

ผลของเจนีสตินต่อการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในกระดุก
และการสร้างและสลายกระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง

นางอัจฉรียา กติยะพัท

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาสรีรวิทยา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PREVENTIVE EFFECTS OF GENISTEIN ON THE ALTERATIONS OF
BONE VASCULARIZATION AND BONE REMODELING
IN OVARIECTOMIZED RATS**

Mrs. Atchareeya Kasiyaphat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Physiology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

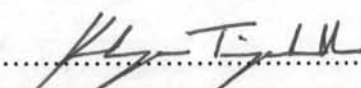
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

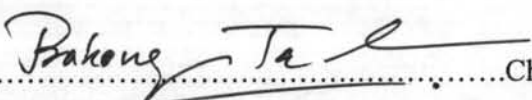
490463

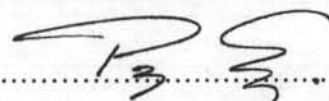
Thesis Title Preventive effects of genistein on the alterations of bone
 vascularization and bone remodeling in ovariectomized rats
By Mrs. Atchareeya Kasiyaphat
Field of Study Physiology
Thesis Advisor Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Fulfillment of the
Requirements of the Doctoral Degree

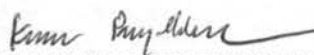
.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

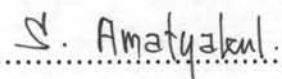
THESIS COMMITTEE

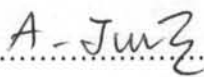
.....Chairman
(Associate Professor Prakong Tangpraputgul, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Krasean Panyakhamlerd, M.D.)

.....Member
(Assistant Professor Supathra Amatyakul, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Amporn Jariyapongskul, Ph.D.)

อภิญญา กฤษณะพัท: ผลของเจนีสตินต่อการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในกระดูกและการสร้างและสลายกระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง: (PREVENTIVE EFFECT OF GENISTEIN ON THE ALTERATIONS OF BONE VASCULARIZATION AND BONE REMODELING IN OVARECTOMIZED RATS) อ.ที่ปรึกษา: รศ.นพ. ประสงค์ ศิริวิริยะกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช; 110 หน้า

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษามหาผลและกลไกของเจนีสตินต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดฝอยที่กระดูก และ การสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก (bone mineral content) จากการถูกตัดรังไข่ โดยใช้หนูขาวเพศเมียสายพันธุ์ Wistar (116 ตัว) แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ หนูที่ผ่าตัดแต่ไม่ถูกตัดรังไข่ออกใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบซึ่งได้รับตัวทำละลายเจนีสติน (DMSO 100 μ l, sc; Sham_{veh}), หนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างแล้วได้รับตัวทำละลายเจนีสติน (DMSO 100 μ l, sc; OVX_{veh}), หนูที่ถูกตัดรังไข่แล้วได้รับ 17 β -estradiol (5 μ g/ kgBW/day, sc; OVX_{E2}) และ หนูที่ถูกตัดรังไข่แล้วได้รับเจนีสติน (0.25 mg / kgBW/day, sc; OVX_{gen}) การให้เจนีสตินหรือตัวทำละลายเจนีสตินนั้นจะให้ทันทีภายหลังจากการผ่าตัดต่อเนื่องทุกวัน โดยในการศึกษาผลของเจนีสตินต่อการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก (Tibial) ศึกษาจาก 3 กลุ่ม คือ หนูกลุ่ม Sham_{veh}, OVX_{veh} และ OVX_{gen} ที่ให้สารต่างๆเป็นเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของเจนีสตินต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดฝอยที่กระดูก และ การสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก (Femur) โดยศึกษาจากหนูทั้ง 4 กลุ่มที่ให้สารต่างๆเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการศึกษามวลแร่ธาตุของกระดูกจาก เปอร์เซ็นต์ Ash/Dry matter, ระดับ osteocalcin และ alkaline phosphatase ด้วยวิธี chemiluminescence immunoassay (CLIT), ตรวจซีรัม TNF α , IL-6 และ VEGF ด้วยชุดทดสอบ ELISA, ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด โดยฉีด 0.5 % Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) MW 250,000 (Sigma Chemical, USA) ขนาด 50 μ l เข้าทางหลอดเลือดดำ และบันทึกภาพด้วยกล้อง Confocal laser microscope (EZ-C1, Nikon, Japan) กำลังขยาย 10 X จากนั้นทำการวิเคราะห์ภาพเพื่อหาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย ด้วยโปรแกรม Image Pro (Plus Software Media Cybernetics, Inc, USA).

ผลการศึกษาวิจัยพบว่า ที่ 6 สัปดาห์หลังจากที่หนูถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง (OVX_{veh}) มวลแร่ธาตุของกระดูก (Tibial) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบ (Sham_{veh}) ที่ 1 สัปดาห์หลังจากที่หนูถูกตัดรังไข่ออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของระดับ TNF α , การลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย เทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบ ที่เวลา 3 สัปดาห์หลังจากถูกตัดรังไข่ ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของระดับ TNF α , osteocalcin, และ alkaline phosphatase ในขณะที่เดียวกับที่มีการลดลงของ VEGF รวมถึงการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยที่กระดูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ IL-6 แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการได้รับเจนีสตินสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติดังกล่าวได้

นอกจากนี้ผลการศึกษาายังพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง การสูญเสียหน้าที่ของหลอดเลือดกับการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก ที่เกิดจากการถูกตัดรังไข่

โดยสรุปจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของหลอดเลือดที่กระดูกเกิดขึ้นก่อน การสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก และการได้รับเจนีสตินทดแทนสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดฝอยที่กระดูก และ การสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูกในช่วงแรกที่เกิดภาวะพร่องเอสโตรเจนได้ โดยมีกลไกผ่านทาง การป้องกันการลดลงของ VEGF ที่มีผลต่อความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย และ ป้องกันการเพิ่มขึ้นของ TNF α ป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียล และป้องกันการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่าการได้รับเจนีสตินทดแทนในช่วงแรกที่เกิดภาวะพร่องเอสโตรเจนอาจช่วยป้องกันการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูกในสตรีวัยหมดประจำเดือนได้

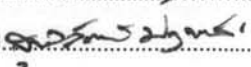
สหสาขาวิชา.....สรีรวิทยา.....

สาขาวิชา.....สรีรวิทยา.....

ปีการศึกษา.....2549.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4589703920: MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORD: GENISTEIN, BONE, CAPILLARY DENSITY, OVARECTOMIZED RAT

ATCHAREEYA KASIYAPHAT: PREVENTIVE EFFECT OF GENISTEIN ON THE ALTERATIONS OF BONE VASCULARIZATION AND BONE REMODELING IN OVARECTOMIZED RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PRASONG SIRIVIRIYAKUL, M.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D. 110 pp.

The objective of this study was to examine the roles of genistein in ovariectomized induced-bone microvascular dysfunction and bone loss. Female Wistar rats (116 rats) were divided into 4 groups : sham_{veh} (daily treated with vehicle; DMSO, sc;100 µl/day), ovariectomized rat treated with vehicle (OVX_{veh}), 17β-estradiol treated-ovariectomized rat (OVX_{E2}, 5 µg/kgBW/day, sc) and genistein treated-ovariectomized rat (0.25 mg/kgBW/day, sc; OVX_{gen}). The study effect of genistein on bone mineral contents at 3-wk and 6-wk after ovariectomy involve 3 groups; Sham_{veh}, OVX_{veh} and OVX_{gen}. The other studies at 1 and 3 weeks after the ovariectomy were consisted of 4 groups, bone mineral content and bone biochemical markers were determined and represented by percentage of ash/dry matter, osteocalcin and alkaline phosphatase activity (using chemiluminescence immunoassay (CLIT)), serum VEGF, serum TNF-α and IL-6 were determined by using ELISA Kits. The bone microvasculature was observed under Confocal laser microscope (EZ-C1, Nikon, Japan). An objective lens of 10x was used. 50 µl of 0.5 % Fluoresein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) MW 250,000 (Sigma Chemical, USA) was injected intravenously to visualize the intralumen of microvessels. Bone capillary density was measuremented by using a digital image processing software, Image Pro (Plus Software Media Cybernatics, Inc, USA).

The results showed that at 6-wk of after ovariectomy (OVX_{veh}), bone mineral content of tibial bone significantly decrease compared to sham_{veh}. At 1-wk, increase in TNF-α was occurred, bone capillary density significantly decreased in OVX_{veh}. At 3-wk after ovariectomy. Increases in TNF-α, osteocalcin, and alkaline phosphatase activity, concomitant with decreases of VEGF and bone capillary density were found in OVX_{veh} significantly. However, the level of IL-6 did not change after ovariectomy. Interestingly, these abnormalities after ovariectomy could be decreased by administration of genistein.

In addition, the results of our relationship analyses demonstrated that there is a significant close link between OVX-induced microvascular dysfunction and bone remodeling abnormality.

In conclusion, our results indicated that bone microvascular abnormality was occurred **prior** the decrease in bone loss. Genistein supplementation could inhibit bone microvascular dysfunction and bone loss mediated in part through: prevent reduction of VEGF maintain capillary density, prevent induction of TNF-α, prevent endothelial dysfunction, and prevent bone resorption. Therefore, our findings suggested that genistein supplementation at early phase of estrogen depletion should be used for prevention postmenopausal induced osteoporosis.

Inter-department: Physiology
Field of study: Physiology
Academic year: 2006

Student's signature..... *Atchareeya Kus*
Advisor's signature..... *Prasong*
Co-advisor's signature..... *Suthiluk Patumraj*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D. for his contributed knowledge and logical way of thinking. His understanding, encouraging and personal guidance have provided a good basis for the present thesis.

I am deeply grateful and sincere thanks to my co-advisor Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D., for her detailed and constructive comments, and important support throughout this work. Her extensive discussions around my work and interesting explorations in operations have been very helpful for this study.

I am very grateful to the members of the thesis committee for their valuable suggestion and correction.

I am also grateful to Graduate School, Chulalongkorn University and the Ministry of University, and the Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the financial support.

I warmly thank Miss Pattarin Sridulyakul, for her kind support and gave me friendly love, and for her excellent advice during my first step into Confocal laser microscope studies.

My warm thanks to Miss Natchaya Wong-eak-in and friends, for their company my difficult moments with friendly help.

Finally, I owe my heartfelt thanks to my parents for their true love and understanding. Without their sympathy and encouragement it would have been impossible for me to step up at this position. My special gratitude is to my brother and his family for their loving support.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (ENGLISH).....	iv
ABSTRACT (THAI).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATION.....	xi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
Research question.....	4
Objective.....	4
Hypothesis.....	4
II REVIEW LITERATURE.....	5
Menopause.....	5
Bone.....	5
Bone remodeling.....	6
Bone remodeling markers.....	8
Osteoporosis.....	10
Bone circulation.....	11
Angiogenesis and bone.....	12
Vessel and bone.....	13
Estrogen and vascular function.....	14
NO: mediator of estrogen-induced vasodilation.....	16
Estrogen and bone.....	17
Estrogen, nitric oxide and bone.....	18

	PAGE
Estrogen deficiency and inflammation.....	22
Estrogen and selective modulators (SERMs).....	26
Phytoestrogen.....	26
Genistein.....	27
Effects of genistein on endothelial function and bone mineral density.....	30
III EXPERIMENT	32
Chemicals.....	33
Animal preparation.....	33
Ovariectomized preparation.....	33
Experimental design.....	34
Protocol 1 To study the effect of genistein on bone mineral content	34
Bone mineral content: Percent of Ash/Dry matter.....	36
Protocol 2 To study the mechanism(s) of genistein in early phase of E ₂ depletion on bone vascularization and bone remodeling.....	36
Femur and femur chamber preparation.....	38
Assessment of bone capillary density.....	40
Serum E ₂ determination.....	45
Bone formation markers assay.....	45
Enzyme-linked immunosorbent assay for serum TNF α , IL-6 and VEGF	45
Data analysis.....	46
IV RESULTS	44
4.1 The effect of genistein on bone mineral contents.....	47
4.2 Effects of genistein on serum E ₂ levels and uterine weight.....	51

	PAGE
4.3 Effects of genistein on bone biochemical markers and serum TNF α and IL-6.....	54
4.4 Effects of genistein on serum VEGF and bone capillary density	60
4.4.1 Effect of genistein on serum VEGF	60
4.4.2 Effects of genistein on bone capillary density	60
4.5 The relationships between serum VEGF, bone capillary density, and bone mineral content.....	66
V DISCUSSION.....	70
5.1 Effect of genistein on bone mineral content.....	71
5.2 Effects of genistein on serum E ₂ levels and uterine weight....	72
5.3 Effect of genistein on bone formation markers.....	73
5.4 Effect of genistein administration on TNF- α and IL-6.....	74
5.5 Effect of genistein administration on serum VEGF concentration.....	78
5.6 Effect of genistein administration on bone capillary density..	79
5.7 The relationship between serum VEGF, bone capillary density, and bone mineral content.....	81
5.8 The proposed mechanism for our findings on protective roles of genistein in E ₂ depletion caused bone loss.....	83
VI CONCLUSION.....	85
REFERENCES.....	87
APPENDIX.....	107
BIOGRAPHY.....	110

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1	Representative animal studies examining the effects of genistein on endothelial function (EF) and bone mineral density (BMD) and biomarkers of bone formation and bone resorption30
4.1.1	Means \pm SD of ash/dry matter (%) which represented tibial bone mineral content after 3 and 6 weeks of ovariectomy48
4.1.2	Means \pm SD of bone mineral content (ash/dry matter (%)) were obtained from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy49
4.2	Means \pm SD on serum E ₂ levels (pg/ml) and uterine weight (g/100gBW) were obtained from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy 51
4.3.1	Means \pm SD of bone biochemical markers, serum osteocalcin and alkaline phosphatase activity, were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy. 54
4.3.2	Serum TNF- α (ng/ml) and IL-6 (ng/ml) levels were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy. 57
4.4	Serum VEGF levels (pg/ml) and bone capillary density (%) were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy.....60

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1	The bone remodeling cycle.....7
2.2	Osteoclast differentiate from mesenchymal precursor in bone marrow8
2.3	Mechanisms of bone loss in osteoporosis.....11
2.4	Proposed model for the actions of estrogen depletion on bone22
2.5	Effects of cytokines on osteoclast production and activity23
2.6	Effect of estrogen on osteoblast and endothelial cell..... 25
2.7	Structures of isoflavone phytoestrogens in relation to estradiol.....27
3.1	Conceptual framework of the present study was showed When E2 depletion two target organs, bone and microcirculation.....32
3.2	Femur and femur chamber preparation.....39
3.3	Nikon EZ- C1 Confocal microscope40
3.4	Collection bone vessels images by using confocal fluorescence microscope.....40
3.5	The image of femur bone capillary network of each experiment.....41
3.6	The window frame $350 \times 350 \mu\text{m}^2$, was posted on the selected studied area.....42
3.7	The “Measurement” functional tool was used to calculated the capillary area of each capillary segment.....43
4.1	Means \pm SD of bone mineral content (ash/dry matter (%)) were obtained from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy50
4.2.1	Serum E ₂ levels (pg/ml) were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy.....52

FIGURE	PAGE
4.2.2 Means \pm SD of uterine weight (g/100g BW) were Determined from each group : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy	53
4.3.1 Means \pm SD of serum osteocalcin (ng/ml) were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy	55
4.3.2 Means \pm SD of serum alkaline phosphatase (U/L) were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy.....	56
4.3.3 Means \pm SD of serum TNF- α levels (ng/ml) were determined from Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy	58
4.3.4 Means \pm SD of serum IL-6 levels (ng/ml) were determined from: Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy.....	59
4.4.1 Serum VEGF levels (pg/ml) were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy	62
4.4.2 Capillary densities (%) were determined from : Sham _{veh} , OVX _{veh} , OVX _{E2} and OVX _{gen} at 1 and 3 weeks after ovariectomy	63
4.4.3 Confocal laser images of microvasculature in femur bones were taken from: Sham _{veh} (A), OVX _{veh} (B), OVX _{E2} (C) and OVX _{gen} (D) at 1-wk after ovariectomy.	64
4.4.4 Confocal laser images of microvasculature in femur bones were taken from: Sham _{veh} (A), OVX _{veh} (B), OVX _{E2} (C) and OVX _{gen} (D) at 3-wk after ovariectomy.	65

FIGURE	PAGE
4.5.1 Relationship between serum VEGF and capillary density at 1 week after treated with genistein.....	67
4.5.2 Relationship between serum VEGF and bone mineral content at 1 week after treated with genistein	67
4.5.3 Relationship between capillary density and bone mineral content at 1 week after treated with genistein.....	68
4.5.4 Relationship between serum VEGF and capillary density at 3 week after treated with genistein.....	68
4.5.5 Relationship between serum VEGF and capillary density at 3 week after treated with genistein.....	69
4.5.6 Relationship between capillary density and bone mineral content at 3 week after treated with genistein.....	69
5.1 Schematic representation of the main mechanisms and feedback interactions by which estrogen deficiency leads to inflammatory response and then both consequently caused bone loss.....	77
5.2 The propose mechanism of estrogen and phytoestrogens up-regulate VEGF-A and promote angiogenic activity through an estrogen receptor	79
5.3 The proposed mechanisms for our finding on preventive effects of genistein on bone microvascular and bone remodeling.....	84

LIST OF ABBREVIATIONS

ALP	=	alkaline phosphatase
AP-1	=	activator protein-1
ATPase	=	adenosine triphosphatase
BMD	=	bone mineral density
BW	=	body weight
Ca ²⁺	=	calcium
Cbfa 1	=	core binding factor alpha-1
CLIT	=	chemiluminescence
°C	=	degree celsius
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
E ₂	=	estradiol
ECLIT	=	electrochemiluminescence immunoassay
EF	=	endothelial function
EGF	=	epidermal growth factor
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	=	endothelial nitric oxide synthase
ER	=	estrogen receptor ER α and/or ER β
ER α	=	estrogen receptor α
ER β	=	estrogen receptor β
ERT	=	estrogen replacement therapy
<i>et al.</i>	=	and others
FITC	=	fluoresein isothiocyanate
FGF	=	fibroblast growth factor

gen	=	genistein
HRT	=	hormone replacement therapy
IGF-1	=	insulin growth factor-1
IGFBP-4	=	insulin-like growth factor binding protein-4
IL-1	=	interleukin-1
IL-6	=	interleukin-6
IL-11	=	interleukin-11
i.p.	=	intraperitoneal
LDL	=	low-density lipoproteins
L-NAME	=	N ^ω -nitroarginine methyl ester
M	=	molar
M-CSF	=	macrophage colony-stimulating factor
MIF	=	macrophage migration inhibitory factor
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
ng	=	nanogram
nNOS	=	neuronal nitric oxide synthase
NO	=	nitric oxide
NOS	=	nitric oxide synthase
NS	=	not significant
OB	=	osteoblast
OC	=	osteoclast
OPG	=	osteoprotegerin
OVX	=	ovariectomy
PDGF-A	=	platelet-derived growth factor-A
pg	=	picogram
pmol	=	picomole
po	=	per oral
PO ₄	=	phosphate

PTH	=	parathyroid hormone
RANK	=	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	=	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
RNS	=	reactive nitrogen species
ROS	=	reactive oxygen species
RT-PCR	=	reverse transcription-polymerase chain reaction
sc	=	subcutaneously
SD	=	standard deviation
SERM	=	selective estrogen receptor modulator
TGF β	=	transforming growth factor- β
TNF α	=	tumor necrosis factor α
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
veh	=	vehicle
VSM	=	vascular smooth muscle
WHI	=	The Women's Health Initiative
WHO	=	World Health Organization
wk	=	week