkach THP-1 stymulowanych LPS, działanie przeciwzapalne witaminy K utrzymywało się niezależnie od obecności warfaryny, oraz acenokumarolu, które blokują enzym aktywność enzymu VKOR, uniemożliwiając redukcję witaminy K, w konsekwencji hamując karboksylację [12,18], wykluczając udział zależnej od witaminy K karboksylacji w efekcie przeciwzapalnym.

Inny mechanizm, który potencjalnie mógłby odpowiadać za przeciwzapalne działanie witaminy K to rola ligandu dla jądrowego receptora steroidów i ksenobiotyków (SXR), znana między innymi z regulacji metabolizmu wapnia [138]. Jednakże biorąc pod uwagę znacznie wyższe powinowactwo witaminy K<sub>2</sub>, niż witaminy K<sub>1</sub> do receptora SXR [32,139] przy podobnym potencjale przeciwzapalnym obu form witaminy wykazany w niniejszych badaniach, mechanizm ten wydaje się mało prawdopodobny.

Ohsaki i wsp. (2010) wykazali, że witamina K<sub>2</sub>(MK-4) może regulować fosforylację IKK $\alpha/\beta$  [18], wskazując, że mechanizm przeciwzapalnego działania witaminy K jest związany z hamowaniem aktywności NF $\kappa$ B. W kontekście wyników uzyskanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, mechanizm ten wydaje się prawdopodobny. Powszechnie wiadomo bowiem, że NF $\kappa$ B odgrywa nadrzędną rolę w regulacji wielu szlaków zapalnych w tym takich jak ekspresja NOS-2, COX-2, ekspresja molekuł adhezyjnych, produkcja cytokin oraz ekspresji i aktywności metaloproteinaz [140–142], co jest zgodne z profilem przeciwzapalnego działania witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> wykazany w tej pracy w makrofagach jak i w komórkach śródbłonna (**Rycina 8 i Rycina 10**). Co więcej, w tej pracy potwierdzono wpływ witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub> na aktywność czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B poprzez wykazanie, że obie witaminy hamowały jądrową translokację NF $\kappa$ B. Zgodnie z naszą wiedzą są to pierwsze wyniki wskazujące na to że nie tylko witamina K<sub>2</sub>, ale także witamina K<sub>1</sub> może wywierać działanie przeciwzapalnie poprzez hamowanie aktywności NF $\kappa$ B.

Podsumowując, badania nad przeciwzapalnym działaniem witaminy K, przeprowadzone w makrofagach i komórkach śródbłonna wykazały, że profil przeciwzapalnego działania witaminy K<sub>1</sub> jest porównywalny do działania witaminy K<sub>2</sub>. W szczególności, zarówno witamina K<sub>1</sub>, jak i K<sub>2</sub> hamowały szerokie spektrum szlaków zapalnych obejmujących: produkcję cytokin, ekspresję i aktywność NOS-2 i COX-2, ekspresję metaloproteinaz i molekuł adhezyjnych. W niniejszej pracy wskazano również, że mechanizm przeciwzapalnego działania zarówno w makrofagach jak i komórkach śródbłonna, może, polegać na regulacji aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB.

### **3. Wychwyt i endogenna konwersja witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczynia**

Witaminie K<sub>2</sub> przypisuje się liczne funkcje pozawątrobowe, Jednak główną formą dostępną w pożywieniu, a zatem spożywaną przez człowieka w największej ilości, jest witamina K<sub>1</sub> [77]. Jednocześnie, suboptymalne stężenie witaminy K<sub>1</sub> w osoczu może być powszechnym zjawiskiem, a stężenie witaminy K<sub>1</sub> w osoczu jest odwrotnie skorelowane z ryzykiem sercowo-naczyniowym [23,24,66,67]. Wyniki badań przeprowadzonych w tej pracy doktorskiej, wykazały, że niedobór witaminy K<sub>1</sub> skutkowało upośledzeniem czynności śródbłonna (**Rycina 13**), ale witamina K<sub>1</sub> nie była wykrywalna w ścianie aorty u myszy, niezależnie od zawartości witaminy K<sub>1</sub> w diecie (**Rycina 11**). Jednakże inkubacja izolowanej aorty *ex vivo* i komórek ściany naczynia *in vitro* z egzogenną witaminą K<sub>1</sub>, powodowała wyraźny wzrost poziomu witaminy K<sub>1</sub> w tkance i komórkach (**Rycina 16**). Dane te sugerują, że witamina K<sub>1</sub>, która była dotąd uważana za formę działającą w wątrobie [21], jeśli jest dostępna w krążeniu, może być wychwytywana przez ścianę naczyń krwionośnych i może bezpośrednio wpływać na czynność śródbłonna.

Upośledzenie czynności śródbłonna wywołane niedoborem witaminy K<sub>1</sub> korelowało nie tylko z obniżeniem poziomu witaminy K<sub>1</sub> w osoczu i wątrobie, ale także obniżeniem poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w aorcie, która była dominującą formą w aorcie, przy niewykrywalnej witaminie K<sub>1</sub> (**Rycina 12**). Równocześnie, powszechnie wiadomo, że witamina K<sub>1</sub> stanowi substrat do endogennej produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) np. w mózgu [13]. W związku z tym, w niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia czy porównywalne, naczynioprotekcyjne działanie witaminy K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>, może być związane z endogenną konwersją witamin K<sub>1</sub> w witaminę K<sub>2</sub>(MK-4). Biorąc pod uwagę fakt, że bakterie jelitowe są głównym miejscem syntezy endogennych witamin z grupy K<sub>2</sub> [74], dokonano analizy produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) nie tylko ścianie aorty, której dotyczył efekt terapeutyczny witaminy K<sub>1</sub>, ale również w kale. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, analiza poziomów witaminy K w mysim kale

potwierdziła, że bakterie jelitowe były zdolne do produkcji różnych form witaminy K<sub>2</sub> (w szczególności witaminy K<sub>2</sub>(MK-6) i K<sub>2</sub>(MK-9)) (**Rycina 15**), jednak poziom witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w kale był poniżej progu detekcji, we wszystkich grupach myszy, niezależnie od zawartości witaminy K<sub>1</sub> w diecie. Biorąc pod uwagę, że witamina K<sub>2</sub>(MK-4) jest, najpowszechniej występującą formą witaminy K w ścianie naczyń krwionośnych, wynik ten jednoznacznie wskazuje, że bakterie jelitowe nie mogły stanowić źródła witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) dla naczyń krwionośnych.

Opierając się na doniesieniach wskazujących na to, że nie tylko bakterie jelitowe, ale również niektóre typy tkanek i komórek [13,143] są w stanie przekształcać witaminę K<sub>1</sub> w witaminę K<sub>2</sub>(MK-4), wciąż pozostawało niejasne czy witamina K<sub>1</sub> jest bezpośrednio zużywana przez ścianę naczyń krwionośnych czy jest przekształcana w witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) w tkance naczyniowej. Badania *ex vivo* w niniejszej pracy wykazały, że witamina K<sub>1</sub> może być przekształcana w witaminę K<sub>2</sub>(MK-4) w ścianie naczyń krwionośnych (**Rycina 16 E**). Co prawda, wcześniej, wykazano, że spożycie witaminy K<sub>1</sub> u zwierząt pozbawionych bakterii jelitowych skutkowało wzrostem poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w tkankach, między innymi w ścianie naczyń krwionośnych [107]. Jednak, podawanie witaminy K<sub>1</sub> skutkowało również wzrostem poziomu witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w innych narządach takich jak serce, trzustka i mózg, dlatego pozostawało niejasne czy witamina K<sub>2</sub>(MK-4) jest produkowana bezpośrednio na w ścianie naczyń krwionośnych czy jest jedynie transportowana z innych tkanek zdolnych do jej syntezy. W związku z tym, badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej, po raz pierwszy jednoznacznie dowiodły, że ściana naczyń krwionośnych jest zdolna do syntezy endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4).

Zaskakującym znaleziskiem tej pracy, była obserwacja, że w warunkach *in vitro* nie stwierdzono konwersji witaminy K<sub>1</sub> do endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4), ani w komórkach śródbłonna, ani w komórkach mięśniówki gładkiej ściany naczynia (**Rycina 16 F, G**). W obu typach badanych komórek odnotowano natomiast syntezę witaminy K<sub>2</sub>(MK-4), po inkubacji z witaminą K<sub>3</sub>. Wyniki te, sugerują, że w warunkach *in vitro*, komórki nie posiadają odpowiednich enzymów pozwalających na odcięcie łańcucha bocznego witaminy K<sub>1</sub>, w celu uwolnienia menadionu, stanowiącego bezpośredni substrat do prenylacji, skutkującej syntezą witaminy K<sub>2</sub>(MK-4), a tego typu mechanizmy opisano w komórkach nabłonka jelitowego [144] i być może istnieją też w komórkach śródbłonna naczyniowego. Produkcja witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) po podaniu gotowej do prenylacji witaminy K<sub>3</sub>, stanowi jednak dowód na zdolność tych komórek do syntezy endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) (**Rycina 16 J, K**). Dodatkowo, hamowanie produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) przez statyny w HAEC i RAW 264.7 (**Rycina 16 J**,



**K)**, wskazuje na klasyczną ścieżkę syntezy z zaangażowaniem UBIAD-1, potwierdzając wcześniejsze badania dotyczące mechanizmu produkcji witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) przez komórki śródbłonna [14,145].

Podsumowując, wyniki badań przeprowadzonych w ramach tej pracy potwierdziły, że witamina K<sub>1</sub> może być wychwytywana przez ścianę naczyń krwionośnych. Jednocześnie odnotowano produkcję witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) z witaminy K<sub>1</sub> na terenie ściany naczynia. Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić czy działanie naczyioprotekcyjne witaminy K<sub>1</sub> wynikało z bezpośredniego działania witaminy K<sub>1</sub> czy z endogennie syntetyzowanej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4). Obie ścieżki wydają się możliwe i prawdopodobnie mogą być wykorzystywane zamiennie lub komplementarne. Należy jednak podkreślić, że niezależnie, od tego który z tych mechanizmów jest dominujący, niepodważalnym pozostaje fakt, że witamina K<sub>1</sub> jest niezbędna do utrzymania prawidłowej czynności śródbłonna i jej niedobór w diecie może przyczyniać się do rozwoju dysfunkcji śródbłonna.

#### **4. Zastosowanie hialuronowych nanokapsuł o olejowym rdzeniu**

##### **K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 w celu poprawy efektywności dostarczania witaminy K<sub>1</sub> do naczyń**

Biodostępność hydrofobowych leków takich jak witamina K<sub>1</sub>, po podaniu doustnym, jest ograniczona przez wiele czynników [73]. W przypadku witaminy K<sub>1</sub> obok słabej rozpuszczalności w wodzie można wymienić endogenną konwersję (głównie w jelicie) oraz uzależnienie transportu od lipoprotein osocza [13,102]. Warto nadmienić, że dostępne dane zgodnie wiążą niedobór witaminy K<sub>1</sub> ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym, niespójności dotyczą natomiast badań, w których analizowano wpływ przyjmowania witaminy K<sub>1</sub> na poprawę czynności naczyń krwionośnych [23,58,65–67]. W związku z tym, w niniejszej pracy doktorskiej sformułowano hipotezę badawczą, upatrującą przyczyn niespójności wyników dotyczących naczyioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> w ograniczonej biodostępności witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń krwionośnych. Podjęto więc próbę poprawy biodostępności witaminy K<sub>1</sub> poprzez zastosowanie hialuronowych kapsuł o olejowym rdzeniu, w celu określenia czy może ona poprawić efekt terapeutyczny witaminy K<sub>1</sub>.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały, że upośledzenie czynności śródbłonna wynikające z niedoboru witaminy K<sub>1</sub>, można odwrócić poprzez długotrwałe uzupełnianie witaminy K<sub>1</sub> w diecie (**Rycina 12**). Dlatego, stosując analogiczny model niedoboru witaminy K<sub>1</sub>, podjęto próbę poprawy naczyniowego dostarczania witaminy

K<sub>1</sub> i określenia jak poprawa biodostępności wpływa na efekt naczynioprotekcyjny. W niniejszej pracy jako nośnik witaminy K<sub>1</sub>, zastosowano hialuronowe nanokapsuły o olejowym rdzeniu, dla których wykazano wcześniej wysoką skuteczność, w dostarczaniu kurkuminy do ściany naczyń krwionośnych [88]. Otoczkę nanokapsuł, podobnie jak w przypadku wcześniejszych zastosowań stanowił zmodyfikowany hialuronian [86–88], natomiast zawartość w niniejszym badaniu zastąpiono olejowym rdzeniem zawierającym witaminę K<sub>1</sub> rozpuszczoną w oleju kukurydzianym (K<sub>1</sub>-Oil-HyC12). Ze względu na to, że na podstawie wcześniejszych doniesień spodziewano się, że otoczka nanokapsuł może determinować ich wysokie powinowactwo do śródbłonna naczyniowego, jako kontrolny nośnik użyto witaminy K<sub>1</sub> rozpuszczonej w oleju bez hialuronianu (K<sub>1</sub>-Oil) [85,88].

Dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> za pomocą nanokapsuł na bazie hialuronianu z rdzeniem olejowym (K<sub>1</sub>.Oil-HyC12), odwróciło wywołane niedoborem witaminy K<sub>1</sub> upośledzenie czynności śródbłonna naczyniowego u myszy, w ciągu 7 dni (**Rycina 18**) podczas gdy witamina K<sub>1</sub> podawana w olejowej zawieszynie bez hialuronianu (K<sub>1</sub>-Oil), po takim samym czasie podawania była nieskuteczna. Przywrócenie czynności śródbłonna u myszy z niedoborem witaminy K<sub>1</sub> po 7 dniach podawania K<sub>1</sub>.Oil-HyC12, stanowiło także znaczne przyspieszenie osiągnięcia efektu terapeutycznego w porównaniu z konwencjonalnym uzupełnianiem witaminy K<sub>1</sub> w diecie, gdzie efekt naczynioprotekcyjny osiągnięto wykazano po 5 tygodniach żywienia (**Rycina 11**). Poprawa czynności śródbłonna u myszy, którym podawano przez 7 dni K<sub>1</sub>.Oil-HyC12 korelowała z wyższym poziomem witaminy K<sub>1</sub> w osoczu i wątrobie w porównaniu z grupą, której podawano K<sub>1</sub>.Oil oraz wykrywalnym poziomem witaminy K<sub>1</sub> w aorcie (u 2 z 6 w grupie) osobników w porównaniu z wszystkimi innymi grupami (**Rycina 17**).

Istnieje szereg czynników, które mogły przyczynić się do poprawy biodostępności i przyspieszenia efektu działania witaminy K<sub>1</sub> dostarczanej w postaci hialuronowych kapsuł, w porównaniu z witaminą K<sub>1</sub> dostarczaną w postaci niekapsułkowanej.

Ogólnoustrojowa biodostępność witaminy K<sub>1</sub> była zwiększona, o czym świadczy wyższy poziom witaminy K<sub>1</sub> w osoczu po 7 podaniach K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, w porównaniu do K<sub>1</sub>-Oil. Mogło to być spowodowane tym, że nanokapsuły na bazie hialuronianu zwiększają biodostępność związków hydrofobowych w osoczu, jak sugerowano we wcześniejszym badaniu, dotyczącym kapsułkowanej kurkuminy [88]. Wcześniejsze doniesienia [88,146,147] sugerowały, że kapsułkowanie może zwiększać biodostępność hydrofobowych związków, jakim jest witamina K<sub>1</sub>. Rdzeń nanokapsuł zawierający olej zapewnia wysoką rozpuszczalność hydrofobowych substancji takich jak witamina K<sub>1</sub>. Hialuronowa otoczka nanokapsuł wykazuje

wysoką odporność na pH kwasu żołądkowego w przewodzie pokarmowym [73,87,88,146–148]. Ograniczenie uwalniania witaminy K<sub>1</sub> w przewodzie pokarmowym, zmniejsza możliwość jej wychwytu w jelicie konwersji przez bakterie jelitowe, co istotnie zwiększa szanse na dostarczenie jej w niezmienionej formie do tkanek docelowych.

Nanokapsuły na bazie hialuronianu zwiększały również poziom witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie skuteczniej niż K<sub>1</sub>-Oil (**Rycina 17 B**). Podobnej obserwacji dokonali wcześniej Szafraniec i wsp., wykazując, że hialuronowe nanokapsuły są wychwytywane przez wątrobę, a wychwyt ten jest dramatycznie zwiększony w sepsie [85], co może być związane ze wzrostem ekspresji receptora hialuronianu w endotoksemicznym uszkodzeniu narządów [149]. Stosunkowo wysoki wychwyt hialuronowych nanokapsuł w wątrobie i wysoki poziom witaminy K<sub>1</sub>, można więc wyjaśnić obecnością receptorów hialuronianu w wielu typach komórek w wątrobie takich jak komórki śródbłonna zatok wątroby (LSEC), komórki Kupffera oraz hepatocyty [150–152] [48]. Biorąc pod uwagę, że zawartość witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie była kilkukrotnie wyższa po podawaniu w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, w porównaniu do K<sub>1</sub>-Oil, poprawa funkcji śródbłonna po podaniu witaminy K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 mogła być częściowo związana ze zwiększoną biodostępnością witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie, która jest głównym rezerwuarem dla witaminy K<sub>1</sub>. Poza wysokim stężeniem witaminy K<sub>1</sub> w wątrobie, obecność znacznej ilości witaminy K<sub>1</sub> w osoczu wskazuje, że nie była ona wyłącznie magazynowana w wątrobie, ale również, wydajniej niż w przypadku dostarczania w K<sub>1</sub>-Oil, transportowana do tkanek docelowych. Biorąc pod uwagę dowody wskazujące na to, że niektóre nanocząstki są w stanie naśladować chylomikrony [153], wydaje się prawdopodobne, że poprawa dostarczania witaminy K<sub>1</sub> do naczyń krwionośnych przy użyciu K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 mogła być po części wywołana niezależniem transportu od lipoprotein.

Zmiany profilu lipidowego, a także polimorfizmy ApoE (odpowiedzialnej za klirens wątrobowy witaminy K), są charakterystyczne dla pacjentów sercowo-naczyniowych [154–156]. Biorąc pod uwagę, że lipoproteiny stanowią główny szlak transportu witaminy K, transport witaminy K<sub>1</sub> do tkanek może być upośledzony u tych pacjentów. W konsekwencji niska biodostępność witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń krwionośnych może dodatkowo pogłębiać istniejącą dysfunkcję śródbłonna. W związku z tym zastosowanie hialuronowych nanokapsuł mogłoby korzystnie wpłynąć na poprawę efektywności dostarczania witaminy K<sub>1</sub> i przez to przyczynić się do uzyskania lepszych efektów terapeutycznych u tych pacjentów.

Nanokapsuły na bazie hialuronianu zastosowane w niniejszym badaniu poprawiały również celowane dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do śródbłonna naczyniowego (**Rycina 17 C**). W grupie myszy, którym podawano K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, u 2 na 6 osobników odnotowano

wykrywalny poziom witaminy K<sub>1</sub> w aorcie, podczas gdy ta forma witaminy K nie była w ogóle wykrywalna w aorcie w innych grupach zwierząt, włącznie ze zwierzętami żywionymi dietą zawierającą witaminę K<sub>1</sub> w dawce zaspokajającej dzienne zapotrzebowanie AIN-93M(+K) i AIN-93M RYŻ(+K). Obserwacja ta, wskazuje na to, że zastosowanie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, zwiększyło także celowane dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do ściany naczyń krwionośnych. Zwiększona biodostępność witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń prawdopodobnie w konsekwencji przyczyniła się do poprawy efektu terapeutycznego przez K<sub>1</sub>-Oil-HyC12. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, zwiększony wychwyty naczyniowy był prawdopodobnie związany z wysokim powinowactwem hialuronowej otoczki nanokapsuł do glikokaliksu śródbłonna, który również jest w znacznej części zbudowany z hialuronianu [88,157]. Wysokie powinowactwo hialuronowej otoczki do glikokaliksu potwierdzono w badaniach Czyżyńskiej-Cichoń i wsp., przy użyciu nanokapsuł znakowanych fluorem, wykrywalnych w aorcie za pomocą rezonansu magnetycznego [88]. Chociaż w tym badaniu nanokapsuły nie zostały wykryte w całości w ścianie naczyń, to składniki nanokapsuł wykryte w aorcie, sugerują, ich naczyniowe dostarczanie [34]. Mechanizm wychwyty hialuronowych nanokapsuł nie został dotąd wyjaśniony, chociaż jednym z najbardziej prawdopodobnych mechanizmów jest wychwyty za pośrednictwem receptorów hialuronianu [141,158].

Istnieje zatem szereg mechanizmów, które mogły przyczynić się do przyspieszenia odwrócenia dysfunkcji śródbłonna, gdy witamina K<sub>1</sub> była podawana w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12. Jednak niezależnie od dokładnego mechanizmu leżącego u podstaw przedstawionych obserwacji, uzyskane wyniki sugerują, że poprawa naczynioprotekcyjnego efektu witaminy K<sub>1</sub>, gdy była podawana w formie K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 mogła być spowodowana częściowo celowanym dostarczaniem nanokapsuł do ściany naczyń, a częściowo poprawą ogólnoustrojowej biodostępnością witaminy K<sub>1</sub>.

Wyniki niniejszych badań dostarczyły dowodów na to że, nanokapsuły na bazie hialuronianu z rdzeniem olejowym K<sub>1</sub>-Oil-HyC12, zwiększają biodostępność witaminy K<sub>1</sub> i w konsekwencji przyczyniają się do poprawy jej korzystnego działania na naczynia krwionośne i poprawy czynności śródbłonna. Uzyskane wyniki potwierdzają, że K<sub>1</sub>-Oil-HyC12 stanowią obiecujący nośnik, który mógłby być stosowany w celu dostarczenia witaminy K<sub>1</sub> w celu poprawy czynności śródbłonna przez witaminę K<sub>1</sub> i wspomaganie terapii sercowo-naczyniowych lub terapii innych chorób związanych z klinicznie istotnym niedoborem witaminy K<sub>1</sub>. Dlatego też część wyników niniejszego badania oraz dodatkowe wyniki nie prezentowane w tej pracy razem stanowią podstawę przygotowywanego zgłoszenia patentowego.

Opisane w tej pracy wyniki wskazują na to, że efektywne dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> do ściany naczyń i jej wysoka biodostępność jest kluczowa do osiągnięcia jej efektu terapeutycznego na śródbłonek naczyniowy. Tym samym można sądzić, że wcześniejsze niespójne wyniki dotyczące jej działania naczynioprotekcyjnego mogły być spowodowane ograniczonym przyswajaniem lub nieoptymalną biodostępnością witaminy K<sub>1</sub>.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że witamina K<sub>1</sub> wykazuje porównywalne działanie naczynioprotekcyjne do witaminy K<sub>2</sub>, poprzez hamowanie starzenia się komórek i działanie przeciwzapalne, a jej dostarczenie w diecie jest niezbędne do utrzymania prawidłowej czynności śródbłonna naczyniowego. Biorąc pod uwagę, iż suboptymalny poziom witaminy K<sub>1</sub> jest stosunkowo powszechnym zjawiskiem szczególnie u osób starszych i pacjentów sercowo-naczyniowych a procesy starzenia się komórek ściany naczyń krwionośnych i procesy zapalne są bezpośrednio związane z ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, warto na nowo otworzyć dyskusję na temat zaleceń żywieniowych dotyczących spożycia witaminy K<sub>1</sub>, w kontekście jej naczynioprotekcyjnego działania, szczególnie u osób starszych i pacjentów sercowo-naczyniowych. Obiecującym nośnikiem, do dostarczania witaminy K<sub>1</sub>, który mógłby wspomóc terapię u tych pacjentów, są hialuronowe nanokapsuły, których skuteczność w efektywnym dostarczaniu witaminy K<sub>1</sub> wykazano w tej pracy.

## VI Wnioski

Witamina K<sub>1</sub> wykazuje działanie naczynioprotekcyjne.

Mechanizm naczynioprotekcyjnego działania witaminy K<sub>1</sub> podobnie do witaminy K<sub>2</sub>, może być związany z jej działaniem senolitycznym, obejmującym hamowanie uszkodzeń DNA oraz działaniem przeciwzapalnym obejmującym regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego NFκB.

Witamina K<sub>1</sub> jest niezbędna do utrzymania czynności śródbłonna w warunkach normo i dyslipidemii. Działanie witaminy K<sub>1</sub> na czynność śródbłonna może być związane z bezpośrednią aktywnością witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczynia albo wynikać z tego, że witamina K<sub>1</sub> pełni rolę substratu do produkcji endogennej witaminy K<sub>2</sub>(MK-4) w ścianie naczynia.

Hialuronowe kapsuły o olejowym rdzeniu zawierające witaminę K<sub>1</sub> stanowią obiecujący nośnik do terapeutycznego zastosowanie witaminy K<sub>1</sub>, pozwalający na poprawę jej biodostępności ogólnoustrojowej i w ścianie naczynia, a przede wszystkim znaczne przyspieszenie odwrócenia dysfunkcji śródbłonna wynikającej z niedoboru witaminy K<sub>1</sub>.

Efektywne dostarczanie witaminy K<sub>1</sub> jest kluczowe do uzyskania naczynioprotekcyjnego efektu terapeutycznego, co może tłumaczyć wcześniejsze niespójne doniesienia literaturowe w tym zakresie, wskazując na to, że brak jej skuteczności naczynioprotekcyjnej był spowodowany ograniczoną biodostępnością witaminy K<sub>1</sub> w ścianie naczyń krwionośnych.

## VII Literatura

1. Gröber, U.; Reichrath, J.; Holick, M.F.; Kisters, K. Vitamin K: An old vitamin in a new perspective. *Dermatoendocrinol.* **2014**, doi:10.4161/19381972.2014.968490.
2. Maxfield, L.; Crane, J.S. Vitamin C Deficiency. In; Treasure Island (FL), 2022.
3. Langan, R.C.; Goodbred, A.J. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *Am. Fam. Physician* **2017**, *96*, 384–389.
4. Sizar, O.; Khare, S.; Goyal, A.; Givler, A. Vitamin D Deficiency. In; Treasure Island (FL), 2022.
5. Wiley, K.D.; Gupta, M. Vitamin B1 Thiamine Deficiency. In; Treasure Island (FL), 2022.
6. Shampo, M.A.; Kyle, R.A. Henrik Dam--Discoverer of Vitamin K. *Mayo Clin. Proc.* **1998**, *73*, 46, doi:10.1016/s0025-6196(11)63617-3.
7. Ferland, G. *Vitamin K, an emerging nutrient in brain function*; 2012; Vol. 38, pp. 151–157;.
8. Mladěnka, P.; Macáková, K.; Kujovská Krčmová, L.; Javorská, L.; Mrštná, K.; Carazo, A.; Protti, M.; Remião, F.; Nováková, L. Vitamin K - sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity. *Nutr. Rev.* **2022**, *80*, 677–698, doi:10.1093/nutrit/nuab061.
9. Turck, D.; Bresson, J.L.; Burlingame, B.; Dean, T.; Fairweather-Tait, S.; Heinonen, M.; Hirsch-Ernst, K.I.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H.J.; Naska, A.; et al. Dietary reference values for vitamin K. *EFSA J.* **2017**, *15*, doi:10.2903/j.efsa.2017.4780.
10. Conly, J.M.; Stein, K. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog. Food Nutr. Sci.* 1992.
11. Harshman, S.G.; Kyla Shea, M.; Fu, X.; Grusak, M.A.; Smith, D.; Lamon-Fava, S.; Kuliopulos, A.; Greenberg, A.; Booth, S.L. Atorvastatin decreases renal menaquinone-4 formation in C57BL/6 Male mice. *J. Nutr.* **2019**, doi:10.1093/jn/nxy290.
12. Kieronska-Rudek, A.; Kij, A.; Kaczara, P.; Tworzydło, A.; Napiorkowski, M.; Sidoryk, K.; Chlopicki, S. Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line. *Cells* **2021**, *10*, 1571, doi:10.3390/cells10071571.
13. Hirota, Y.; Tsugawa, N.; Nakagawa, K.; Suhara, Y.; Tanaka, K.; Uchino, Y.; Takeuchi, A.; Sawada, N.; Kamao, M.; Wada, A.; et al. Menadione (vitamin K3) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K1) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K2) in rats. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 33071–33080, doi:10.1074/jbc.M113.477356.
14. Hegarty, J.M.; Yang, H.; Chi, N.C. UBIAD1-mediated vitamin K2 synthesis is required for vascular endothelial cell survival and development. *Dev.* **2013**, doi:10.1242/dev.093112.
15. Nakagawa, K.; Hirota, Y.; Sawada, N.; Yuge, N.; Watanabe, M.; Uchino, Y.; Okuda, N.; Shimomura, Y.; Suhara, Y.; Okano, T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* **2010**, doi:10.1038/nature09464.
16. Kotaro Azuma, S.I. Vitamin K, SXR, and GGCX. *Intech* **2012**, 13.
17. Pan, M.H.; Maresz, K.; Lee, P.S.; Wu, J.C.; Ho, C.T.; Popko, J.; Mehta, D.S.; Stohs, S.J.; Badmaev, V. Inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  by Pretreatment of Human Monocyte-Derived Macrophages with Menaquinone-7 and Cell Activation with TLR Agonists in Vitro. *J. Med. Food* **2016**, *19*, 663–669, doi:10.1089/jmf.2016.0030.
18. Ohsaki, Y.; Shirakawa, H.; Miura, A.; Giriwono, P.E.; Sato, S.; Ohashi, A.; Iribe, M.; Goto, T.; Komai, M. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression

- of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor  $\alpha$ B through the repression of IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation. *J. Nutr. Biochem.* **2010**, *21*, 1120–1126, doi:10.1016/j.jnutbio.2009.09.011.
19. Cirilli, I.; Orlando, P.; Marcheggiani, F.; Dlundla, P. V.; Silvestri, S.; Damiani, E.; Tiano, L. The protective role of bioactive quinones in stress-induced senescence phenotype of endothelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Antioxidants* **2020**, doi:10.3390/antiox9101008.
  20. Bar, A.; Kus, K.; Manterys, A.; Proniewski, B.; Sternak, M.; Przyborowski, K.; Moorlag, M.; Sitek, B.; Marczyk, B.; Jaształ, A.; et al. Vitamin K2-MK-7 improves nitric oxide-dependent endothelial function in ApoE/LDLR $^{-/-}$  mice. *Vascul. Pharmacol.* **2019**, doi:10.1016/j.vph.2019.106581.
  21. Napolitano, M.; Mariani, G.; Lapecorella, M. Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors. *Orphanet J. Rare Dis.* 2010.
  22. Beulens, J.W.J.; Bots, M.L.; Atsma, F.; Bartelink, M.L.E.L.; Prokop, M.; Geleijnse, J.M.; Wittteman, J.C.M.; Grobbee, D.E.; van der Schouw, Y.T. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis* **2009**, *203*, 489–493, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.010.
  23. Shea, M.K.; Booth, S.L.; Weiner, D.E.; Brinkley, T.E.; Kanaya, A.M.; Murphy, R.A.; Simonsick, E.M.; Wassel, C.L.; Vermeer, C.; Kritchevsky, S.B. Circulating vitamin K is inversely associated with incident cardiovascular disease risk among those treated for hypertension in the health, aging, and body composition study (Health ABC). *J. Nutr.* **2017**, *147*, 888–895, doi:10.3945/jn.117.249375.
  24. Erkkilä, A.T.; Booth, S.L.; Hu, F.B.; Jacques, P.F.; Manson, J.E.; Rexrode, K.M.; Stampfer, M.J.; Lichtenstein, A.H. Phylloquinone intake as a marker for coronary heart disease risk but not stroke in women. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2005**, *59*, 196–204, doi:10.1038/sj.ejcn.1602058.
  25. Upadhyay, A.; Fontes, F.L.; Gonzalez-Juarrero, M.; McNeil, M.R.; Crans, D.C.; Jackson, M.; Crick, D.C. Partial saturation of menaquinone in mycobacterium tuberculosis: Function and essentiality of a novel reductase, MenJ. *ACS Cent. Sci.* **2015**, *1*, 292–302, doi:10.1021/acscentsci.5b00212.
  26. Koehn, J.T.; Crick, D.C.; Crans, D.C. Synthesis and Characterization of Partially and Fully Saturated Menaquinone Derivatives. *ACS Omega* **2018**, *3*, 14889–14901, doi:10.1021/acsomega.8b02620.
  27. Cenci, U.; Qiu, H.; Pillonel, T.; Cardol, P.; Remacle, C.; Colleoni, C.; Kadouche, D.; Chabi, M.; Greub, G.; Bhattacharya, D.; et al. Host-pathogen biotic interactions shaped vitamin K metabolism in Archaeplastida. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14, doi:10.1038/s41598-018-33663-w.
  28. Okano, T.; Shimomura, Y.; Yamane, M.; Suhara, Y.; Kamao, M.; Sugiura, M.; Nakagawa, K. Conversion of phylloquinone (vitamin K1) into menaquinone-4 (vitamin K2) in mice: Two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J. Biol. Chem.* **2008**, doi:10.1074/jbc.M702971200.
  29. Nakagawa, K.; Sawada, N.; Hirota, Y.; Uchino, Y.; Suhara, Y.; Hasegawa, T.; Amizuka, N.; Okamoto, T.; Tsugawa, N.; Kamao, M.; et al. Vitamin K2 biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS One* **2014**, doi:10.1371/journal.pone.0104078.
  30. Mishima, E.; Ito, J.; Wu, Z.; Nakamura, T.; Wahida, A.; Doll, S.; Tonnus, W.; Nepachalovich, P.; Eggenhofer, E.; Aldrovandi, M.; et al. A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature* **2022**, *608*, doi:10.1038/s41586-022-05022-3.
  31. Vos, M.; Esposito, G.; Edirisinghe, J.N.; Vilain, S.; Haddad, D.M.; Slabbaert, J.R.; Van



- Meensel, S.; Schaap, O.; De Strooper, B.; Meganathan, R.; et al. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science (80-. )*. **2012**, doi:10.1126/science.1218632.
32. Ichikawa, T.; Horie-Inoue, K.; Ikeda, K.; Blumberg, B.; Inoue, S. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2- activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, doi:10.1074/jbc.M600896200.
  33. Luster, A.D.; Alon, R.; von Andrian, U.H. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1182–1190, doi:10.1038/ni1275.
  34. Claesson-Welsh, L.; Dejana, E.; McDonald, D.M. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol. Med.* **2021**, *27*, 314–331, doi:10.1016/j.molmed.2020.11.006.
  35. Tsalamandris, S.; Antonopoulos, A.S.; Oikonomou, E.; Papamikroulis, G.A.; Vogiatzi, G.; Papaioannou, S.; Deftereos, S.; Tousoulis, D. The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *Eur. Cardiol. Rev.* **2019**, *14*, 50–59, doi:10.15420/ocr.2018.33.1.
  36. Zhao, H.; Wu, L.; Yan, G.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wu, Y.; Li, Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, doi:10.1038/s41392-021-00658-5.
  37. Golia, E.; Limongelli, G.; Natale, F.; Fimiani, F.; Maddaloni, V.; Pariggiano, I.; Bianchi, R.; Crisci, M.; D’Acierno, L.; Giordano, R.; et al. Inflammation and cardiovascular disease: From pathogenesis to therapeutic target. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2014**, *16*, doi:10.1007/s11883-014-0435-z.
  38. Casanova, J.L.; Abel, L. Mechanisms of viral inflammation and disease in humans. *Science (80-. )*. **2021**, *374*, 1080–1086, doi:10.1126/science.abj7965.
  39. Liu, W.; Zhang, L.; Xu, H.J.; Li, Y.; Hu, C.M.; Yang, J.Y.; Sun, M.Y. The anti-inflammatory effects of vitamin D in tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19092736.
  40. Ellulu, M.S.; Rahmat, A.; Patimah, I.; Khaza’Ai, H.; Abed, Y. Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: A randomized controlled trial. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3405–3412, doi:10.2147/DDDT.S83144.
  41. Shea, M.K.; Booth, S.L.; Massaro, J.M.; Jacques, P.F.; D’Agostino, R.B.; Dawson-Hughes, B.; Ordovas, J.M.; O’Donnell, C.J.; Kathiresan, S.; Keaney, J.F.; et al. Vitamin K and vitamin D status: Associations with inflammatory markers in the Framingham offspring study. *Am. J. Epidemiol.* **2008**, doi:10.1093/aje/kwm306.
  42. Cavaco, S.; Viegas, C.S.B.; Rafael, M.S.; Ramos, A.; Magalhães, J.; Blanco, F.J.; Vermeer, C.; Simes, D.C. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 1051–1065, doi:10.1007/s00018-015-2033-9.
  43. Gorgoulis, V.; Adams, P.D.; Alimonti, A.; Bennett, D.C.; Bischof, O.; Bishop, C.; Campisi, J.; Collado, M.; Evangelou, K.; Ferbeyre, G.; et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* **2019**, *179*, 813–827, doi:10.1016/j.cell.2019.10.005.
  44. Wang, J.; Uryga, A.K.; Reinhold, J.; Figg, N.; Baker, L.; Finigan, A.; Gray, K.; Kumar, S.; Clarke, M.; Bennett, M. Vascular smooth muscle cell senescence promotes atherosclerosis and features of plaque vulnerability. *Circulation* **2015**, *132*, 1909–1919, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016457.
  45. Ramírez, R.; Ceprian, N.; Figuer, A.; Valera, G.; Bodega, G.; Alique, M.; Carracedo, J. Endothelial Senescence and the Chronic Vascular Diseases: Challenges and

- Therapeutic Opportunities in Atherosclerosis. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, doi:10.3390/jpm12020215.
46. A.C.Allison The possible role of vitamin K deficiency in the pathogenesis of Alzheimer’s disease and in augmenting brain damage associated with cardiovascular disease. *Med. Hypotheses* **2001**, *57*, 151–155.
  47. Simes, D.C.; Viegas, C.S.B.; Araújo, N.; Marreiros, C. Vitamin K as a powerful micronutrient in aging and age-related diseases: Pros and cons from clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20174150.
  48. Vliegenthart, R.; Oudkerk, M.; Hofman, A.; Oei, H.H.S.; Van Dijck, W.; Van Rooij, F.J.A.; Witteman, J.C.M. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation* **2005**, *112*, 572–577, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488916.
  49. Xu, S.; Ilyas, I.; Little, P.J.; Li, H.; Kamato, D.; Zheng, X.; Luo, S.; Li, Z.; Liu, P.; Han, J.; et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies. *Pharmacol. Rev.* **2021**, *73*, 924–967, doi:10.1124/PHARMREV.120.000096.
  50. Schurgers, L.J.; Joosen, I.A.; Laufer, E.M.; Chatrou, M.L.L.; Herfs, M.; Winkens, M.H.M.; Westenfeld, R.; Veulemans, V.; Krueger, T.; Shanahan, C.M.; et al. Vitamin K-Antagonists Accelerate Atherosclerotic Calcification and Induce a Vulnerable Plaque Phenotype. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0043229.
  51. Proudfoot, D.; Skepper, J.N.; Shanahan, C.M.; Weissberg, P.L. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, *18*, 379–388, doi:10.1161/01.ATV.18.3.379.
  52. Schurgers, L.J.; Barreto, D. V.; Barreto, F.C.; Liabeuf, S.; Renard, C.; Magdeleyns, E.J.; Vermeer, C.; Choukroun, G.; Massy, Z.A. The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: A preliminary report. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *5*, 568–575, doi:10.2215/CJN.07081009.
  53. Khalil, Z.; Alam, B.; Akbari, A.R.; Sharma, H. The medical benefits of vitamin k2 on calcium-related disorders. *Nutrients* **2021**, *13*, 1–17, doi:10.3390/nu13020691.
  54. Hariri, E.; Kassis, N.; Iskandar, J.P.; Schurgers, L.J.; Saad, A.; Abdelfattah, O.; Bansal, A.; Isogai, T.; Harb, S.C.; Kapadia, S. Vitamin K 2-a neglected player in cardiovascular health: A narrative review. *Open Hear.* **2021**, *8*, doi:10.1136/openhrt-2021-001715.
  55. van Ballegooijen, A.J.; Beulens, J.W. The Role of Vitamin K Status in Cardiovascular Health: Evidence from Observational and Clinical Studies. *Curr. Nutr. Rep.* **2017**, *6*, 197–205, doi:10.1007/s13668-017-0208-8.
  56. Haugsgjerd, T.R.; Egeland, G.M.; Nygård, O.K.; Vinknes, K.J.; Sulo, G.; Lysne, V.; Iglund, J.; Tell, G.S. Association of dietary vitamin K and risk of coronary heart disease in middle-age adults: The Hordaland Health Study Cohort. *BMJ Open* **2020**, *10*, 1–11, doi:10.1136/bmjopen-2019-035953.
  57. L, K.; P., G.; A., M.-Z.; M., K.; L., S.; C., V.; K., M.; M., N. Effect of Vitamin K2 on progression of atherosclerosis and vascular calcification in nondialyzed patients with chronic kidney disease stages 3-5. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **2015**, *125*, 631–640.
  58. Geleijnse, J.M.; Vermeer, C.; Grobbee, D.E.; Schurgers, L.J.; Knapen, M.H.J.; Van Der Meer, I.M.; Hofman, A.; Witteman, J.C.M. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: The Rotterdam Study. *J. Nutr.* **2004**, doi:10.1093/jn/134.11.3100.
  59. Knapen, M.H.J.; Braam, L.A.J.L.M.; Drummen, N.E.; Bekers, O.; Hoeks, A.P.G.;

- Vermeer, C. Menaquinone-7 supplementation improves arterial stiffness in healthy postmenopausal women: A double-blind randomised clinical trial. *Thromb. Haemost.* **2015**, *113*, 1135–1144, doi:10.1160/TH14-08-0675.
60. Anthony G. Mansour, Essa Hariri, Yazan Daaboul, Serge Korjian, Andrew El Alam, Athanase D. Protogerou, Hala Kilany, Albert Karam, Antoine Stephan, S.A.B. Vitamin K2 supplementation and arterial stiffness among renal transplant recipients—a single-arm, single-center clinical trial. *J. Am. Soc. Hypertens.* **2017**, *11*, 589–597,.
  61. Witham, M.D.; Lees, J.S.; White, M.; Band, M.; Bell, S.; Chantler, D.J.; Ford, I.; Fulton, R.L.; Kennedy, G.; Littleford, R.C.; et al. Vitamin K supplementation to improve vascular stiffness in CKD: The K4Kidneys randomized controlled trial. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2020**, *31*, 2434–2445, doi:10.1681/ASN.2020020225.
  62. Siltari, A.; Vapaatalo, H. *Vascular Calcification, Vitamin K and Warfarin Therapy – Possible or Plausible Connection?*; 2018; Vol. 122, pp. 19–24;.
  63. Beulens, J.W.J.; Booth, S.L.; Van Den Heuvel, E.G.H.M.; Stoecklin, E.; Baka, A.; Vermeer, C. The role of menaquinones (vitamin K2) in human health. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 1357–1368, doi:10.1017/S0007114513001013.
  64. Bartstra, J.W.; Draaisma, F.; Zwakenberg, S.R.; Lessmann, N.; Wolterink, J.M.; van der Schouw, Y.T.; de Jong, P.A.; Beulens, J.W.J. Six months vitamin K treatment does not affect systemic arterial calcification or bone mineral density in diabetes mellitus 2. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *60*, 1691–1699, doi:10.1007/s00394-020-02412-z.
  65. Villines, T.C.; Hatzigeorgiou, C.; Feuerstein, I.M.; O’Malley, P.G.; Taylor, A.J. Vitamin K1 intake and coronary calcification. *Coron. Artery Dis.* **2005**, *16*, 199–203, doi:10.1097/00019501-200505000-00010.
  66. Bellinge, J.W.; Dalgaard, F.; Murray, K.; Connolly, E.; Blekkenhorst, L.C.; Bondonno, C.P.; Lewis, J.R.; Sim, M.; Croft, K.D.; Gislason, G.; et al. Vitamin k intake and atherosclerotic cardiovascular disease in the danish diet cancer and health study. *J. Am. Heart Assoc.* **2021**, *10*, doi:10.1161/JAHA.120.020551.
  67. 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. Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1799–1807, doi:10.3945/ajcn.2008.27338.
  68. Schurgers, L.J.; Vermeer, C. Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2002**, *1570*, 27–32, doi:10.1016/S0304-4165(02)00147-2.
  69. Mosler, K.; von Kries, R.; Vermeer, C.; Saupe, J.; Schmitz, T.; Schuster, A. Assessment of vitamin K deficiency in CF - How much sophistication is useful? *J. Cyst. Fibros.* **2003**, *2*, 91–96, doi:10.1016/S1569-1993(03)00025-0.
  70. Kohlmeier, M.; Salomon, A.; Saupe, J.; Shearer, M.J. Transport of vitamin K to bone in humans. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 1192–1196, doi:10.1093/jn/126.suppl\_4.1192s.
  71. Ferland, G.; Doucet, I.; Mainville, D. Phylloquinone and menaquinone-4 tissue distribution at different life stages in male and female sprague-dawley rats fed different VK levels since weaning or subjected to a 40% calorie restriction since adulthood. *Nutrients* **2016**, *8*, 1–21, doi:10.3390/nu8030141.
  72. Schurgers, L.J.; Vermeer, C. Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2002**, doi:10.1016/S0304-4165(02)00147-2.
  73. Siew, A.; Le, H.; Thiovolet, M.; Gellert, P.; Schatzlein, A.; Uchegbu, I. Enhanced oral absorption of hydrophobic and hydrophilic drugs using quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 14–28, doi:10.1021/mp200469a.

74. Ellis, J.L.; Karl, J.P.; Oliverio, A.M.; Fu, X.; Soares, J.W.; Wolfe, B.E.; Hernandez, C.J.; Mason, J.B.; Booth, S.L. Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1–16, doi:10.1080/19490976.2021.1887721.
75. Gijsbers, B.L.M.G.; Jie, K.-S.G.; Vermeer, C. Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *Br. J. Nutr.* **1996**, *76*, 223–229, doi:10.1079/bjn19960027.
76. Booth, S.L. Vitamin K: Food composition and dietary intakes. *Food Nutr. Res.* **2012**, *56*, 1–5, doi:10.3402/fnr.v56i0.5505.
77. Schurgers, L.J.; Vermeer, C. Determination of phylloquinone and menaquinones in food: Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis* **2000**, *30*, 298–307, doi:10.1159/000054147.
78. Hoek, A.M. van den; Hoorn, J.W.A. van der; Maas, A.C.; Hoogen, R.M. van den; Nieuwkoop, A. van; Droog, S.; Offerman, E.H.; Pieterman, E.J.; Havekes, L.M.; Princen, H.M.G. APOE\*3Leiden.CETP transgenic mice as model for pharmaceutical treatment of the metabolic syndrome. *Diabetes, Obes. Metab.* **2014**, *16*, 537–544, doi:10.1111/dom.12252.
79. Kühnast, S.; Fiocco, M.; Van Der Hoorn, J.W.A.; Princen, H.M.G.; Jukema, J.W. Innovative pharmaceutical interventions in cardiovascular disease: Focusing on the contribution of non-HDL-C/LDL-C-lowering versus HDL-C-raising A systematic review and meta-analysis of relevant preclinical studies and clinical trials. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *763*, 48–63, doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.089.
80. Westerterp, M.; Van Der Hoogt, C.C.; De Haan, W.; Offerman, E.H.; Dallinga-Thie, G.M.; Jukema, J.W.; Havekes, L.M.; Rensen, P.C.N. Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE\*3-Leiden mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2552–2559, doi:10.1161/01.ATV.0000243925.65265.3c.
81. Zadelaar, S.; Kleemann, R.; Verschuren, L.; De Vries-Van Der Weij, J.; Van Der Hoorn, J.; Princen, H.M.; Kooistra, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1706–1721, doi:10.1161/ATVBAHA.107.142570.
82. Fu, X.; Booth, S.L.; Smith, D.E. Vitamin K contents of rodent diets: A review. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2007**, *46*, 8–12.
83. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939–1951, doi:10.1093/jn/123.11.1939.
84. Fu, X.; Smith, D.; Shen, X.; Booth, S.L. Use of vitamin K-deficient AIN-93 diet is an effective approach to create subclinical vitamin K deficiency in C57BL/6 mice. *Anim. Nutr. Feed Technol.* **2014**, *14*, 421–429, doi:10.5958/0974-181X.2014.01345.6.
85. Szafraniec, J.; Błazejczyk, A.; Kus, E.; Janik, M.; Zajac, G.; Wietrzyk, J.; Chlopicki, S.; Zapotoczny, S. Robust oil-core nanocapsules with hyaluronate-based shells as promising nanovehicles for lipophilic compounds. *Nanoscale* **2017**, *9*, 18867–18880, doi:10.1039/c7nr05851a.
86. Janik-hazuka, M.; Kamiński, K.; Kaczor-kamińska, M.; Szafraniec-szczęsny, J.; Kmak, A.; Kassassir, H.; Watała, C.; Wróbel, M.; Zapotoczny, S. Hyaluronic acid-based nanocapsules as efficient delivery systems of garlic oil active components with anticancer activity. *Nanomaterials* **2021**, *11*, doi:10.3390/nano11051354.
87. Szafraniec-Szczęsny, J.; Janik-Hazuka, M.; Odrobińska, J.; Zapotoczny, S. Polymer capsules with hydrophobic liquid cores as functional nanocarriers. *Polymers (Basel)*.

- 2020, 12, 1–25, doi:10.3390/polym12091999.
88. Czyzyska-Cichon, I.; Janik-Hazuka, M.; Szafraniec-Szczęśny, J.; Jasinski, K.; Węglarz, W.P.; Zapotoczny, S.; Chlopicki, S. Low dose curcumin administered in hyaluronic acid-based nanocapsules induces hypotensive effect in hypertensive rats. *Int. J. Nanomedicine* **2021**, *16*, 1377–1390, doi:10.2147/IJN.S291945.
  89. Panek, A.; Miszczyk, J.; Swakoń, J. Biological effects and inter-individual variability in peripheral blood lymphocytes of healthy donors exposed to 60 MeV proton radiotherapeutic beam. *Int. J. Radiat. Biol.* **2018**, *94*, 1085–1094, doi:10.1080/09553002.2019.1524941.
  90. Kij, A.; Bar, A.; Przyborowski, K.; Proniewski, B.; Mateuszuk, L.; Jaształ, A.; Kieronska-Rudek, A.; Marczyk, B.; Matyjaszczyk-Gwarda, K.; Tworzydło, A.; et al. Thrombin inhibition prevents endothelial dysfunction and reverses 20-hete overproduction without affecting blood pressure in angiotensin ii-induced hypertension in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–18, doi:10.3390/ijms22168664.
  91. Bar, A.; Targosz-Korecka, M.; Suraj, J.; Proniewski, B.; Jaształ, A.; Marczyk, B.; Sternak, M.; Przybyło, M.; Kurpińska, A.; Walczak, M.; et al. Degradation of Glycocalyx and Multiple Manifestations of Endothelial Dysfunction Coincide in the Early Phase of Endothelial Dysfunction Before Atherosclerotic Plaque Development in Apolipoprotein E/Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *J. Am. Heart Assoc.* **2019**, *8*, doi:10.1161/JAHA.118.011171.
  92. Mohaissen, T.; Proniewski, B.; Targosz-Korecka, M.; Bar, A.; Kij, A.; Bulat, K.; Wajda, A.; Błat, A.; Matyjaszczyk-Gwarda, K.; Grosicki, M.; et al. Temporal relationship between systemic endothelial dysfunction and alterations in erythrocyte function in a murine model of chronic heart failure. *Cardiovasc. Res.* **2021**, doi:10.1093/cvr/cvab306.
  93. Proniewski, B.; Bar, A.; Kieronska-Rudek, A.; Suraj-Prażmowska, J.; Buczek, E.; Czamara, K.; Majka, Z.; Czyzyska-Cichon, I.; Kwiatkowski, G.; Matyjaszczyk-Gwarda, K.; et al. Systemic administration of insulin receptor antagonist results in endothelial and perivascular adipose tissue dysfunction in mice. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10061448.
  94. Bar, A.; Kieronska-Rudek, A.; Proniewski, B.; Suraj-Prażmowska, J.; Czamara, K.; Marczyk, B.; Matyjaszczyk-Gwarda, K.; Jaształ, A.; Kuś, E.; Majka, Z.; et al. In vivo magnetic resonance imaging-based detection of heterogeneous endothelial response in thoracic and abdominal aorta to short-term high-fat diet ascribed to differences in perivascular adipose tissue in mice. *J. Am. Heart Assoc.* **2020**, *9*, doi:10.1161/JAHA.120.016929.
  95. Bar, A.; Skórka, T.; Jasiński, K.; Sternak, M.; Bartel, Ż.; Tyrankiewicz, U.; Chlopicki, S. Retrospectively gated MRI for in vivo assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. *NMR Biomed.* **2016**, *29*, 1088–1097, doi:10.1002/nbm.3567.
  96. Fedorowicz, A.; Buczek, E.; Mateuszuk, L.; Czarnowska, E.; Sitek, B.; Jaształ, A.; Chmura-Skirińska, A.; Dib, M.; Steven, S.; Daiber, A.; et al. Comparison of pulmonary and systemic NO- And PGI2-dependent endothelial function in diabetic mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/4036709.
  97. Stojak, M.; Milczarek, M.; Kurpińska, A.; Suraj-Prażmowska, J.; Kaczara, P.; Wojnar-Lason, K.; Banach, J.; Stachowicz-Suhs, M.; Rossowska, J.; Kalviņš, I.; et al. Protein disulphide isomerase a1 is involved in the regulation of breast cancer cell adhesion and transmigration via lung microvascular endothelial cells. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1–22, doi:10.3390/cancers12102850.
  98. Camacho-Fernández, C.; Hervás, D.; Rivas-Sendra, A.; Marín, M.P.; Seguí-Simarro,

- J.M. Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods* **2018**, *14*, 1–15, doi:10.1186/s13007-018-0297-4.
99. Przyborowski, K.; Proniewski, B.; Czarny, J.; Smeda, M.; Sitek, B.; Zakrzewska, A.; Zoladz, J.A.; Chlopicki, S. Vascular Nitric Oxide-Superoxide Balance and Thrombus Formation after Acute Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, doi:10.1249/MSS.0000000000001589.
  100. Porter, L.J.; Holt, M.R.; Soong, D.; Shanahan, C.M.; Warren, D.T. Prelamin A accumulation attenuates Rac1 activity and increases the intrinsic migrational persistence of aged vascular smooth muscle cells. *Cells* **2016**, *5*, 1–14, doi:10.3390/cells5040041.
  101. Cobb, A.M.; Yusoff, S.; Hayward, R.; Ahmad, S.; Sun, M.; Verhulst, A.; D’Haese, P.C.; Shanahan, C.M. Runx2 (Runt-Related Transcription Factor 2) Links the DNA Damage Response to Osteogenic Reprogramming and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, 1339–1357, doi:10.1161/ATVBAHA.120.315206.
  102. J.SchurgersCeesVermeer, L. Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2002**, *1570*, 27–32.
  103. Wolf, D.; Ley, K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2019**, *124*, 315–327, doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
  104. Allen, A.M.; Hansen, C.T.; Moore, T.D.; Knapka, J.; Ediger, R.D.; Long, P.H. Hemorrhagic cardiomyopathy and hemothorax in vitamin K deficient mice. *Toxicol. Pathol.* **1991**, *19*, 589–596, doi:10.1177/019262339101900404.
  105. Hacking, M.R.; Lane-Petter, W. Factors Influencing Dietary Vitamin K Requirements of Rats and Mice. *Lab. Anim.* **1968**, *2*, 131–142, doi:10.1258/002367768781082898.
  106. Chatron, N.; Hammed, A.; Benoît, E.; Lattard, V. Structural insights into phyloquinone (Vitamin K1), menaquinone (MK4, MK7), and menadione (vitamin K3) binding to VKORC1. *Nutrients* **2019**, doi:10.3390/nu11010067.
  107. Ronden, J.E.; Driittij-Reijnders, M.J.; Vermeer, C.; Thijssen, H.H.W. Intestinal flora is not an intermediate in the phyloquinone-menaquinone-4 conversion in the rat. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1998**, *1379*, 69–75, doi:10.1016/S0304-4165(97)00089-5.
  108. Ason, B.; Van Der Hoorn, J.W.A.; Chan, J.; Lee, E.; Pieterman, E.J.; Nguyen, K.K.; Di, M.; Shetterly, S.; Tang, J.; Yeh, W.C.; et al. PCSK9 inhibition fails to alter hepatic LDLR, circulating cholesterol, and atherosclerosis in the absence of ApoE. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 2370–2379, doi:10.1194/JLR.M053207.
  109. Shea, M.K.; Booth, S.L.; Miller, M.E.; Burke, G.L.; Chen, H.; Cushman, M.; Tracy, R.P.; Kritchevsky, S.B. Association between circulating vitamin K1 and coronary calcium progression in community-dwelling adults: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 197–208, doi:10.3945/ajcn.112.056101.
  110. Evangelou, K.; Vasileiou, P.V.S.; Pappaspyropoulos, A.; Hazapis, O.; Petty, R.; Demaria, M.; Gorgoulis, V.G. Cellular Senescence and Cardiovascular Diseases: Moving To the “Heart” of the Problem. *Physiol. Rev.* **2023**, *103*, 609–647, doi:10.1152/physrev.00007.2022.
  111. Mehdizadeh, M.; Aguilar, M.; Thorin, E.; Ferbeyre, G.; Nattel, S. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 250–264, doi:10.1038/s41569-021-00624-2.
  112. Dai, L.; Schurgers, L.J.; Shiels, P.G.; Stenvinkel, P. Early vascular ageing in chronic kidney disease: Impact of inflammation, Vitamin K, senescence and genomic damage. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2020**, *35*, II31–II37, doi:10.1093/ndt/gfaa006.
  113. Popa, Daniela-saveta; Galya, Bigman, Marius, E.R. The Role of Vitamin K in

- Humans : Implication in Aging and Diseases, Age-associated. *Antioxidants* **2021**, *10*, 566.
114. Zhong, J.; Chen, J.; Oyekan, A.A.; Epperly, M.W.; Greenberger, J.S.; Lee, J.Y.; Sowa, G.A.; Vo, N. V. Ionizing Radiation Induces Disc Annulus Fibrosus Senescence and Matrix Catabolism via MMP-Mediated Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23074014.
  115. Gruber, H.E.; Ingram, J.A.; Davis, D.E.; Hanley, E.N. Increased cell senescence is associated with decreased cell proliferation in vivo in the degenerating human annulus. *Spine J.* **2009**, *9*, 210–215, doi:10.1016/j.spinee.2008.01.012.
  116. d’Adda di Fagagna, F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 512–522, doi:10.1038/nrc2440.
  117. Salmon, T.B.; Evert, B.A.; Song, B.; Doetsch, P.W. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3712–3723, doi:10.1093/nar/gkh696.
  118. Li, J.; Lin, J.C.; Wang, H.; Peterson, J.W.; Furie, B.C.; Furie, B.; Booth, S.L.; Volpe, J.J.; Rosenberg, P.A. Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* **2003**, doi:10.1523/jneurosci.23-13-05816.2003.
  119. Kaźmierczak-Barańska, J.; Karwowski, B.T. Vitamin K Contribution to DNA Damage—Advantage or Disadvantage? A Human Health Response. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14204219.
  120. Nandi, A.; Yan, L.J.; Jana, C.K.; Das, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/9613090.
  121. CizewskiCulotta, V. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **2001**, *36*, 117–132.
  122. Mercurio, V.; Lobasso, A.; Barbieri, L.; Parrella, P.; Ciervo, D.; Liccardo, B.; Bonaduce, D.; Tocchetti, C.G.; De Paulis, A.; Rossi, F.W. Inflammatory, serological and vascular determinants of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20092154.
  123. Varricchi, G.; Loffredo, S.; Borriello, F.; Pecoraro, A.; Rivellesse, F.; Genovese, A.; Spadaro, G.; Marone, G. Superantigenic activation of human cardiac mast cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–17, doi:10.3390/ijms20081828.
  124. Don-Doncow, N.; Vanherle, L.; Zhang, Y.; Meissner, A. T-cell accumulation in the hypertensive brain: A role for sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–14, doi:10.3390/ijms20030537.
  125. Pollard, C.M.; Desimine, V.L.; Wertz, S.L.; Perez, A.; Parker, B.M.; Maning, J.; McCrink, K.A.; Shehadeh, L.A.; Lymperopoulos, A. Deletion of osteopontin enhances  $\beta$ 2-adrenergic receptor-dependent anti-fibrotic signaling in cardiomyocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–13, doi:10.3390/ijms20061396.
  126. Bobryshev, Y. V.; Ivanova, E.A.; Chistiakov, D.A.; Nikiforov, N.G.; Orekhov, A.N. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/9582430.
  127. Shih-Jen Hwang, Christie M. Ballantyne, A. Richey Sharrett, Louis C. Smith, Clarence E. Davis, Antonio M. Gotto, Jr, and E.B. Circulating Adhesion Molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in Carotid Atherosclerosis and Incident Coronary Heart Disease Cases. *Am. Hear. Assoc.* **1997**, *96*, 4219–4225.
  128. Galkina, E.; Ley, K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 2292–2301, doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179.
  129. Wang, T.; Tian, J.; Jin, Y. VCAM1 expression in the myocardium is associated with

- the risk of heart failure and immune cell infiltration in myocardium. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–23, doi:10.1038/s41598-021-98998-3.
130. Messerli, F.H. TIMPs, MMPs and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* **2004**, *25*, 1475–1476, doi:10.1016/j.ehj.2004.07.015.
  131. Tayebjee, M.H.; Nadar, S.; Blann, A.D.; Gareth Beevers, D.; MacFadyen, R.J.; Lip, G.Y.H. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: A substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am. J. Hypertens.* **2004**, *17*, 764–769, doi:10.1016/j.amjhyper.2004.05.019.
  132. Ohsaki, Y.; Shirakawa, H.; Hiwatashi, K.; Furukawa, Y.; Mizutani, T.; Komai, M. Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, doi:10.1271/bbb.70.926.
  133. Koshihara Y, Hoshi K, S.M. vitamin K2 (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity. *Biochem Pharmacol.* **1993**, *9*, 1355–62.
  134. Reddi, K.; Henderson, B.; Meghji, S.; Wilson, M.; Poole, S.; Hopper, C.; Harris, M.; Hodges, S.J. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin k) compounds. *Cytokine* **1995**, *7*, 287–290, doi:10.1006/cyto.1995.0034.
  135. Yu, Y.X.; Li, Y.P.; Gao, F.; Hu, Q.S.; Zhang, Y.; Chen, D.; Wang, G.H. Vitamin K2 suppresses rotenone-induced microglial activation in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 1178–1189, doi:10.1038/aps.2016.68.
  136. Tie, J.-K.K.; Jin, D.-Y.Y.; Straight, D.L.; Stafford, D.W. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood* **2011**, *117*, 2967–74, doi:10.1182/blood-2010-08-304303.
  137. Viegas, C.S.B.; Costa, R.M.; Santos, L.; Videira, P.A.; Silva, Z.; Araújo, N.; Macedo, A.L.; Matos, A.P.; Vermeer, C.; Simes, D.C. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLoS One* **2017**, doi:10.1371/journal.pone.0177829.
  138. Tabb, M.M.; Sun, A.; Zhou, C.; Grün, F.; Errandi, J.; Romero, K.; Pham, H.; Inoue, S.; Mallick, S.; Lin, M.; et al. Vitamin K2 Regulation of Bone Homeostasis Is Mediated by the Steroid and Xenobiotic Receptor SXR. *J. Biol. Chem.* **2003**, doi:10.1074/jbc.M303136200.
  139. Horie-Inoue, K.; Inoue, S. Steroid and xenobiotic receptor mediates a novel vitamin K2 signaling pathway in osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Metab.* **2008**.
  140. Tsai, S.H.; Lin-Shiau, S.Y.; Lin, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFκB in macrophages by resveratrol. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, doi:10.1038/sj.bjp.0702357.
  141. Kim, H.Y.; Baek, G.H.; Lee, W.; Lee, Y.J.; Shim, W.S.; Choi, Y.J.; Lee, B.; Kim, S.K.; Kang, K.W. CD44 is involved in liver regeneration through enhanced uptake of extracellular cystine. *Clin. Transl. Med.* **2022**, *12*, 1–7, doi:10.1002/ctm2.873.
  142. Jae, W.R.; Lee, K.W.; Kim, D.; Lee, Y.; Jeon, O.H.; Kwon, H.J.; Kim, D.S. NF-κB-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression by lipopolysaccharide in a macrophage cell line RAW 264.7. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, doi:10.5483/bmbrep.2007.40.1.088.
  143. Thijssen, H.H.W.; Vervoort, L.M.T.; Schurgers, L.J.; Shearer, M.J. Menadiolone is a metabolite of oral vitamin K. *Br. J. Nutr.* **2006**, doi:10.1079/bjn20051630.
  144. Rajabi, A. Al; Booth, S.L.; Peterson, J.W.; Choi, S.W.; Suttie, J.W.; Shea, M.K.; Miao, B.; Grusak, M.A.; Fu, X. Deuterium-labeled phylloquinone has tissue-specific conversion to menaquinone-4 among fischer 344 male rats. *J. Nutr.* **2012**,



- doi:10.3945/jn.111.155804.
145. Mugoni, V., Postel, R., Catanzaro, V., Luca, E. D., Turco, E., Digilio, G., Silengo, L., Murphy, M. P., Medana, C., Stainier, D.Y.R., Bakkers, J., Santoro, M.M. Ubiad1 Is an Antioxidant Enzyme that Regulates eNOS Activity by CoQ10 Synthesis. *Cell*, **2013**, *152*, 504–518.
  146. Jun Chen, Wen-Li Lu, Wei Gu, Shan-Shan Lu, Zhi-Peng Chen, B.-C.C.& X.-X.Y. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2004**, *11*, 565–577.
  147. Wang, H.; Yan, X.; Li, G.L.; Pilz-Allen, C.; Möhwald, H.; Shchukin, D. Sono-Assembly of Highly Biocompatible Polysaccharide Capsules for Hydrophobic Drug Delivery. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 825–831, doi:10.1002/adhm.201300596.
  148. Kolter, M.; Wittmann, M.; Köll-Weber, M.; Süß, R. The suitability of liposomes for the delivery of hydrophobic drugs – A case study with curcumin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *140*, 20–28, doi:10.1016/j.ejpb.2019.04.013.
  149. Crainie, M.; Belch, A.R.; Mant, M.J.; Pilarski, L.M. Overexpression of the Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM) Characterizes the Malignant Clone in Multiple Myeloma: Identification of Three Distinct RHAMM Variants. *Blood* **1999**, *93*, 1684–1696, doi:10.1182/blood.v93.5.1684.
  150. Voigt, J.; Christensen, J.; Shastri, V.P. Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 2942–2947, doi:10.1073/pnas.1322356111.
  151. Anna B. Banizs, Tao Huang, Robert K. Nakamoto, Weibin Shi, and J.H. Endocytosis pathways of endothelial cell derived exosomes. *Mol Pharm* **2018**, *15*, 5585–5590, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00765.Endocytosis.
  152. Passmore, M.R.; Byrne, L.; Obonyo, N.G.; See Hoe, L.E.; Boon, A.C.; Diab, S.D.; Dunster, K.R.; Bisht, K.; Tung, J.P.; Fauzi, M.H.; et al. Inflammation and lung injury in an ovine model of fluid resuscitated endotoxemic shock. *Respir. Res.* **2018**, *19*, 231, doi:10.1186/s12931-018-0935-4.
  153. Song, S.; Qi, H.; Xu, J.; Guo, P.; Chen, F.; Li, F.; Yang, X.; Sheng, N.; Wu, Y.; Pan, W. Hyaluronan-based nanocarriers with CD44-overexpressed cancer cell targeting. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 2988–3005, doi:10.1007/s11095-014-1393-4.
  154. Cham, B.E.; Smith, J.L.; Colquhoun, D.M. Interdependence of serum concentrations of vitamin K1, vitamin E, lipids, apolipoprotein A1, and apolipoprotein B: importance in assessing vitamin status. *Clin. Chim. Acta* **1999**, *287*, 45–57, doi:10.1016/S0009-8981(99)00117-5.
  155. Yan, L.; Zhou, B.; Nigdikar, S.; Wang, X.; Bennett, J.; Prentice, A. Effect of apolipoprotein E genotype on vitamin K status in healthy older adults from China and the UK. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 956–961, doi:10.1079/bjn20051578.
  156. Kelly, J.M.; Ordovas, J.M.; Matuszek, G.; Smith, C.E.; Huggins, G.S.; Dashti, H.S.; Ichikawa, R.; Booth, S.L. The Contribution of Lipids to the Interindividual Response of Vitamin K Biomarkers to Vitamin K Supplementation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, 1–10, doi:10.1002/mnfr.201900399.
  157. Wang, G.; Tiemeier, G.L.; van den Berg, B.M.; Rabelink, T.J. Endothelial Glycocalyx Hyaluronan: Regulation and Role in Prevention of Diabetic Complications. *Am. J. Pathol.* **2020**, *190*, 781–790, doi:10.1016/j.ajpath.2019.07.022.
  158. Satoh, T.; Ichida, T.; Matsuda, Y.; Sugiyama, M.; Yonekura, K.; Ishikawa, T.; Asakura, H. Interaction between hyaluronan and CD44 in the development of dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2000**, *15*, 402–411, doi:10.1046/j.1440-1746.2000.02164.x.

## IX Oświadczenia współautorów publikacji

Miejscowość, dnia Kraków, 05.01.2023

**Dr inż. Agnieszka Kij**

Uniwersytet Jagielloński, Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)  
Bożeżyńskiego 14, 30-348 Kraków, Polska  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

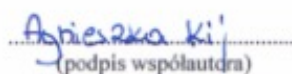
### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: *Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line*. Cells. 2021, 10(7):1571 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

Oznaczenia stężenia różnych form witamin K w lizatach komórkowych, oraz oznaczeniu stężenia eikozanoidów w medium pochodzonym techniką UHPLC-MS/MS.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr Annę Kierońską-Rudek jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Anny Kierońskiej-Rudek polegający na\*\*: Zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów na linii komórkowej makrofagów RAW 264.7, wykonaniu części pomiarów markerów zapalnych (IL-6, TNF $\alpha$ ), analizie danych, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu pracy.

  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Miejscowość, dnia Kraków, 01.12.2022

**Mgr inż. Anna Tworzydło**

Uniwersytet Jagielloński, Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)  
Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków, Polska  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

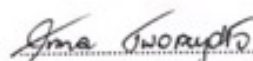
### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: *Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line*. Cells. 2021, 10(7):1571 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

Wykonanie pomiarów dotyczących produkcji tlenu azotu w medium komórkowym.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Annę Kierońską-Rudek** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Anny Kierońskiej-Rudek** polegający na\*\*: Zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów na linii komórkowej makrofagów RAW 264.7, wykonaniu części pomiarów markerów zapalnych (IL-6, TNFa), analizie danych, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu pracy.

  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Miejscowość, dnia Kraków, 03.01.2023

**Dr Katarzyna Sidoryk**  
Instytut Farmaceutyczny w Warszawie  
Rydygiera 8, 01-793 Warszawa, Polska  
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

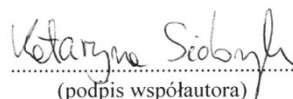
#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy\*: *Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line*. Cells. 2021, 10(7):1571 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na\*\*:

Wykonaniu syntezy różnych form witaminy K wykorzystanych do badań *in vitro*.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Annę Kierońską-Rudek** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Anny Kierońskiej-Rudek** polegający na\*\*: Zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów na linii komórkowej makrofagów RAW 264.7, wykonaniu części pomiarów markerów zapalnych (IL-6, TNFa), analizie danych, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu pracy.

  
(podpis współautora)

\*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

\*\*np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Dr hab. Patrycja Kaczara  
Uniwersytet Jagielloński  
Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET)  
ul. Bobrzyńskiego 14  
30-348 Kraków, Polska

Kraków, 03.01.2023

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy "Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line", *Cells*, 2021, 10(7):1571 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na wykonaniu pomiarów funkcji mitochondriów metodą Seahorse.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Annę Kierońską-Rudek** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Anny Kierońskiej-Rudek** polegający na: zaplanowaniu i przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów na linii komórkowej makrofagów RAW 264.7, wykonaniu części pomiarów markerów zapalnych (IL-6, TNF $\alpha$ ), analizie danych, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu pracy.

*Patrycja Kaczara*  
.....

## *Spis publikacji doktorantki*

### A) Publikacje związane z pracą dokorską

1. **Kieronska-Rudek A, Kij A, Kaczara P, Tworzydło A, Napiorkowski M, Sidoryk K, Chlopicki S**, Exogenous vitamins K exert anti-inflammatory effects dissociated from their role as substrates for synthesis of endogenous MK-4 in murine macrophages, *Cells*, 2021
2. **Kieronska-Rudek A, Kij A, Bar A, Sternak M, Bednorz J, Janik-Hazuka M, Kostogryś RB, Franczyk-Zarow M, Zapotoczny S, Chlopicki S**, Rapid reversal of phylloquinone deficiency-induced endothelial dysfunction by vitamin K1 administration in hyaluronan-based nanocapsules *International Journal of Nanomedicine*, *manuskrypt w recenzji*
3. **Kij A<sup>#</sup>, Kieronska-Rudek A<sup>#</sup>, Bar A, Czyżyńska-Cichon I, Strus M, Kozieln L, Wiecek G, Zeber-Lubecka N, Kwiatkowski G, Przyborowski K, Mohaissen T, Sternak M, Buczek E, Proniewski B, Kus K, Franczyk-Zarow M, Kostogryś RB, Pieterman EJH, Chlopicki S**, Vitamin K1 deficiency deteriorates endothelial function in normo- and dyslipidaemic mice. *J. Nutr.* *manuskrypt w recenzji*  
*#pierwszy autor z równorzędnym wkładem.*
4. **Kieronska-Rudek A, Kij A, Bar A, Mohaissen T, Grosicki M, Stojak M, Kurpińska A, Sternak M, Buczek E, Proniewski B, Kuś K, Panek A, Pietrowska M, Shanahan, CM, Zapotoczny S, Chlopicki S**, Vasoprotective activity of phylloquinone in the vessel wall. The comparison with menaquinone. *Manuskrypt w przygotowaniu*

*W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano część wyników publikacji 1 oraz przygotowywanych obecnie manuskryptów 2-4,*

### Publikacje niezwiązane z pracą dokorską

1. Smeda M, Jaształ A, Maleki EH, Bar A, Sternak M, Kwiatkowski G, Suraj-Prażmowska J, Proniewski B, **Kieronska-Rudek A**, Wojnar-Lason K, Skrzypek K, Majka M, Chrabaszcz, Malek K, Chlopicki S, Endothelial-mesenchymal transition induced by metastatic 4T1 breast cancer cells in pulmonary endothelium in aged mice. *Front Mol Biosci.* 2022 Nov 24;9:1050112.
2. Smeda M, Stojak M, Przyborowski K, Sternak M, Suraj-Prążmowska J, Kus K, Derszniak K, Jaształ A, Kij A, Kurpińska A, **Kieronska-Rudek A**, Wojnar-Lason K, Buczek E, Mohaissen T, Chlopicki S, Direct thrombin inhibitor dabigatran compromises pulmonary endothelial integrity in a murine model of breast cancer metastasis to the lungs; the role of platelets and inflammation-associated haemostasis, *Front Pharmacol*, 2022
3. Proniewski B, Bar A, **Kieronska-Rudek A**, Suraj-Prażmowska J, Buczek E, Czamara K, Majka Z, Czyżyńska-Cichon I, Kwiatkowski G, Matyjaszczyk-Gwarda K, Chlopicki S., Systemic administration of insulin receptor antagonist results in endothelial and perivascular adipose tissue dysfunction in mice, *Cells*, 2021

4. **Kij A, Bar A, Przyborowski K, Proniewski B, Mateuszuk L, Jaształ A, Kierońska-Rudek A, Marczyk B, Matyjaszczyk-Gwarda K, Tworzydło A, Enggaard C., Hansen P.B, Jensen B, Walczak M, Chłopicki S**, Thrombin Inhibition Prevents Endothelial Dysfunction and Reverses 20-HETE Overproduction without Affecting Blood Pressure in Angiotensin II-induced Hypertension in Mice, *Journal of Molecular Sciences*, 2021
5. **Smeda M, Kij A, Proniewski B, Matyjaszczyk-Gwarda K, Przyborowski K, Jaształ A, Derszniak K, Berkowicz P, Kieronska-Rudek A, Stojak M, Sternak M, Chłopicki S**, Unexpected effects of long-term treatment with acetylsalicylic acid on late phase of pulmonary metastasis in murine model of orthotopic breast cancer *PlosOne*, 2020
6. **Bar A, Kieronska-Rudek A, Proniewski B, Suraj-Prażmowska J, Czamara K, Marczyk B, Matyjaszczyk-Gwarda K, Jaształ A, Kuś E, Majka A, Kaczor A, Kurpińska A, Walczak M, Pieterman E, Princen HMG, Chłopicki S**, In vivo MRI detection of heterogeneous endothelial response in thoracic and abdominal aorta to short-term high-fat diet ascribed to differences in perivascular adipose tissue in mice, *JAHA*, 2020
7. **Smeda M, Kieronska A, Proniewski B, Jaształ A, Selmi A, Wandzel K, Zakrzewska A, Wojcik T, Przyborowski K, Derszniak K, Stojak M, Kaczor D, Buczek E, Watala C, Wietrzyk J, Chłopicki S**. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin increases mortality in 4T1 metastatic breast cancer-bearing mice by inducing vascular mimicry in primary tumour. *Oncotarget.*, 2018
8. **Sternak M, Bar A, Adamski MG, Mohaissen T, Marczyk B, Kieronska A, Stojak M, Kus K, Tarjus A, Jaisser F, Chłopicki S**. The deletion of endothelial sodium channel  $\alpha$ ENaC impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia in Vivo. *Front Pharmacol.*, 2018
9. **Karkowska-Kuleta J, Bartnicka D, Zawrotniak M, Zielinska G, Kierońska A, Bochenska O, Ciaston I, Koziel J, Potempa J, Baster Z, Rajfur Z, Rapala-Kozik M.** The activity of bacterial peptidylarginine deiminase is important during formation of dual-species biofilm by periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and opportunistic fungus *Candida albicans*. *Pathog Dis.*, 2018
10. **Smeda M, Kieronska A, Adamski MG, Proniewski B, Sternak M, Mohaissen T, Przyborowski K, Derszniak K, Kaczor D, Stojak M, Buczek E, Jaształ A, Wietrzyk J, Chłopicki S**. Nitric oxide deficiency and endothelial–mesenchymal transition of pulmonary endothelium in the progression of 4T1 metastatic breast cancer in mice. *Breast Cancer Res.*, 2018
11. **Hrabia A, Wolak D, Kwaśniewska M, Kieronska A, Socha JK, Sechman A**, Expression of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-2 and TIMP-3) in the chicken ovary in relation to follicle development and atresia. *Theriogenology* 2018