

SUPLEMENTASI CALCITRIOL MENINGKATKAN RETENSI KALSIUM TIKUS OVARIEKTOMI

CALCITRIOL SUPPLEMENTATION INCREASED CALCIUM OVARECTOMIZED RATS

Hartiningsih¹, Devita Anggraeni¹, Dhirgo Aji¹

¹Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
E-mail: hartiningsih56@yahoo.com

ABSTRACT

The objective of the research was to study calcitriol supplementation for 1.5 months in ovariectomized rats on calcium retention. Fifteen female *Wistar* rats, at 8 weeks of age were randomly allotted into three groups of five (normal group/N, ovariectomized group/Ov and ovariectomized group + calcitriol supplement/OvD). Group N and Ov rats were fed standard diet, while group OvD rats was fed standard diet+calcitriol supplementation. At 14 weeks of age, they were placed into individual metabolic cages for balance studies. From day 4 to 7 of the balance studies, the remaining food, urine, and feces were collected and recorded every day for Ca analyses. The research results showed that Ca retention and Ca consumption were not significantly different after calcitriol supplementation, however calcitriol tend to increased Ca consumption and Ca retention. Meanwhile fecal Ca and urinary Ca excretion were significantly higher ($P<0.01$) in ovariectomized rats consuming calcitriol supplement. Based on the results, it was concluded that calcitriol supplementation tend to increased Ca retention.

Key words : Calcitriol, Ca retention, ovariectomized

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji suplementasi calcitriol selama 1,5 bulan pada tikus *Wistar* ovariektomi terhadap retensi kalsium (Ca). Lima belas tikus *Wistar* umur 8 minggu, secara acak dibagi 3 kelompok (normal/ N, ovariektomi/Ov, dan ovariektomi+ calcitriol/OvD) masing-masing 5 tikus. Tikus kelompok N dan Ov diberi pakan standar, sedangkan tikus kelompok OvD diberi pakan standar+calcitriol. Pada umur 14 minggu, tikus dimasukkan kandang metabolik individu untuk studi balan. Pada hari 4-7 studi balan, setiap hari sisa pakan, urin dan feses dikoleksi untuk pemeriksaan Ca. Hasil penelitian menunjukkan bahwa retensi Ca dan konsumsi Ca pada tikus OvD cenderung meningkat meskipun tidak berbeda signifikan, sedangkan ekskresi Ca dalam feses dan urin meningkat sangat signifikan ($P<0,01$). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa suplementasi calcitriol selama 1,5 bulan pada tikus ovariektomi cenderung meningkatkan retensi Ca.

Kata kunci: Calcitriol, retensi Ca, ovariektomi

PENDAHULUAN

Retensi atau balan Ca merefleksikan terjadinya keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang selama proses remodeling tulang. Retensi Ca yang lebih tinggi menunjukkan lebih tingginya pembentukan tulang dibanding resorpsi tulang, dan sebaliknya. Turunnya hormon estrogen pada masa menopause sering dikaitkan dengan meningkatnya resorpsi tulang, turunnya densitas tulang dan resiko tinggi terjadi patah tulang (Stone dkk, 1998; Slemenda dkk, 1996; Rae dkk, 1991). Turunnya estrogen menurunkan absorpsi Ca usus dan meningkatkan ekskresi Ca melalui ginjal (van Abel dkk, 2003; van Abel dkk, 2002; Hoenderop dkk, 1999) menyebabkan balan Ca negatif, meningkatkan resorpsi Ca tulang dan hilangnya massa tulang individu pasca menopause (Holzherr dkk, 2000; van den Hauvel dkk, 2000), maupun tikus pasca ovariectomi (Watanabe dkk, 2001; O'Loughlin and Morris, 2003).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa estrogen bekerja langsung pada duodenum untuk mempromotori absorpsi Ca secara transeluler (Xu dkk, 2003; Van Abel dkk, 2003), dan bekerja langsung pada ginjal untuk meningkatkan reabsorpsi Ca dalam tubulus ginjal (McKane dkk, 1995; Van Abel dkk, 2002). Pada tulang, estrogen selain bekerja langsung dengan menurunkan pembentukan osteoklas dan aktivitas osteoklas untuk meresorpsi tulang (Baylink dkk, 1993; Manolagas, 2000), dan secara tidak langsung melalui penghambatan aktifitas hormon paratiroid (Khosla dkk, 1997; Notelovitz, 1997), dan melalui aktivasi ginjal untuk mengkonversi vitamin D₂ (25-dihidroksivitamin D₂) menjadi vitamin D₃ (1,25-dihidroksivitamin D₃)

(Notelovitz, 1997).

Suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ selain berfungsi untuk mempertahankan kadar Ca darah agar tetap berada dalam kisaran normal, juga berfungsi dalam proses mineralisasi tulang rangka (Jones dkk, 1998). Pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan 1,25-dihidroksivitamin D₃ plasma (Wood dkk, 1998; Vieth dkk, 2000), menstimulasi media transportasi Ca transeluler, mempromotori absorpsi Ca usus dan reabsorpsi Ca tubulus ginjal (van Cromphaut dkk, 2001; Hoenderop dkk, 2001; van Abel dkk, 2003; Song dkk, 2003; van de Graaf dkk, 2004), memicu pembentukan tulang dan meningkatkan densitas tulang dengan mempromotori sintesis osteokalsin oleh osteoblas dan proses mineralisasi matriks tulang (Anderson dkk, 2006; Hendy dkk, 2006; Jones dkk, 1998). Namun konsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada dosis tinggi dapat menyebabkan hiperkalsemia, hiperkalsiuria, meningkatkan resorpsi Ca dalam tulang (Yacobus dkk, 1992; Selby dkk, 1995).

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji suplementasi 1,25-dihidroksivitamin D₃ (calcitriol) pada tikus ovariectomi yang mengkonsumsi teri tawar terhadap retensi Ca. Selain diharapkan bermanfaat untuk mencegah demineralisasi Ca tulang pada individu pasca ovariectomi (menopause), juga dapat diperoleh informasi tentang pemanfaatan calcitriol yang aman apabila dikonsumsi dalam waktu yang lama.

MATERI DAN METODA

Lima belas tikus *Wistar* betina umur 8 minggu dan pakan standar yang mempunyai kandungan

protein 24%, Ca 0,6%, P 0,4% digunakan dalam penelitian ini. Komposisi pakan (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*. Tikus dibagi 3 kelompok (normal/N sebagai kontrol, ovariektomi/Ov, dan ovariektomi+ suplemen calcitriol/OvD) masing-masing 5 tikus. Suplemen calcitriol (kolkatriol, PT. Phapros Tbk.) diberikan secara oral sebanyak 8 µgram/hari/tikus. Seminggu pascaadaptasi pakan, dilakukan operasi ovariektomi (pengambilan ovarium) sesuai metode yang digambarkan Wanfort dan Flecknell (1992) yaitu dengan membuat sayatan pada linea alba mulai dari umbilikus ke arah kaudal. Sebagai anestetika digunakan campuran ketamin 10% dosis 50 mg/kg berat badan dan xylazine 2% dosis 5 mg/kg berat badan yang diinjeksikan intramuskuler. Hal yang sama dilakukan pada tikus kontrol meskipun tidak dilakukan pengambilan ovarium (operasi semu). Satu hari pascaoperasi, semua tikus diberi perlakuan selama 6 minggu.

Lima minggu pasca operasi, setiap tikus dimasukkan kandang metabolik individu untuk studi balan selama 1 minggu. Studi balan, untuk mengetahui retensi Ca (konsumsi Ca, ekskresi Ca feses dan urin) dimulai setelah adaptasi hari ke 4 (hari ke 4-8). Selama studi balan, setiap hari sisa pakan dan feses dikumpulkan, ditimbang dan disimpan pada suhu -5°C untuk pemeriksaan Ca. Pada waktu yang sama, urin juga dikumpulkan, diukur, diasamkan (pH 1) dalam larutan HCl 37%, dan disimpan pada suhu -5°C untuk pemeriksaan Ca.

Kalsium dan fosfor pakan diperiksa dengan alat *automatic chemistry Beckman Counter synchron Cx9 Pro.*, metoda *Arsenazo III*. Pemeriksaan Ca dalam feses dilakukan dengan metode yang sama, setelah pakan dan feses ditentukan kadar airnya, diabukan pada suhu 600C sesuai dengan metode yang diterangkan oleh Harris (1970). Pemeriksaan Ca urin juga dilakukan dengan metode yang sama setelah urin diuapkan pada suhu 60C, dilarutkan dalam asam HCl 37% dan diencerkan dalam aquabidestilata sesuai dengan metode Harris (1970). Data Ca yang diperoleh dianalisis dengan uji faktorial.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis konsumsi Ca menunjukkan bahwa pemberian suplemen calcitriol pada tikus ovariektomi berpengaruh meningkatkan konsumsi Ca meskipun tidak berbeda signifikan dengan tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol dan tikus kontrol. Dalam penelitian ini, lebih tingginya konsumsi Ca pada tikus ovariektomi yang diberi suplemen calcitriol diduga disebabkan oleh turunnya estrogen. Hartiningsih dkk (2006) melaporkan bahwa tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ mempunyai konsentrasi estrogen cenderung lebih rendah meskipun tidak berbeda nyata dengan tikus tanpa suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃. Selain itu, tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ juga mengkonsumsi Ca yang lebih tinggi. Penelitian pada tikus *Wistar* umur 8 minggu yang dilakukan Liang dkk (2002) menunjukkan kenaikan konsumsi pakan sebanyak 12% dalam waktu 3 minggu pasca ovariektomi dan konsumsi pakan turun 10-20% setelah diberi

estradiol selama 2 minggu. Wade (1985) dan Liang dkk (2002) juga melaporkan bahwa pemberian estrogen menurunkan konsumsi pakan. Dalam penelitian ini, konsumsi Ca tikus ovariectomi tanpa suplemen calcitriol tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan tikus normal meskipun cenderung lebih tinggi. Hartiningih dkk (2006) juga

melaporkan bahwa tikus panhisterektomi mempunyai konsentrasi estrogen tidak berbeda nyata dengan tikus normal. Dari temuan tersebut memberi gambaran bahwa tingginya konsumsi Ca tikus ovariectomi yang diberi suplemen calcitriol, diduga terkait dengan turunnya konsentrasi estrogen.

Tabel 1. Rata-rata konsumsi Ca, rata-rata Ca feses, Ca urin, dan retensi Ca pada tikus *Wistar* yang mengkonsumsi teri tawar tanpa suplemen calcitriol dan yang diberi suplemen calcitriol selama 6 minggu pasca ovariectomi

Kelompok	Ovariectomi+kalsitriol	Ovariectomi	Normal
Konsumsi Ca (g/hari)	11,46±3,42 ^a	9,70±2,93 ^a	7,42±2,42 ^a
Ca feses (mg/hari)	1,57±0,26 ^b	1,48±0,63 ^{bb}	1,48±0,73 ^{bb}
Ca urin (mg/hari)	0,054±0,009 ^c	0,032±0,022 ^{cc}	0,03±0,007 ^{cc}
Retensi Ca (mg/hari)	9,79±3,59 ^d	8,19±2,60 ^d	5,91±1,89 ^d

Keterangan :

Angka dalam satu baris dengan huruf superskrip yang sama, tidak beda signifikan

Hasil analisis ekskresi Ca dalam feses menunjukkan bahwa pemberian suplemen calcitriol pada tikus ovariectomi berpengaruh meningkatkan ekskresi Ca dalam feses. Dengan uji LSD ekskresi Ca dalam feses pada tikus ovariectomi yang diberi suplemen calcitriol lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan tikus ovariectomi tanpa diberi suplemen calcitriol dan tikus normal (Tabel 1). Ekskresi Ca dalam feses pada tikus ovariectomi tanpa suplemen calcitriol tidak berbeda nyata dengan tikus normal (Tabel 1).

Lebih tingginya konsumsi Ca tikus ovariectomi yang diberi suplemen calcitriol yang diduga akibat turunnya estrogen, juga diduga menjadi penyebab turunnya absorpsi Ca intestinal yang ditandai lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses. Penelitian yang dilakukan Song dkk, (2003) menunjukkan bahwa mencit yang mengkonsumsi pakan mengandung Ca

rendah 0,02% selama 1 minggu meningkatkan absorpsi Ca intestinal sebanyak 2,3 kali ($57,2 \pm 2,8\%$) dibanding mencit yang mengkonsumsi Ca 0,5% ($17,3 \pm 2,0\%$), dan mencit yang mengkonsumsi pakan mengandung Ca tinggi 2% menurunkan absorpsi Ca intestinal sebanyak 75% ($4,4 \pm 0,5\%$) dibanding mencit yang mengkonsumsi Ca 0,5% ($17,3 \pm 2,0\%$). Dari uraian tersebut diperoleh gambaran bahwa turunnya estrogen secara tidak langsung diduga menjadi penyebab tingginya ekskresi Ca dalam feses. Selain akibat lebih tingginya konsumsi Ca, lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses tikus ovariectomi yang diberi suplemen calcitriol, secara langsung juga diduga disebabkan turunnya estrogen pada tikus ovariectomi yang diberi suplemen calcitriol. Menurut Chen dan Kalu (1998) estrogen berperan langsung dalam absorpsi Ca intestinal secara transpot aktif melalui reseptor

estrogen yang terdapat pada sel mukosa usus halus. Van Abel dkk (2003) juga melaporkan bahwa estrogen beraksi langsung pada duodenum untuk mempromotori absorpsi Ca secara transeluler atau melalui transpot aktif yang ditandai dengan meningkatnya media absorpsi Ca secara transeluler seperti *Transient Receptor Potential-Vanilloid* (TRPV5 dan TRPV6), protein pengangkut Ca kalbindin-D_{9k}, dan pompa Ca *Plasma membran Ca²⁺-ATPase* (PMCA1b). Scholz-Ahrens dkk (2007) melaporkan bahwa nilai absorpsi Ca intestinal adalah selisih dari jumlah Ca yang dikonsumsi dengan jumlah Ca yang diekskresikan dalam feses. *Dalam penelitian ini*, lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses tikus ovariektomi yang diberi suplemen calcitriol *memberi gambaran bahwa turunnya konsentrasi estrogen menjadi penyebab* lebih rendahnya tingkat absorpsi Ca intestinal. Ekskresi Ca dalam feses pada tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol yang tidak berbeda nyata dengan tikus normal juga diduga terkait dengan tidak berbedanya *konsentrasi estrogen* pada tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol dengan tikus normal. Dari temuan tersebut memberi gambaran bahwa ekskresi Ca dalam feses tikus ovariektomi terkait dengan konsentrasi estrogen. Tingginya ekskresi Ca dalam feses pada tikus ovariektomi diduga terkait dengan turunnya konsentrasi estrogen.

Hasil analisis ekskresi Ca dalam urin menunjukkan bahwa pemberian suplemen calcitriol pada tikus ovariektomi berpengaruh meningkatkan ekskresi Ca dalam urin. Dengan uji LSD ekskresi Ca dalam urin pada tikus ovariektomi yang diberi suplemen calcitriol lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan tikus ovariektomi

tanpa diberi suplemen calcitriol dan tikus normal (Tabel 1). Ekskresi Ca dalam urin pada tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol tidak berbeda nyata dengan tikus normal (Tabel 1). *Dalam penelitian ini*, lebih tingginya ekskresi Ca dalam urin pada tikus ovariektomi yang diberi suplemen calcitriol juga diduga *terkait dengan turunnya konsentrasi estrogen*. Turunnya estrogen meningkatkan ekskresi Ca melalui ginjal (Van Abel dkk 2002; Hoenderop dkk, 1999). Van Abel dkk. (2002) melaporkan bahwa estrogen berperan langsung dalam reabsorpsi Ca dalam tubulus ginjal secara transeluler. Dilaporkan juga bahwa pemberian suplemen estrogen (17 β -Estradiol) berpengaruh meningkatkan reabsorpsi Ca dalam tubulus ginjal tikus melalui pengaturan ekspresi *epithel calcium channel* (ECaCl) yang tidak tergantung pada 1,25-dihidroksivitamin D₃. Penelitian yang dilakukan secara *in vivo* menunjukkan bahwa defisiensi hormon estrogen meningkatkan pembuangan Ca melalui ginjal yang dapat dikoreksi dengan terapi pengganti estrogen (Nordin dkk, 1991; Prince dkk, 1991). Ekskresi Ca dalam urin pada tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol yang tidak berbeda nyata dengan tikus normal juga diduga terkait dengan tidak berbedanya *konsentrasi estrogen* pada tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol dengan tikus normal. Uraian tersebut memberi gambaran bahwa tingginya ekskresi Ca dalam urin tikus ovariektomi diduga terkait dengan turunnya konsentrasi estrogen.

Hasil analisis retensi Ca menunjukkan bahwa suplemen calcitriol tidak berpengaruh terhadap retensi Ca meskipun cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol dan tikus normal (Tabel 1).

Menurut O'Loughlin dan Morris (1994) ada keterkaitan antara balan atau retensi Ca dengan akumulasi mineral dalam tulang. Sedangkan menurut Wood (2000) retensi atau balan Ca merefleksikan terjadinya keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang selama proses remodeling tulang. Retensi Ca yang lebih tinggi menunjukkan lebih tingginya pembentukan tulang dibanding resorpsi tulang, dan sebaliknya. Retensi Ca tikus ovariektomi yang diberi suplemen calcitriol meskipun tidak berbeda dengan retensi Ca tikus ovariektomi tanpa suplemen calcitriol dan tikus normal, namun cenderung lebih tinggi, dengan demikian memberi gambaran terjadi pengendapan Ca atau akumulasi Ca dalam tulang dan keseimbangan antara pembentukan tulang dengan resorpsi tulang. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa suplementasi calcitriol cenderung meningkatkan retensi Ca tikus ovariektomi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian hasil Penelitian Hibah Penelitian Bagian tahun 2011. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah memberi dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, G.L., Chlebowski RT., Rossouw JE., et al. 2006. Prior hormone therapy and breast cancer risk in the women's health initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas* 55:103-115.
- Baylink, D.J., Finkelman, R.D., Mohan, S. 1993. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res.* 8:565-72.
- Chen, C., Kalu, D.N. 1998. Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *JPET.* 286:328-333.
- Harris, L.E. 1970. *Nutrition research techniques for domestic and wild animals*, Vol.1 Animal Science Dept. Utah State Univ., Logan, Utah.
- Hartiningsih, Widiyono, I., Anggraeni, D. 2006. Peranan ikan teri tawar dan 1,25-dihidroksivitamin D3 dalam kesehatan tulang dan ginjal : Studi penanggulangan osteoporosis. Penelitian fundamental Perguruan Tinggi.
- Hendy, G.N., Hruska, K.A., Mathew, S., and Goltzman, D. 2006. New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D. *Kidney Int.* 69:218-223.
- Hoenderop, J.G., Van der Kemp, A.W., Hartog, A., Van de Graaf, S., Van Os, C.H., Willems, P.H., Bindels, R.J. 1999. Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -responsive epithelia. *J Biol Chem.* 274: 8375-8378.
- Hoenderop, J.G., Mülle, D., Van Der Kemp, A.W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P.H., Van O, C.H., Bindels, R.J. 2001. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol.* 12: 1342-1349.
- Holzherr, M.L., Retallack, R.W., Gutteridge, D.H., Price, R.I., Faulkner, D.I., Wilson, S.G., Will, R.K., Steward, G.O., Stuckey, B.G., Prince, R.L., Criddle, R.A., Kent, G.N., Bhagat, C.I., Dhaliwal, S.S., Jamrozik, K. 2000. Calcium absorption in postmenopausal osteoporosis : benefit of HRT plus calcitriol, but not HRT alone, in both malabsorbers and normal absorbers. *Osteoporos Int.* 11:43-51.
- Jones, G., Strugnell, S.A. and DeLuca, H.F. 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 78:1193-1231.

- Khosla, S., Atkinson E.J., Melton, L.J.III, Riggs, B.L. 1997. Effects of age and estrogen status on parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: A population-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1552-1527.
- Liang, Y.Q., Akishita, M., Kim, S., Ako, J., Hashimoto, M., Iijima, K., Ohike, Y., Watanebe, T., Sudoh, N., Toba, K., Yoshizumi, M., Ouchi, Y. 2002. Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. *International Journal of Obesity* 26:1103-1198.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 21:115-137.
- 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.
- Notelovitz, M. 1997. Estrogen therapy and osteoporosis: principles & practice. *Am J Med Sci.* 313:2.
- Nordin, B.E.C., Need, A.G., Morris, H.A., Horowitz, M., Robertson, W.G. 1991. Evidence for a renal calcium leak in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 72:401-407.
- O'Loughlin, P.D., Morris, H.A. 1994. Oophorectomy in young rats impairs calcium balance by increasing intestinal calcium secretion. *J. Nutr.* 124:726-731.
- O'Loughlin, P.D., Morris, H.A. 2003. Oophorectomy acutely increases calcium excretion in adult rats. *J Nutr.* 133:2277-2280.
- Prince, R.L., Smith, M., Dick, I.M., Price, R.I., Webb, P.G., Henderson, N.K., Harris, M.M. 1991. Prevention of postmenopausal osteoporosis: A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy. *N Engl J Med.* 325: 1189–1195.
- Scholz-Ahrens, K.E., Delin, G., Stampa, B., Helfenstein, A., Hahne, H.J., Acil, Y., Timm, W., Barkmann, R., Hassenpflug, J., Schrezenmeir, J., Gluer, C.C. 2007. Glucocorticosteroid-induced osteoporosis in adult primiparous Gottingen miniature pigs : effects on bone mineral and mineral metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E385-E395.
- Selby, P.L., Davies, M., Marks, J.S., Mawer, E.B. 1995. Vitamin D intoxication causes hypercalcemia by increased bone resorption which responds to pamidronate. *Clin Endocrinol.* 43:531-536.
- Slemenda, C., Longcope, C., Peacock, M., Hui, S. Johnston, C.C. 1996. Sex steroids, bone mass, and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. *J Clin Invest.* 97:14-21.
- Stone, K., Bauer, D.C., Black, D.M., Sklarin, P., Ensrud, K.E. Cumming, S.R. 1998. Hormonal predictors of bone loss in elderly women : a prospective study. The study of osteoporotic fractures research group. *J Bone Miner Res.* 13:1167-1174.
- Song, Y., Kato, S., Fleet, J.C. 2003. Vitamin D receptor (VDR) knockout mice reveal VDR-independent regulation of intestinal calcium absorption, ECaC2 and Calbindin D_{9k} mRNA. *J Nutr.* 133:374-380
- Van Abel, M., Hoenderop, J.G.J., Dardenne, O., St Arnaud, R., Van Os, C.H., Van Leeuwen, H.J.P.T.M., Bindels, R.J.M. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of EcaC1 in the kidney. *J Am Nephrol.* 13:2102-2109.

- Van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. 2003. Regulation of the epithelial Ca^{2+} 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 Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6 by $1\alpha,25$ dihydroxy vitamin D_3 and dietary Ca^{2+} . *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90:303-308.
- Van den Heuvel, E.G., Schoterman, M.H., Muijs, T. 2000. Transgalactooligo-saccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J Nutr.* 130:2938-2942.
- Vieth, 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.
- Wade, G.N., Gray, J.M., Bartness, T.J. 1985. Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes.* 9(1):83–92.
- Wanfort, H.B., 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., Fleets, J.C., Cashman, K., Bruns, M.E., Deluca, H.F. 1998. Intestinal calcium absorption in the aged rats : Evidence of intestinal resistance to $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D. *Endocrinology.* 39(9):3843-3848.
- Wood, R.J. 2000. Searching for determinants of intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr.* 72:675-676.
- Xu, H., Uno, J.K., Inouye, M., Xu, L., Dress, J.B., Collin, J.F., Ghishan, F.K. 2003. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am J 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.