

DAMPAK SUPLEMENTASI 1,25-DIHDROKSIVITAMIN D₃ TERHADAP EKSKRESI KALSIMUM URIN DAN AKUMULASI KALSIMUM TULANG TIKUS *WISTAR* PANHISTEREKTOMI YANG MENGGONSUMSI TERI TAWAR

THE IMPACT OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ SUPPLEMENT OF UNSALTED FEED ON CALCIUM URINARY EXCRETION OF PANHISTERECTOMIZED *WISTAR* RATS

Hartiningsih¹, Irkham Widiyono², Devita Anggraeni¹

¹Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: hartiningsih56@yahoo.com

ABSTRACT

The objectives of the research were to study the impact of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplementation on urinary Ca excretion and Ca accumulation in panhisterectomized *Wistar* rats fed with unsalted anchovy. Fifteen female *Wistar* rats, 8 weeks of age, were divided into three groups (control, panhisterectomy, and panhisterectomy+1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement) of five each. At 19 weeks of age, they were placed into individual metabolic cages for a balance study. From day 4 to 11 of the balance study, every day, the feed left over, urine, and feces were collected and recorded for Ca analyses. The results of the research showed that Ca consumption in panhisterectomized rats consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement are not significantly different from the panhisterectomized rats not consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement. The fecal Ca excretion was significantly higher ($P < 0.01$) compared with panhisterectomized rats not consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement and so is the urinary Ca excretion ($P < 0.05$). Calcium retention is lower significantly in panhisterectomized rats consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement compared to panhisterectomized rats not consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement. It is concluded that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement causes hypercalciuria and decreases Ca accumulation in panhisterectomized *Wistar* rats consuming unsalted anchovy.

Key words: panhisterectomy, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, hypercalciuria

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji dampak suplementasi 1,25-dihidroksivitamin D₃ terhadap ekskresi kalsium (Ca) dalam urin dan akumulasi Ca pada tikus *Wistar* panhisterektomi yang mengkonsumsi teri tawar. Limabelas tikus *Wistar* betina umur 8 minggu, dibagi 3 kelompok (kontrol, panhisterektomi dan panhisterektomi +suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃) masing-masing 5 tikus. Ketika berumur 19 minggu, masing-masing tikus dimasukkan kandang metabolik individu untuk studi balan. Selama studi balan (hari 4-11 studi balan), setiap pagi dilakukan pengumpulan feses, urin dan sisa pakan untuk pemeriksaan Ca. Hasil analisis menunjukkan konsumsi Ca tikus panhisterektomi yang mengkonsumsi 1,25-dihidroksivitamin D₃ lebih rendah meskipun tidak berbeda signifikan dibandingkan tikus panhisterektomi yang tidak mengkonsumsi 1,25-

dihidroksivitamin D₃, ekskresi Ca dalam feses lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan ($P < 0,01$), ekskresi Ca dalam urin lebih tinggi dan berbeda signifikan ($P < 0,05$), retensi Ca lebih rendah dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan tikus panhisterektomi yang tidak mengkonsumsi 1,25-dihidroksivitamin D₃. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ menyebabkan hiperkalsiuria dan menurunkan retensi Ca dengan demikian menurunkan akumulasi Ca pada tikus *Wistar* panhisterektomi.

Kata kunci: kalsium, 1,25-dihidroksivitamin D₃, hiperkalsiuria

PENDAHULUAN

Hiperkalsiuria (meningkatnya ekskresi kalsium dalam urin) dapat menjadi pemicu terbentuknya nefrolitiasis dan turunnya massa tulang (Heller, 1999). Nefrolitiasis tidak hanya terjadi pada manusia, tetapi juga banyak terjadi pada hewan seperti anjing dan kucing. Hampir 80% nefrolitiasis berupa garam kalsium, sebagian besar berbentuk kalsium oksalat dan hanya sebagian kecil yang berbentuk kalsium fosfat. Hiperkalsiuria umumnya disebabkan oleh meningkatnya absorpsi Ca intestinal (Coe dkk., 2005; Pak dkk., 2005), reabsorpsi kalsium tulang dan turunnya reabsorpsi kalsium melalui tubulus ginjal. Beberapa peneliti melaporkan bahwa vitamin D bentuk aktif atau 1,25-dihidroksivitamin D₃ berperan dalam absorpsi Ca intestinal melalui aktivasi media transportasi Ca transeluler (Van Cromphaut dkk., 2001; Van Abel, 2003; Van de Graaf, 2004). Pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus ovariektomi dapat meningkatkan absorpsi Ca intestinal (O'Loughlin dan Morris, 1998), dan pada mencit negatif 1 α -hidroksilase dapat menstimulasi media transportasi Ca transeluler, meningkatkan absorpsi Ca dan normalisasi Ca darah (Armbrecht, 1999; van Abel, 2003; Song dkk., 2003). Menurut Jones dkk. (1998) vitamin D sebagai hormon kalsiotropik berperan sebagai sistem homeostasis Ca tubuh, mempertahankan konsentrasi Ca darah dalam

kisaran normal melalui absorpsi Ca intestinal dan melalui mobilisasi Ca tulang, terutama ketika hewan mengkonsumsi pakan yang tidak cukup mengandung Ca atau ada gangguan absorpsi Ca melalui intestinal.

Turunnya absorpsi Ca intestinal dan tingginya ekskresi Ca melalui ginjal karena turunnya 1,25-dihidroksivitamin D₃ dalam darah (Meacham dkk., 1995) dan turunnya estrogen dapat menjadi penyebab hilangnya massa tulang individu pasca menopause (Van den Hauvel, 2000), maupun tikus pascaovariektomi (Watanabe dkk., 2001; O'Loughlin dan Morris, 2003). Hormon estrogen selain berperan dalam absorpsi Ca intestinal (Xu dkk., 2003) juga meningkatkan reabsorpsi Ca melalui tubulus ginjal (McKane dkk., 1995). Terapi sulih hormon yang dimaksudkan untuk menghambat resorpsi tulang dan meningkatkan densitas tulang, mempunyai resiko tinggi atas terjadinya kanker, penyakit pembuluh darah koroner dan efek samping yang lain. Diet alternatif dengan mengkonsumsi teri tawar yang mengandung vitamin D dan mempunyaiimbangan Ca terhadap P yang baik, mungkin dapat dipertimbangkan. Menurut Holick (2004) dan Tangpricha (2003) bahwa teri tawar merupakan sumber vitamin D alami yang banyak mengandung vitamin D. Vitamin D selain berfungsi untuk mineralisasi tulang rangka juga memobilisasi Ca tulang (Jones, 1998). Beberapa peneliti lain melaporkan bahwa kelebihan vitamin D atau

hipervitaminosis D antara lain dapat menyebabkan hiperkalsemia, hiperkalsiuria (Yacobus, 1992) dan meningkatkan reabsorpsi Ca dari dalam tulang (Selby, 1995). Pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ kemungkinan dapat menyebabkan munculnya gangguan pada tulang dan ginjal, terutama jika dikonsumsi individu pasca menopause yang memanfaatkan teri tawar sebagai sumber Ca dan vitamin D. Oleh karena itu penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji dampak suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ terhadap ekskresi Ca dalam urin dan akumulasi Ca pada tikus panhisterektomi yang mengkonsumsi teri tawar. Dengan demikian dapat diperoleh informasi tentang manfaat dan keamanan 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada ginjal selama pemanfaatan 1,25-dihidroksivitamin D₃ untuk pencegahan demineralisasi tulang apabila dikonsumsi oleh individu pasca panhisterektomi (pascamenopause) yang mengkonsumsi teri tawar.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan 15 tikus *Wistar* dan pakan standar yang mempunyai kandungan protein 20%, Ca 0,6%, P 0,04%. Komposisi pakan (% atau gram/100 gram pakan) yang diberikan terdiri dari 78% tepung jagung, 20% tepung ikan teri, 0,7% molase, 0,3% CaCO₃, dan 1,0% vitamin mineral. Tikus ditempatkan dalam kandang individu dengan suhu ruang berkisar 22-25°C, diberi pakan standar dan air minum aquabidestilata secara *ad libitum*. Pada waktu berumur 8 minggu, tikus dibagi 3 kelompok (kontrol, panhisterektomi dan panhisterektomi+suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃) masing-masing 5 tikus. Tikus kelompok kontrol

dan panhisterektomi diberi pakan standar, sementara panhisterektomi+suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ diberi pakan standar+kalsitriol 8 µgram/hari/tikus yang diberikan secara oral. Pada umur 13 minggu tikus kelompok panhisterektomi dan panhisterektomi+suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ dilakukan panhisterektomi. Operasi panhisterektomi dilakukan dengan membuat irisan pada linea alba dari umbilikus ke arah kaudal. Sebagai anestetiknya digunakan campuran ketamin dan *xylazine* yang diinjeksikan secara intramuskuler.

Studi balan untuk mengetahui konsumsi, retensi, dan ekskresi Ca, dilakukan pada waktu tikus umur umur 19 minggu (1,5 bulan pasca panhisterektomi). Selama studi balan (hari ke 4-11) setiap hari sisa pakan dan feses dikumpulkan, dijemur sampai kering, ditimbang dan disimpan pada suhu -5°C untuk pemeriksaan Ca. Pada waktu yang sama, urin dikumpulkan, diukur dan diasamkan (pH 1) dalam larutan HCL 37% selanjutnya juga disimpan dalam suhu -5°C untuk pemeriksaan Ca. Pada akhir studi balan dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan estrogen.

Kalsium pakan diperiksa dengan metoda 0-kresophthalein-komplekson, sedang P organik diperiksa dengan metoda molibdat-vanadat. Pemeriksaan Ca dalam feses dilakukan dengan metoda yang sama, setelah pakan dan feses ditentukan kadar airnya, diabukan pada suhu 600°C. Pemeriksaan Ca urin juga dilakukan dengan metoda yang sama setelah urin diuapkan pada suhu 60°C, dilarutkan dalam asam HCL 37% dan diencerkan dalam aquabidestilata. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan uji-t.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Rerata konsumsi Ca, Ca urin, Ca feses dan retensi Ca (mg/hari), Ca darah (mg/dl), estrogen darah (pg/ml) tikus *Wistar* panhisterektomi yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ (kalsitriol)

	Panhisterektomi	kontrol	Signifikansi
			Panhisterektomi >< kontrol
Konsumsi Ca	68,28±10,36	53,58±5,01	*
Ca feses	25,81±4,98	34,42±9,04	ns
Ca urin	1,47±1,38	0,51±0,21	Ns
Retensi Ca	41,01±7,77	18,65±7,26	**
Ca darah	10,28±0,69	9,99±0,61	Ns
Estrogen	14,54±0,40	15,58±1,29	Ns

Ket.: kontrol = tidak dipanhisterektomi; ns = tidak signifikan; * berbeda signifikan (P<0,05); ** berbeda sangat signifikan (P<0,01)

Dalam penelitian ini, tikus panhisterektomi mengkonsumsi Ca lebih tinggi dan berbeda signifikan dengan tikus kontrol, ekskresi Ca dalam feses tidak berbeda signifikan dengan tikus kontrol (Tabel 1). Lebih tingginya konsumsi Ca yang setara dengan lebih tingginya konsumsi pakan tikus panhisterektomi dibanding tikus kontrol dengan demikian juga mengkonsumsi vitamin D yang lebih tinggi berdampak positif terhadap absorpsi Ca usus yang ditandai dengan tidak berbedanya ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi dibanding tikus kontrol. Nilai absorpsi Ca adalah selisih dari jumlah Ca yang dikonsumsi dengan jumlah Ca yang diekskresikan dalam feses. *Estrogen* yang tidak berbedanya antara tikus panhisterektomi dengan tikus kontrol (Tabel 1) memberi gambaran bahwa lebih tingginya tingkat absorpsi Ca intestinal pada tikus panhisterektomi kemungkinan disebabkan lebih tingginya 1,25-dihidroksivitamin D₃ sehubungan dengan lebih tingginya konsumsi pakan tikus panhisterektomi, dengan demikian juga mengkonsumsi vitamin D yang lebih tinggi. Namun

dalam penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap 1,25-dihidroksivitamin D₃. Didasarkan uraian tersebut di atas, maka lebih tingginya tingkat absorpsi Ca intestinal yang ditandai lebih tingginya konsumsi Ca dan tidak adanya perbedaan ekskresi Ca dalam feses antara tikus panhisterektomi dengan tikus kontrol menunjukkan adanya keterkaitan dengan kemungkinan lebih tingginya 1,25-dihidroksivitamin D₃ tikus panhisterektomi. Wood dkk. (1998) juga melaporkan bahwa penelitian pada tikus *Wistar* yang mengkonsumsi vitamin D lebih tinggi, meningkatkan 1,25-dihidroksivitamin D₃ plasma dan meningkatkan absorpsi Ca intestinal. Beberapa peneliti melaporkan terjadinya peningkatan absorpsi Ca intestinal yang ditandai meningkatnya media transportasi Ca transeluler pada mencit yang diinjeksi 1,25-dihidroksivitamin D₃ intraperitoneal (Song dan Fleet, 2007), maupun pada tikus *Sprague Dawley* betina yang diinfus 1,25-dihidroksivitamin D₃ (Wood, 1998) dan tikus *Wistar* yang mengkonsumsi vitamin D lebih tinggi (Veith dkk., 2000).

Tabel 2. Rerata konsumsi Ca, Ca urin, Ca feses dan retensi Ca (mg/hari), Ca darah (mg/dl), estrogen darah (pg/ml) tikus *Wistar* panhisterektomi yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ (kalsitriol)

	panhisterektomi	panhisterektomi+vi tamin D ₃	Signifikansi
			panhisterektomi>< panhisterektomi+vitamin D ₃
Konsumsi Ca	68,28±10,36	61,80±6,48	Ns
Ca feses	25,81±4,98	36,41±4,52	**
Ca urin	1,47±1,38	4,28±2,54	*
Retensi Ca	41,01±7,77	21,05±6,77	*
Ca darah	10,28±0,69	10,36±0,43	ns
Estrogen	14,54±0,40	14,23±0,27	ns

Ket.: ns = tidak signifikan; * berbeda signifikan ($P < 0,05$); ** berbeda sangat signifikan ($P < 0,01$); Panhisterektomi = tikus panhisterektomi yang tidak diberi kalsitriol; Panhisterektomi+vitamin D₃ = tikus panhisterektomi yang diberi kalsitriol

Tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ mengkonsumsi Ca tidak berbeda signifikan dengan tikus panhisterektomi yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ ($P > 0,05$), mengekskresikan Ca dalam feses lebih tinggi sangat signifikan ($P < 0,01$) dan mengekskresikan Ca dalam urin lebih tinggi dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dipitaing dengan tikus panhisterektomi yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ (Tabel 2). Lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses menunjukkan bahwa pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus panhisterektomi menurunkan absorpsi Ca usus. Lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ kemungkinan merupakan kompensasi tubuh untuk mempertahankan Ca serum dalam kisaran normal yang kemungkinan disebabkan oleh tingginya 1,25-dihidroksivitamin D₃ dalam darah sehingga menekan produksi dan sekresi hormon paratiroid. Menurut Trechsel (1979) suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ sehingga meningkatkan kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃ darah menyebabkan terjadinya regulasi umpan balik

(feedback) oleh 1,25-dihidroksivitamin D₃ untuk meminimalkan atau memperkecil dampak toksik vitamin D. Brenza dkk. (1998), Takeyama dkk. (1997). Trechsel dkk. (1979) juga melaporkan bahwa pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ sehingga meningkatkan kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃ darah berdampak pada turunnya hormon paratiroid dengan demikian menyebabkan turunnya induksi aktivitas promotor 1 α -hidroksilase pada ginjal untuk mensintesis 1,25-dihidroksivitamin D₃ dengan demikian menekan produksi 1,25-dihidroksivitamin D₃. Menurut Bruder dkk. (2001) dan Deftos (2001) hormon paratiroid memicu ginjal untuk menghasilkan 1,25-dihidroksivitamin D₃, selanjutnya hormon paratiroid bersama-sama dengan 1,25-dihidroksivitamin D₃ berperan dalam meningkatkan absorpsi Ca usus. Lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses tikus yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ menunjukkan adanya keterkaitan dengan kemungkinan lebih rendahnya hormon paratiroid akibat tingginya kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃. Temuan tersebut memberi gambaran bahwa pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃

pada tikus panhisterektomi yang mengkonsumsi pakan teri tawar menekan sekresi hormon paratiroid yang secara tidak langsung berdampak turunya absorpsi Ca intestinal. Namun, dalam penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃ dan hormon paratiroid.

Lebih tingginya ekskresi Ca dalam urin tikus yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ juga menunjukkan adanya keterkaitan dengan kemungkinan lebih rendahnya hormon paratiroid akibat lebih tingginya kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃. Hiperkalsiuria terjadi akibat turunya sekresi hormon paratiroid sehubungan dengan lebih tingginya kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃ (Gomez dkk., 2008). Menurut Mihai dan Fardon (2000), untuk mempertahankan Ca darah dalam kisaran normal, sistem homeostasis Ca terutama hormon paratiroid antara lain beraksi pada ginjal untuk meningkatkan reabsorpsi Ca yang ditandai turunya ekskresi Ca melalui urin. Hiperkalsiuria pada tikus yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ kemungkinan merupakan dampak sekunder turunya kadar hormon paratiroid akibat lebih tingginya 1,25-dihidroksivitamin D₃ tikus *Wistar* yang mengkonsumsi pakan teri tawar, dengan demikian konsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ beresiko terhadap nefrolitiasis. Menurut Monk dan Bushinsky (2003) kebanyakan nefrolitiasis sangat terkait dengan hiperkalsiuria.

Retensi Ca tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ lebih rendah dan berbeda signifikan dengan tikus panhisterektomi yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃. Retensi mineral Ca adalah selisih dari jumlah mineral Ca yang dikonsumsi dengan jumlah mineral Ca yang diekskresikan dalam

feses dan urin. Selisih dari jumlah mineral yang dikonsumsi dengan jumlah mineral yang diekskresikan dalam feses dan urin diartikan sebagai balan mineral (Toromanoff, 1997). Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa lebih rendahnya konsumsi Ca meskipun tidak berbeda signifikan dengan tikus yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ dan lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses dan urin tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ yang berbeda signifikan dengan tikus yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ nampaknya menjadi faktor penyebab lebih rendahnya retensi Ca tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃. O'Loughlin dan Morris (1994) juga melaporkan keterkaitan antara balan atau retensi Ca dengan akumulasi mineral dalam tulang. Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa panhisterektomi meningkatkan akumulasi mineral Ca dalam tulang tikus *Wistar* yang mengkonsumsi pakan teri tawar, sementara suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ menurunkan retensi Ca dengan demikian menurunkan akumulasi mineral Ca dalam tulang. Menurut Wood (2000), retensi atau balan Ca merefleksikan terjadinya keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang selama proses remodeling tulang. Retensi Ca positif menunjukkan lebih tingginya pembentukan tulang dipitaing resorpsi tulang, dan sebaliknya. Dari uraian tersebut di atas memberi gambaran bahwa pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus panhisterektomi meskipun meningkatkan ekskresi Ca dalam urin (hiperkalsiuria) sehingga beresiko terhadap nefrolitiasis, namun berpengaruh positif terhadap pembentukan tulang yang ditandai retensi Ca positif. Dari hasil penelitian dapat

disimpulkan bahwa suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ menyebabkan hiperkalsiuria dan menurunkan akumulasi Ca pada tikus *Wistar* panhisterektomi yang ditandai retensi Ca positif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian hasil Penelitian Ilmu-ilmu Dasar (PID). Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DP2M) DIKTI tahun anggaran 2006 yang telah memberi dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Armbrecht, H.J., Boltz, M.A., Kumar, V.B. 1999. Intestinal plasma membrane calcium pump protein and its induction by 1,25(OH)₂D₃ decrease with age. *Am J Physiol Gastrointest liver physiol.* 277:41-47.
- Brenza, H.L., Kimmeljehan, C., Jehan, F., Shinki, T., Wakino, S., Anzawa, H., Suda, T., DeLuca, H.F. 1998. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃ 1-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1387-1391.
- Bruder, J.M., Guise, T.A., Mundy, G.R. 2001. Mineral Metabolism. In: *Endocrinology & Metabolism*, Fourth Edition, P. Felig and LA Frohman (eds.); Chapter 22:1079-1159.
- Coe, F.L., Evan A., Worcester, E. 2005. Kidney stone disease. *J Clin Invest* 115:2598-2608.
- Deftos, L.J. 2001. Immunoassays for PTH and PTHrP In: *The Parathyroids*, Second Edition, JP Bilezikian, R Marcus, and A Levine (eds.), Chapter 9:143-165.
- Gomez, S.A., dos Reis, L.M., Noronha, I.L., Heilberg, I.P. 2008. RANKL is a Mediator of bone resorption in idiopathic hypercalciuria. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3:1446-1452.
- Harris, L.E. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals, Vol. Animal Science Dept. Utah State Univ., Logan, Utah.
- Heilberg, I.P., Weisinger, J.R. 2006. Bone disease in hypercalciuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 15:394-402.
- Heller, H.J. 1999. The role of calcium in the prevention of kidney stones. *J Am Nutr* 18:373S-378S.
- Holick, M.F. 2004. Vitamin D : Importance in the prevention of cancer , type I diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79:362-371.
- Jones, G., Strugnell, S.A., DeLuca, H.F., 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 78:1193-1231.
- Kruse-Jarres, J.D. 1979. *Klinische chemie, pita II, Spezielle Klinisch-chemische analytic.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- McKane, W.R, Khosla, S., Burritt, M.F., Kao, P.C., Wilson, D.M., Ory, S.J., Riggs, B.L. 1995. Mechanism of renal calcium conservation with estrogen replacement therapy in women in early postmenopause - a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:3458-3464.
- Meacham, S.L., Taper, L.J., Volve, S.L. 1995. Effect of boron supplementation on blood and urinary calcium , magnesium and phosphorous, and urinary boronin athletic and sedentary women. *Am J Clin Nut.* 61:341-345.
- Mihai, R., Faradon, J.R. 2000. Parathyroid disease and calcium metabolism. *Britis Journal of Anaesthesia.* 85:29-43.
- Monk, R.D., Bushinsky, D.A. 2003. Kidney stones. In *Williams texbook of endocrinology*. PR Larsen, HM Kronenberg, S Melmed, and KS Polonsky, Editor WB Saunders Philadelphia, Pennsylvania, USA:1411-1425.
- O'Loughlin, P.D., Morris, H.A. 1994. Oophorectomy in the young rat impairs calscium balance by increasing intestinal calcium secretion. *J Nutr* 124:726-731.
- _____. 1998. Estrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in rat. *J Physiol.* 511:313-322.
- _____. 2003. Oophorectomy acutely increases calcium excretion in adult rats. *J Nutr* 133:2277-2280.
- Pak, C.Y., Odvina, C.V., Pearle, M.S., Sakhaee, K., Peterson, R.D., Poindexter, J.R., Brinkley, L.J. 2005. Effect of dietary modification on urinary stone risk factors. *Kidney Int.* 68:2264-2273.

- Sarker, Ray B.C., Chaunan, U.P.S. 1967. A new methode for determining microquantities of calcium in biological material. *Anal Biochem* 20: 155.
- Selby, P.L., Davies, M., Marks, J.S., Mawer, E.B. 1995. Vitamin D intoxication causes hypercalcemia by increased bone resorption which responds topamidronate. *Clin Endocrinol.* 43:531-536.
- Song, Y., Kato, S., Fleet, J.C. 2003. Vitamin D Receptor (VDR) Knockout Mice Reveal VDR-Independent Regulation of Intestinal Calcium Absorption and ECac2 and Calbindin D9k mRNA. *J. Nutr:* 133:374-380.
- Takeyama, K., Kitanaka, S., Sato, T., Kobori, M., Yanagisawa, J., Kato, S. 1997. 25-Hydroxyvitamin D3 1-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* 277:1827-1830.
- Tangpricha, V., Koutika, P., Ricke, S.M., Chen, T.C., Perez, A.A., Holick, M.F. 2003. Fortification of orange juice with vitamin D : a novel approach to enhance vitamin D nutritional health. *Am J Clin Nutr:* 77:1478-83.
- Toromanoff, A., Ammann, P., Mosekilde, L., Thomsen, J.S., Riond, J. 1997. Parathyroid hormone increases bone formation and improve mineral balance in vitamin D-deficient female rats. *Endocrinology* 138 : 2449-2457.
- Trechsel, U., Bonjour, J.P., Fleisch, H. 1979. Regulation of the metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 in primary cultures of chick kidney cells. *J Clin Invest.* 64: 206-217.
- Van Abel, M., Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., van Leeuwen, J.P., Bindels, R.J. 2003. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 285:978-985.
- Van Cromphaut, S.J., Dewerchin, M., Hoenderop, J.G., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R.J., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G. 2001. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:13324-13329.
- Van de Graaft, S.F., Boullart, I., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. 2004. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 by 1,25 dihydroxy vitamin D3 and dietary Ca²⁺. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90:303-308.
- Van den Heuvel, E.G., Schoterman, M.H., Muijs, T. 2000. Transgalacto-oligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J Nutr:* 130:2938-2942.
- Veith, R., Milojevic, S., Peltekova, V. 2000. Improved cholecalciferol nutrition in rats is noncalcemic, suppresses parathyroid hormone and increases responsiveness to 1,25 dihydroxycholecalciferol. *J Nutr:* 130:578-584.
- Wanfort, H.B., and Flecknell, P.A. 1992. Specific surgical operations. In : *Experimental and Surgical Technique in the Rat* (2nd ed.). New York: Academic Press:203-312.
- Watanabe, O., Hara, H., Ayoma, Y., Kasai, T. 2001. Improving effect of feeding with a phosphorylated guar gum hydrlysate on calcium absorption impaired by ovariectomy in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65:613-618.
- Wood, R.J. 2000. Searching for determinants of intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr.* 72:675-676.
- Wood, R.J., Fleets, J.C., Cashman, K., Bruns, M.E., Deluca, H.F. 1998. Intestinal calcium Absorption in the Aged rats : Evidence of Intestinal resistance to 1,25(OH)₂ Vitamin D. *Endocrinology* Vol. 39, 9:3843-3848
- Xu, H, Uno, J.K., Inouye, M., Xu, L., Dress, J.B., Collin, J.F., and Ghishan, F.K., 2003. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am. Physiol Gastrointest.* 285:G1317-G1324.
- Yacobus, C.H., Holick, M.F., Shao, Q. 1992. Hypervitaminosis associated with drinking milk. *N Engl J Med.* 326:1173-1177.