

PÔVODNÁ PRÁCA

VPLYV BIOMINU-H A VITAMÍNU D₂ NA OVARIKTOMOVANÉ SAMIČKY POTKANA

I. KOSTNÁ DENZITA A ZLOŽENIE STEHNOVEJ KOSTI

K. ŠVÍK, M. STANČÍKOVÁ, P. MASARYK, J. ROVENSKÝ, Z. VESELKOVÁ

THE THE INFLUENCE OF BIOMIN-H AND VITAMIN D₂ ON OVARICTOMIZED FEMALE RATS

I. BONE DENSITY AND COMPOSITION OF FEMUR

Výskumný ústav reumatických chorôb, Piešťany
 Riaditeľ: prof. MUDr. J. Rovenský, DrSc.

Súhrn

Pozadie problému: Biomin-H je purifikovaný biopřípravok vyrábaný zo škrupín nezávadných slepačích vajec. Účinok tejto látky sa netestoval na ovariectomovaných zvieratách samostatne, ani v kombinácii s vitamínom D₂. Vitamín D₂ sa používa v prevencii a liečbe osteoporózy ľudí.

Ciel: Sledovanie vplyvu štvormesačnej preventívnej liečby Biominom-H a vitamínom D₂ na denzitometrické a biochemické parametre stehnovej kosti samičiek potkana pri použití zvieracieho modelu postmenopauzálnnej osteoporózy.

Metódy: V pokuse boli dospelé samice potkanov kmeňa Sprague-Dawley s minimálnou živou hmotnosťou 270 g bilaterálne ovariectomované a simulovane operované. Po operáciách sa rozdelili do 5 skupín po 8 zvierat: zdravá kontrola (SHAM), neliečená ovariectomovaná kontrola (OVX), ovariectomované samičky potkana liečené: Biominom-H (BIO), vitamínom D₂ (VIT), Biominom-H a vitamínom D₂ (BIOVIT). Biomin-H a vitamín D₂ sme aplikovali v kŕmnej zmesi skupinám liečených zvierat denne (celkom 110 dní). Po 15. týždni pokusu sme vyhodnocovali hmotnosť, denzitometrické vyšetrenie i obsah vápnika a fosforu v popole vypreparovanej stehnovej kosti zvierat.

Výsledky: Všetky sledované ukazovatele okrem živej hmotnosti samičiek potkana boli pri SHAM kontrole vyššie v porovnaní so skupinou OVX a skupinou OVX liečenou vitamínom D₂. Hmotnosť SHAM kontrol bola v porovnaní s ovariectomovanými zvieratami signifikantne nižšia. Kostná minerálna denzita a kostný minerálny obsah stehnovej kosti samičiek potkana boli vyššie v skupinách s Biominom-H. Biominové skupiny mali aj obsah vápnika v popole femuru vyšší ako OVX kontroly a OVX zvieratá liečené vitamínom D₂. Pomer vápnika k fosforu v skupine OVX liečenej Biominom-H bol signifikantne vyšší v porovnaní s SHAM kontrolami a neliečenou OVX kontrolou.

Summary

Introduction: Biomin-H is a purified bio-preparation made from healthy egg-shells. The effect of this substance has not been tested on ovariectomized animals, neither separately nor in combination with vitamin D₂. Vitamin D₂ is utilized in the prevention and treatment of osteoporosis in humans.

Objectives: To monitor the influence of four months preventive therapy by Biomin-H and vitamin D₂ to the densitometric and biochemical parameters of the femur of female rats utilizing the animal model of postmenopausal osteoporosis.

Methods: In the trial, female adult Sprague-Dawley rats with a minimum body weight of 270 g were studied. They were either bilateral ovariectomized or underwent a simulated operation. After the operations they were divided into 5 groups of 8 animals each: healthy controls (SHAM), untreated ovariectomized controls (OVX), ovariectomized controls treated with Biomin-H (BIO), with vitamin D₂ (VIT), and with both Biomin-H and vitamin D₂ (BIOVIT). The Biomin-H and vitamin D₂ were administered daily in the food mixture over a period of 110 days. After the 15th week of the trial, weight, densitometric examination as well as calcium and phosphorus determination from the ashes of the prepared femur of the animals were measured.

Results: All the monitored indicators except for the body weight were higher in the SHAM controls compared to both the OVX group and the OVX group treated with vitamin D₂. The weight of the SHAM controls was significantly lower in comparison with the ovariectomized animals. Both bone mineral density and bone mineral content in the femur of the female rats were higher in the groups in which Biomin-H was administered. The Biomin-H groups had a higher calcium content in the femur ash than the OVX controls and the OVX controls treated with vitamin D₂. The calcium to phosphorus ratio in the OVX group treated with Biomin-H was significantly higher in comparison with the SHAM controls and non-treated OVX controls.

Záver: Z výsledkov vyplýva, že hodnoty denzitometrických meraní, hmotnosti popola, obsahu vápnika a pomeru vápnika k fosforu stehnovej kosti Biomin-H priaznivo ovplyvnil. Vplyv samého vitamínu D₂ a v kombinácii s Biominom-H nebol jednoznačný. V niektorých ukazovateľoch pozitívny účinok Biominu-H potláčal.

Kľúčové slová: Biomin-H, vitamín D₂, ovariectomované samičky potkana, stehnová kosť, BMD, BMC, vápnik, fosfor.

Conclusions: Our results pointed out that the values of densitometric measurements, the ash weight, calcium content and the calcium to phosphorus ratio in the femur were favourably influenced by Biomin-H. The influence of vitamin D₂, either as a separate preparation or in combination with Biomin-H, was not explicit enough to be interpreted. Some indicators even showed that it suppressed the effect of Biomin-H.

Key words: Biomin-H, vitamin D₂, ovariectomized female rats, femur, BMD, BMC, calcium, phosphorus.

Postmenopauzálna osteoporóza je veľmi častým zdravotným problémom u žien v staršom veku. Charakterizuje ju nízka kostná hustota, zhoršenie mikroarchitektúry kostného tkaniva, zvýšená krehkosť kostí a s tým spojené riziko zlomenín. Vplyvom menopauzy klesá koncentrácia ovariálnych hormónov, čo ovplyvňuje okrem iného aj kostný metabolizmus (31). Estrogény blokujú aktiváciu kostného obratu i straty kostnej hmoty priamo vplyvom na funkciu osteoblastov a nepriamo inhibíciou osteoklastov. Znižujú citlivosť kosti na faktory stimulujúce jej resorpciu (21). Zmeny kostného metabolizmu vplyvom nedostatku estrogénov nie sú veľmi odlišné u ľudí a u potkanov (2). Na zvieracom modeli osteoporózy u samičiek potkana je ochorenie simulované vyblokováním pohlavných hormónov vaječníkov ovariectómiou. V dôsledku tejto operácie dochádza k zvýšeniu kostného metabolizmu s narušením rovnováhy medzi osteoformáciou a osteoresorpciou v prospech resorpcie. Následne ubúda i kostná hmota. Zmeny vyvolané stratou kostného tkaniva na holennej, stehnovej kosti a bedrových stavcoch zvieracieho modelu sú podobné ako u postmenopauzálnych žien (41).

Ovariectomované samičky potkana sa najčastejšie používajú v modelových štúdiách sledujúcich potenciónný terapeutický účinok látok v prevencii osteoporózy postmenopauzálnych žien. Výhodou tohto modelu je možnosť určovania rôznych biomechanických a biochemických ukazovateľov priamo na kostiach pri štandardných podmienkach za relatívne krátky čas sledovania (23).

Primeraný príjem vápnika potravou je nevyhnutný pre rast a mineralizáciu kostí u ľudí, ako aj u zvierat. Pre absorpciu vápnika z čreva je nevyhnutné, aby bol pri trávení prijatej potravy v črevnej štave v ionizovanej forme (42). Množstvo prijímaného vápnika z gastrointestinálneho traktu je primárne regulované vitamínom D (20). Vápniková homeostáza v organizme sa zabezpečuje cez črevnú absorpciu, obličkovú exkréciu a mobilizáciou zásob kalcia z kostí (30). Pri nadbytku dobre resorbiteľného vápnika v krmive dochádza k zvýšeniu jeho zásob v kostiach (5).

Vitamín D má významnú úlohu v liečbe osteoporózy. Deriváty vitamínu D sa syntetizovali a testovali na reguláciu príjmu vápnika a vývoj osteoporózy v modeli ovariectomovaných samičiek potkana (8, 28). Z nich 1,25-dihydroxyvitamín D₃ a 24,25-dihydroxyvitamín D₃ zvyšujú absorpciu vápnika i fosforu z gastrointestinálneho traktu,

mineralizáciu kostí a mechanickú pevnosť stehnovej kosti (9, 24).

Vplyvom dlhodobej kombinovanej terapie vápnikom a vitamínom D podávaných v krmnej dávke sa zvýšili: kostná minerálna denzita, kostný minerálny obsah a množstvo vápnika v kostiach rastúcich laboratórnych potkanov (35). Ich prídavok do potravy je efektívny nutričný spôsob prevencie úbytku kostnej hmoty samičiek potkana v zvieracom modeli (36).

Vápnikový biopreparát Biomin-H je vyrobený zo škrupín nezávadných konzumných slepačích vajec. Pre svoje priaznivé zloženie makroprvkov, mikroprvkov i iných bioaktívnych látok sa využíva v prevencii a liečbe osteoporózy. Výsledky polročnej štúdie s Biominom-H u postmenopauzálnych žien ukázali výrazný inhibičný účinok tohto preparátu na osteoresorpciu (37). Vitamín D₂ (ergokalciferol) a jeho deriváty sa využívajú v liečbe porúch kostného metabolizmu u ľudí, podľa najnovších zistení však nemajú priamy vplyv na zvýšenie hustoty kostnej hmoty (10). Účinok vitamínu D₂ je u potkanov menší v porovnaní s vitamínom D₃ i jeho derivátmi (3). Zvýšené dávky vitamínu D₂ sú však u potkanov podobne ako u ľudí toxické v dôsledku hyperkalciémie. Takahashi uvádza, že hodnota LD₅₀ u potkanov je 110,5 mg/kg (0,0354 %) krmnej dávky, pričom dochádza k mineralizácii niektorých orgánov, poškodeniam obličkových kanálikov (32), zvýšeniu obsahu vápnika v aortách (6) a krvácaniu v pľúcach (40).

V práci sme sledovali vplyv štvormesačnej preventívnej liečby Biominom-H a vitamínom D₂ na kostnú minerálnu denzitu, kostný minerálny obsah, popol a jeho minerálne zloženie stehnovej kosti samičiek potkana zvieracieho modelu postmenopauzálnych osteoporózy. Ako kontrolná skupina slúžila skupina simulovane operovaných zvierat.

MATERIÁL A METÓDY

V pokuse boli ovariectomované (OVX) a simulovane operované (SHAM) samice kmeňa Sprague-Dawley (Charles River Wiga GmbH, Nemecko) so živou hmotnosťou 270 g.

Samičky potkana sme rozdelili do 5 skupín po 8 zvierat: zdravá kontrola (SHAM), neliečená ovariectomovaná kontrola (OVX), ovariectomované liečené s Biominom-H (BIO) (prídavok 20,3 g Biominu-H /kg krmnej dávky, t.j. Ca 183

mg/30,5 g krmnej zmesi); vitamínom D₂ [VIT] (prídavok 1000 m.j. ergokalciferolu/kg krmnej dávky, t.j. 31 m.j./30,5 g krmiva); s kombináciou Biominu-H a vitamínu D₂ (BIO-VIT) (v množstve ako v predchádzajúcich skupinách). V každej skupine sme skrmovali štandardnú krmnú zmes MP (TOP DOVO Dobrá Voda) obsahujúcu 7,5 g Ca/kg, 6,5 g P/kg a 1000 m. j. vitamínu D₃/kg zmesi. Skupiny dostávali krmnú dávku (30,5 g) vypočítanú podľa dennej potreby vápnika. Destilovaná voda bola k dispozícii ad libitum.

Na preventívnu liečbu samičiek potkana v modeli osteoporózy sme použili biopreparát Biomin-H (3 g obsahovali Ca 1110 mg, Mg 15 mg, P 1,8 mg a iné biologické látky; Biomin-H, a.s., Trnava) vitamín D₂ (v 1 kapsule 300 000 m.j. ergokalciferolum in solutione oleasa; Slovakofarma, Hlohovec).

Biomin-H a vitamín D₂ sme aplikovali zamiešané v krmnej zmesi. Skupinám liečených zvierat bola určená dávka podávaná od prvého dňa pokusu každý deň (celkovo 110-krát).

Po 15. týždni pokusu sme urobili eutanáziu zvierat a vy-preparovali pravé stehnové kosti samičiek potkana pre denzitometrické vyšetrenie, určenie obsahu vápnika a fosforu v popole. Po dôkladnom očistení sme ich odmastili a zafixovali v 80 % etylalkohole. V takto upravených kostiach sme zisťovali ich kostnú denzitu (BMD) a obsah minerálnych látok (BMC) na denzitometri NORLAND XR-26 pri šírke snímkovania 7,05 a rýchlosti 60 mm/s. Následne boli femury vysušené pri 105 °C počas 12 hodín na určenie sušiny. Po odvážení sa spaľovali v muflových peciach 12 hodín pri teplote 550 °C. Určili sme hmotnosť popola a vzorky sme ďalej mineralizovali 3 M HCl pre určenie obsahu vápnika a fosforu. Množstvo vápnika i fosforu sme určovali fotometricky meraním komplexu vápnika s o-krezolftaleinom a komplexu fosforu s molybdénanom amónnym použitím komerčného kitu (CHEMELEX, S.A., Francúzsko).

Výsledky sme štatisticky vyhodnotili pomocou jednofaktorovej analýzy rozptylu (ANOVA) pre signifikantné analýzy údajov na hladine významnosti 5 % (p<0,05).

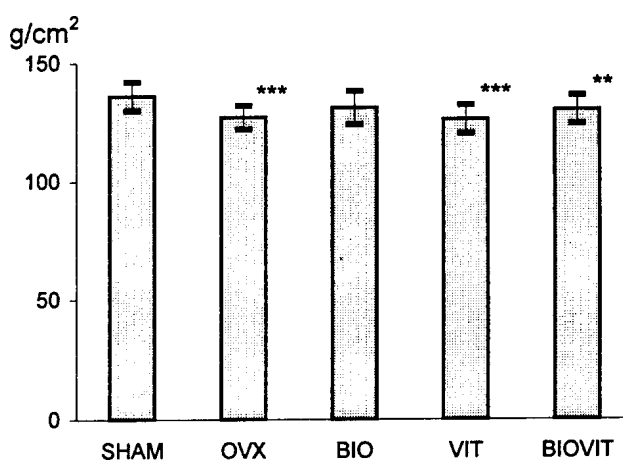
VÝSLEDKY

Hmotnosť OVX liečených i neliečených skupín bola na konci pokusu preukazne vyššia ako v SHAM kontrolách. Hmotnosť sušiny femuru samičiek potkana po prepočte na živú hmotnosť bola signifikantne nižšia u všetkých ovariectomovaných zvierat v porovnaní s SHAM kontrolami. Biominová skupina sa však najviac približovala k simulovanej operovaným kontrolám (tab. 1).

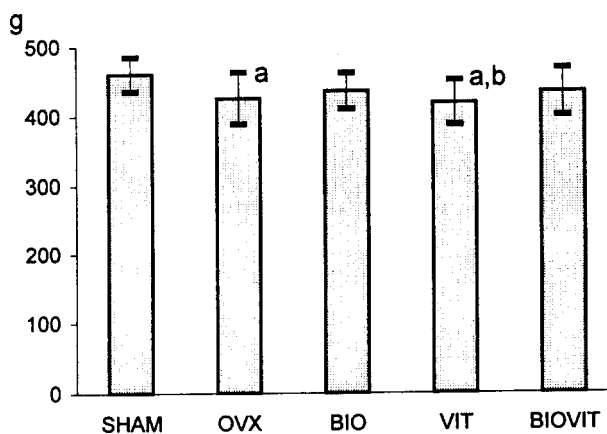
Kostná minerálna denzita a kostný minerálny obsah stehrovej kosti z OVX kontroly i OVX skupiny liečenej vitamínom D₂ boli signifikantne nižšie v porovnaní s SHAM kontrolou (BMD 0,127±0,005 g/cm²; resp. 0,126±0,006 vs 0,136±0,005 g/cm², p<0,01); (BMC 0,425±0,037 g; resp. 0,418±0,032 vs 0,468±0,025 g, p<0,01] (obr. 1 a 2). Biomino-

Tab. 1. Hmotnosť femuru a pomer k živej hmotnosti samičiek potkana.

Skupina zvierat	Hmotnosť femuru		Pomer hmotnosti suchej kosti k živej hmotnosti
	pred vysušením mg	po vysušení mg	
zdravé kontroly	987±58	713±46	0,206±0,018
ovariectomované neliečené	978±61	716±45	0,171±0,010***
liečené s Biomínom-H	1012±67	734±55	0,178±0,015**
liečené s vitamínom D ₂	976±72	709±49	0,169±0,014***
liečené s kombináciou Biomínu-H s vitamínom D ₂	1030±106	740±79	0,173±0,010***



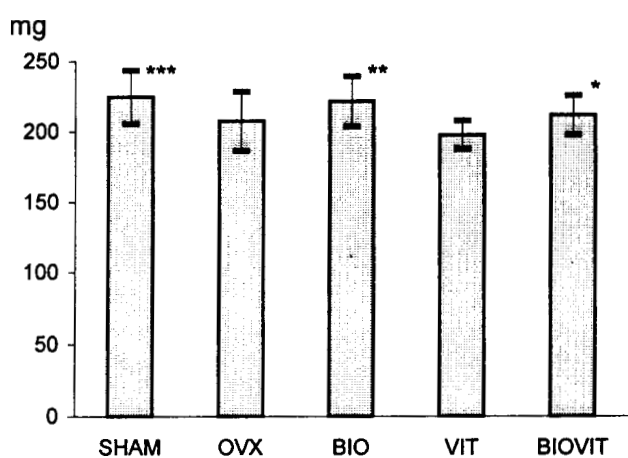
Obr. 1. Kostná minerálna denzita (g/cm²) stehrovej kosti samičiek potkana v 15. týždni preventívnej liečby; zdravá kontrola (SHAM), ovariectomované neliečené (OVX), ovariectomované liečené Biomínom-H (BIO), vitamínom D₂ (VIT), kombináciou Biomínu-H a vitamínom D₂ (BIOVIT).



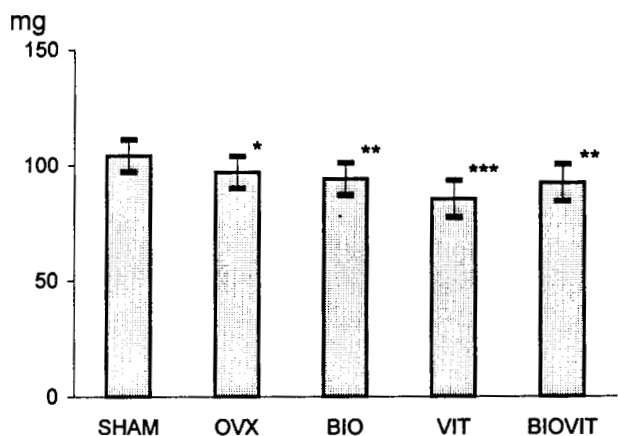
Obr. 2. Minerálny obsah (g) stehrovej kosti samičiek potkana v 15. týždni preventívnej liečby; zdravá kontrola (SHAM), ovariectomované neliečené (OVX), ovariectomované liečené Biomínom-H (BIO), vitamínom D₂ (VIT), kombináciou Biomínu-H a vitamínom D₂ (BIOVIT).

Tab. 2. Hmotnosť popola femuru a pomer vápnika s fosforom.

Skupina zvierat	Popol mg	% Ca v popole	% P	Pomer Ca:P
Zdravé kontroly	487±30	46,25±4,90	21,39±0,83	2,161±0,204 ^b
Ovariectomované neliečené	457±30 ^a	46,20±3,10	21,51±1,02	2,138±0,105 ^b
liečené s Biominom-H	474±37	47,30±3,14	19,81±1,56	2,365±0,209
liečené s vitamínom D ₂	449±31 ^a	44,38±3,70	18,76±1,13	2,339±0,282
liečené s kombináciou Biominu-H s vitamínom D ₂	465±48	46,65±5,38	19,85±1,48	2,311±0,247



Obr. 3. Obsah vápnika (mg) v stehnej kosti samičiek potkana v 15. týždni preventívnej liečby; zdravá kontrola (SHAM), ovariectomované neliečené (OVX), ovariectomované liečené Biominom-H (BIO), vitamínom D₂ (VIT), kombináciou Biominu-H a vitamínom D₂ (BIOVIT).



Obr. 4. Obsah fosforu (mg) v stehnej kosti samičiek potkana v 15. týždni preventívnej liečby; zdravá kontrola (SHAM), ovariectomované neliečené (OVX), ovariectomované liečené Biominom-H (BIO), vitamínom D₂ (VIT), kombináciou Biominu-H a vitamínom D₂ (BIOVIT).

vé skupiny mali tieto ukazovatele vyššie vo vzťahu k OVX kontrolám (vlastný Biomin-H BMD 0,131±0,007 g/cm² a v kombinácii s vitamínom D₂ 0,130±0,006 g/cm²); (vlastný Biomin-H BMC 0,448±0,026 g a v kombinácii s vitamínom D₂ 0,440±0,034 g). Kostný minerálny obsah bol signifikantne vyšší u samičiek potkana liečených Biominom-H (p<0,05) v porovnaní so samičkami potkana liečenými vitamínom D₂.

Hmotnosť popola stehnej kosti samičiek potkana z OVX kontroly i OVX skupiny liečenej vitamínom D₂ bola preukazne nižšia v porovnaní so SHAM kontrolou (p<0,01) (tab. 2).

SHAM kontroly a biominové skupiny mali obsah vápnika v popole femuru signifikantne vyšší oproti skupine OVX liečenej vitamínom D₂ na rôznej hladine významnosti (VIT 197±10 vs BIOVIT 211±14 g, p<0,05; vs BIO 221±18 g, p<0,01; vs SHAM 225±19 g, p<0,001) a nepreukazne oproti kontrole OVX 207±21 g (obr. 3).

Obsah fosforu v popole stehnej kosti potkaníc (obr. 4) bol preukazne vyšší v SHAM kontrole v porovnaní s ovariectomovanými skupinami (SHAM 104±7 vs OVX 97±7 g, p<0,05; vs BIO 94±7 g, vs BIOVIT 92±8 g, p<0,01; vs VIT 85±8 g, p<0,001). Ovariectomovaná skupina s vitamínom D₂ mala preukazne nižšie hodnoty oproti kontrole OVX (p<0,01) a OVX skupine liečenej Biominom-H (p<0,05).

Pomer vápnika k fosforu v popole stehnej kosti samičiek potkana v biominových skupinách oproti SHAM kontrole a ostatným OVX skupinám závisel od množstva prijatého vápnika z krmiva a jeho absorpcie z gastrointestinálneho traktu (tab. 2). Ovariectomovaná skupina liečená Biominom-H mala signifikantne vyššie hodnoty tohto pomeru v porovnaní so SHAM kontrolou pri p<0,05, neliečenou OVX kontrolou pri p<0,01 a skupina OVX s vitamínom D₂ s OVX kontrolou pri p<0,05.

DISKUSIA

Ovariectómia ovplyvňuje využitie živín z krmnej dávky samičkami potkana, čo sa prejavuje vyššími prírastkami živej hmotnosti oproti simulovane operovaným zvieratám s pravidelným pohlavným cyklom (22, 47). Naopak kostná hmota ovariectomovaných samičiek potkana ubúda, o čom

svedčia hodnoty hmotnosti stehrovej kosti (46) po prepočte na živú hmotnosť zvierat.

Nadbytok vápnika vo forme Biominu-H podávaného ako prídavok do krmiva využili ovariektomované samičky potkana i na zvýšenie hustoty kostnej hmoty. Vyššie hodnoty hmotnosti stehnových kostí zvierat pred a po vysušení, ale aj ich popola po spálení, svedčia o dobrej resorbovateľnosti z gastrointestinálneho traktu a následnom zvýšení zásob vápnika v kostiach (16).

Pre sledovanie úbytku kostnej hmoty u ovariektomovaných samičiek potkana sa odporúča aj meranie kostnej minerálnej denzity (13, 29) podobne ako u pacientov s osteoporózou (27). Prídavok vápnikových preparátov i vitamínu D v krmive môže priaznivo ovplyvniť hustotu kostí (35, 36), čo potvrdzujú aj naše výsledky. V skupinách ovariektomovaných samičiek potkana s Biominom-H sa zvýšila kostná minerálna denzita a kostný minerálny obsah oproti OVX kontrole i skupine liečenej vitamínom D₂. Pri testovaní vápnikových prídavkov do krmnej dávky dospeli viacerí autori k podobným zisteniam (11, 42, 43).

Kostný minerálny obsah určený denzitometricky bol síce v porovnaní s hmotnosťou popola stehrovej kosti zvierat nižší asi o 4–7 %, no podobné rozdiely boli už publikované (7, 14). Na určovaní rozdielov medzi skupinami to však nemalo vplyv. Hmotnosť popola stehrovej kosti a podobne i kostný minerálny obsah neliečenej OVX skupiny aj liečenej vitamínom D₂ mal nižšie hodnoty v porovnaní so simulovane operovanou kontrolou (16, 17).

Priaznivý vplyv podávania vápnika vo forme biopreparátu Biomin-H je tiež vo vyššom obsahu vápnika v popole stehrovej kosti samičiek potkana. Namerané hodnoty sú podobné ako v SHAM kontrole (34). Väčšie množstvo vápnika v popole kostí OVX skupín s Biominom-H oproti SHAM kontrole a ostatným OVX skupinám bolo na druhej strane spojené s nižším podielom fosforu v popole, čo sa prejavilo i na pomere týchto makroprvkov. Podobné výsledky boli opísané v literatúre (19, 44, 45).

V preventívnej liečbe ovariektomovaných samičiek potkana sme použili vitamín D₂ (ergokalciferol), ktorý sa podáva pacientom s osteoporózou, aby sme simulovali terapiu ľudí. Priaznivý účinok u ľudí sa nemusí prejavíť na zvieratách. Potvrdila sa druhová špecifickosť účinku vitamínu D₂ (18, 39). V porovnaní s človekom toxickosť vitamínu D₂ u potkanov sa prejavuje už pri nižších dávkach v prepočte na hmotnosť, preto týmto zvieratám v modeloch osteoporózy sa častejšie podáva účinnejší vitamín D₃ a jeho deriváty (1, 12, 15). V monoterapii vitamín D₂ neovplyvnil úbytok kostnej hmoty ovariektomovaných samičiek potkana a výsledky nameraných hodnôt boli podobné ako u neliečených zvierat. V našej štúdií dochádzalo aj k úbytku vápnika z femuru a následne k zníženiu jeho kostnej denzity (4, 12, 25).

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že vitamín D₂ účinnok Biominu-H nezlepšil, skôr naopak, v niektorých uka-

zovateľoch (obsah vápnika a pomer vápnika k fosforu stehrovej kosti) jeho pozitívny vplyv znižoval.

V dôsledku zvýšenej kostnej resorpcie ovariektomovaných zvierat sme zistili nižšie hodnoty kostnej minerálnej denzity, kostného minerálneho obsahu, popola, obsahu vápnika v stehrovej kosti ovariektomovaných samičiek potkana neliečených a liečených s vitamínom D₂ (26). Naše výsledky ukazujú, že najpriaznivejší účinok na preventívnu liečbu ovariektomovaných zvierat mala monoterapia Biominom-H. Výhodou tohto biopreparátu ako prírodného produktu oproti chemicky čistým vápnikovým zlúčeninám je okrem dobre resorbovateľného vápnika aj prítomnosť somatomedínovej aktivity (33) a TGFβ (38), ktoré môžu mať inhibičný efekt na degradáciu kostnej matrix.

Na základe našich zistení u ovariektomovaných samičiek potkana vo zvieracom modeli sa domnievame, že v preventívnej liečbe postmenopauzálny osteoporózy biopreparátom Biomin-H môžu prebiehať podobné zmeny i u žien počas ranného obdobia poklesu koncentrácie ovariálnych hormónov, keď prechodne prudko ubúda kostná hmota.

LITERATÚRA

1. **Aerssens, J., Van Audekercke, R., Talalaj, M., Geusens, P., Bramm, E., Dequeker, J.:** Effect of 1 α -vitamín D₃ and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariektomized rat model. *Endocrinology*, 137, 1996, s. 1358–1364.
2. **Barlet, J.P., Coxam, V., Davicco, M.J., Gaumet, N.:** Modèles animaux d'ostéoporose post-ménopausique. *Reprod Nutr Dev*, 34, 1994, s. 221–236.
3. **Beckman, M.J., Horst, R.L., Reinhardt, T.A., Beitz, D.C.:** Up-regulation of the intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D receptor during hypervitaminosis D: a comparison between vitamin D₂ and vitamin D₃. *Biochem Biophys Res Commun*, 169, 1990, č. 3, s. 910–915.
4. **Boyce, R.W., Weisbrode, S.E., Kinding, O.:** Ultrastructural development of hyperostoidosis in 1,25(OH)₂D₃-treated rats fed high levels of dietary calcium. *Bone*, 6, 1985, s. 165–172.
5. **Bronner, F., Stein, W.D.:** Modulation of bone calcium-binding sites regulates plasma calcium: an hypothesis. *Calcif Tissue Int*, 50, 1992, s. 483–489.
6. **Cannon, E.P., Williams, B.J.:** Raised vascular calcium in an animal model: effects on aortic function. *Cardiovasc Res*, 24, 1990, č. 1, s. 47–52.
7. **W. Cohen, B., Laskey, M.A., Phil, D., Rushton, N.:** Accuracy and precision of bone mineral analysis of the rat femur by dual-energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int*, 52, 1993, s. S157.
8. **DeLuca, H.F., Schones, H.K.:** Vitamin D: recent advances. *Ann Rev Biochem*, 52, 1983, s. 411.
9. **Faugère, M.C., Ikamoto, S., DeLuca, H.F., Malluche, H.H.:** Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. *Amer J Physiol*, 250, 1986, s. E35–E38.
10. **Gallagher, J.C.:** Drug therapy. Calcium and vitamin D. S. 371–389. In: Riggs, B.L., Melton, L.J.: *Osteoporosis*. Philadelphia, Lippincot-Raven Publishers 1995.
11. **Gaumet, N., Seibel, M.J., Giry, J., Lebecque, P., Davicco, M.J., Coxam, V., Rouffet, J., Delmas, P.D., Barlet, J.P.:** Influence of ovariektomy on bone metabolism in very old rats. *Calcif Tissue Int*, 58, 1996, s. 256–262.

12. Geusens, P., Dequeker, J., Nijs, J., Verstraeten, A., Bramm, E.: Prevention and treatment of osteopenia in ovariectomized rat: Effect of combined therapy with estrogens 1-alpha vitamin D, and prednisole. *Calcif Tissue Int*, 48, 1991, s. 127—137.
13. Grier, S.J., Turner, A.S., Alvis, M.R.: The use of dual-energy X-ray absorptiometry in animals. *Investigative Radiology*, 31, 1996, č. 1, s. 50—62.
14. Griffin, M.G., Kimble, R., Hofer, W., Pacifici, R.: Dual-energy X-ray absorptiometry of the rat-accuracy, precision, and measurement of bone loss. *J Bone Miner Res*, 8, 1993, s. 795—800.
15. Harada, M., Takamura, T., Kajakita-Kondo, S., Kozakai, A., Miyahara, T., Kozuka, H., Ikekawa, N., Higuchi, S., Otomo, S.: Elongation of the side chain of analogs of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 prevents osteopenia in a rat model. *Calcif Tissue Int*, 56, 1995, s. 220—226.
16. Chonan, O., Matsumoto, K., Watanuki, M.: Effect of Galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotech Biochem*, 59, 1995, s. 236—239.
17. Kishi, S., Segawa Y., Yamaguchi, M.: Histomorphological confirmation of the preventive effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on bone loss in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull*, 17, 1994, č. 6, s. 862—865.
18. Knutson, J.C., Hollis, B.W., LeVan, L.W., Valliere, C., Gould, K.G., Bishop, C.W.: Metabolism of 1α -hydroxyvitamin D_2 to activated dihydrovitamin D_2 metabolites decreases endogenous $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in rats and monkeys. *Endocrinology*, 136, 1995, č. 11, s. 4749—4753.
19. Kojima, M., Tsutsumi, N., Nagata, H., Itoh, F., Ujiie, A., Kawashima, K., Endo, H., Okazaki, M.: Induction of osteopenia in confined rats. *Biol Pharm Bull*, 17, 1994, č. 7, s. 955—959.
20. Lemann, J.J.: Intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphorus. S. 46—50. In: Favus, M.J. (Ed.): *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. New York, Raven Press 1993.
21. Masaryk, P., Letkovská, A., Zvarka, J.: Fyziológia kosti a vybrané osteopatie. S. 408—442. In: Rovenský, J. a spol. (Eds.): *Reumatológia v teórii a praxi*. IV. Martin, Osveta 1996.
22. Morohashi, T., Sano, T., Harai, K., Yamada, S.: Effects of strontium on calcium metabolism in rats. II. Strontium prevents the increased rate of bone turnover in ovariectomized rats. *Jap J Pharmacol*, 68, 1995, s. 153—159.
23. Mosekilde, L.: Assessing bone quality - animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone*, 17, 1995, Suppl. 4, s. 343S—352S.
24. Nakamura, T., Kurokawa, T., Orimo, H.: Increase in bone volume in vitamin D-repleted rats by massive administration of $24R,25$ (OH) $_2D_3$. *Calcif Tissue Int*, 43, 1988, s. 235—243.
25. Nakamura, T., Kurokawa, T., Orimo, H.: Increased mechanical strength of the vitamin D-replete rat femur by the treatment with a large dose of $24R,25$ (OH) $_2D_3$. *Bone*, 10, 1989, s. 117—123.
26. Nordsletten, L., Kaastad, T.S., Madsen, J.E., Reikerås, O., Øvstebø, R., Strømme, J.H., Falch, J.: The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: A mechanical and densitometric study. *Calcif Tissue Int*, 55, 1994, s. 436—442.
27. Omi, N., Ezawa, I.: The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*, 17, 1995, Suppl. 4, s. 163S—168S.
28. Palmieri, G.M.A., Pitcock, J.A., Brown, P., Karas, J.G., Roen, L.J.: Effect of calcitonin and vitamin D in osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 45, 1989, s. 137—141.
29. Pastoureau, P., Chomel, A., Bonnet, J.: Specific evaluation on localized bone mass and bone loss in the rat using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis. *Osteoporosis Int*, 5, 1995, s. 143—149.
30. Pitcher, T., Pettifor, J.M., Buffenstein, R.: The effect of dietary calcium content and oral vitamin D_3 supplementation on mineral homeostasis in a subterranean mole-rat *Cryptomys damarensis*. *Bone Min*, 27, 1994, s. 145—157.
31. Riggs, B.L., Melton, L.J.: Involutional osteoporosis. *New Engl J Med*, 314, 1986, s. 1676—1686.
32. Rosen, S., Greenfeld, Z., Bernheim, J., Rathaus, M., Podjarny, E., Brezis, M.: Hypercalcemic nephropathy: chronic disease with predominant medullary inner stripe injury. *Kidney-Int*, 37, 1990, č. 4, s. 1067—1075.
33. Rovenský, J., Marek, J., Schreiberová, O., Stančíková, M.: Pritomnosť somatomedínovej aktivity v preparáte Biomin H. *Čas Lék čes*, 1994.
34. Shackelford, M.E., Collins, T.F.X., Black, T.N., Ames, M.J., Dolan, S., Sheikh, N.S., Chi, R.K., O'Donnell, M.W.: Mineral interactions in rats fed AIN-76A diets with excess calcium. *Fd Chem Toxic*, 32, 1994, č. 3, s. 255—263.
35. Schapira, D., Linn, S., Sarid, M., Mokadi, S., Kabala, A., Silbermann, M.: Calcium and vitamin D enriched diets increase and preserve vertebral mineral content in aging laboratory rats. *Cells and Materials*, 4, 1994, č. 2, s. 155—164.
36. Schapira, D., Mokadi, S., Juhn, A., Kabala, A., Silbermann, M.: Calcium and vitamin D enriched diet increases and preserves axial mineral content in aging laboratory rats. *Cells and Materials*, 4, 1994, č. 2, s. 155—164.
37. Stančíková, M., Masaryk, P., Letkovská, A., Rovenský, J., Wendlová, J., Orviský, E.: Vplyv Biominu-H na biochemické ukazovatele kostného metabolizmu u postmenopauzálnych žien s osteoporózou. *Rheumatologia*, 10, 1996, s. 61—65.
38. Stančíková, M., Masaryk, P., Letkovská, A., Rovenský, J., Rakús, S., Bachratý, F.: Effect of Biomin H on the biochemical markers of osteoporosis. In: *1st World congress on calcium and vitamin D in human life*, Roma, Italy, 8.—12.10.1996.
39. Strugnell, S., Byford, V., Makin, H.L., Moriarty, R.M., Gilardi, R., LeVan, L.W., Knutson, J.C., Bishop, C.W., Jones, G.: $1\alpha,24$ (S)-dihydroxyvitamin D_2 : a biologically active product of 1α -hydroxyvitamin D_2 made in the human hepatoma, Hep 3B. *Biochem J*, 310, 1995, s. 233—241.
40. Takahashi, O.: A large dose of ergocalciferol does not cause deficient blood coagulation but is extremely toxic to rats. *Toxicol Lett*, 69, 1993, č. 3, s. 257—272.
41. Thompson, D.D., Simmons, H.A., Pirie, C.M., Ke, H.Z.: FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, 17, 1995, Suppl. 4, s. 125S—133S.
42. Tsugawa, N., Okano, T., Higashino, R., Kimura, T., Oshio, Y., Teraoka, Y., Igarashi, C., Ezawa, I., Kobayashi, T.: Bioavailability of calcium from calcium carbonate, DL-calcium lactate, L-calcium lactate and powdered oyster shell calcium in vitamin D-deficient or -replete rats. *Biol Pharm Bull*, 18, 1995, s. 677—682.
43. Tsuchita, H., Sekiguchi, I., Kuwata, T.: Comparison of the effects of whey mineral complexes on bone metabolism in male growing rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 39, 1993, s. 473—487.
44. Tsuchita, H., Sekiguchi, I., Kuwata, T., Igarashi, C., Ezawa, I.: The effect of casein phosphopeptides on calcium utilization in young ovariectomized rats. *Z Ernährungswiss*, 32, 1993, s. 121—130.
45. Tsuchita, H., Kuwata, T.: Trace lipid from whey-mineral complex enhances calcium availability in young ovariectomized rats. *Brit J Nutr*, 73, 1995, s. 299—309.
46. Wimalawansa, S.J., De Marco, G., Gangula, P., Yallampalli, C.: Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone*, 18, 1996, č. 4, s. 301—304.
47. Yamaguchi, M., Kishi, S.: Prolonged administration of β -alanyl-L-histidinato zinc prevents bone loss in ovariectomized rats. *Jap J Pharmacol*, 63, 1993, s. 203—207.

Do redakcie došlo 23.4.1997.

Adresa autora: Ing. K. Švík, CSc., Ratnovce 195, 922 31 Sokolovce, Slovensko.