

Respons Tulang Femur Tikus Ovariohisterektomi yang Mengkonsumsi Kasein dan Disuplementasi *Calcitriol* Selama 30 Minggu

(THE RESPONSE OF BONE FEMUR OVARIOHISTERECTOMIZED RATS CONSUMING CASEIN AND CALCITRIOL SUPPLEMENTATION FOR 30 WEEKS)

Hartiningsih¹, Devita Anggraeni¹,
Irkham Widiyono², Hastari Wuryastuty²

¹Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi, ² Bagian Ilmu Penyakit Dalam,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna 2 Kampus UGM Jogjakarta
E-mail: hartiningsih56@yahoo.com

ABSTRAK

Suplementasi *calcitriol* pada tikus ovariohisterektomi menurunkan retensi kalsium. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji respons tulang femur tikus ovariohisterektomi yang mengkonsumsi kasein dan suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu. Sebanyak 20 ekor tikus *Wistar* betina umur delapan minggu, dibagi empat kelompok yaitu : tidak diovariohisterektomi tanpa suplementasi *calcitriol* (N) dan tidak diovariohisterektomi diberi suplementasi *calcitriol* (ND), ovariohisterektomi tanpa suplementasi *calcitriol* (O), dan ovariohisterektomi diberi suplementasi *calcitriol* (OD), masing-masing lima tikus. Tiga puluh minggu pascaoperasi, tikus dietanasi, tulang femur kiri diambil untuk pemeriksaan histopatologi dan immunohistokimia. Gambaran immunohistokimia metafisis tulang femur distalis tikus O dan OD terlihat sedikit *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula tulang. Gambaran histopatologi rongga sumsum tulang dan spikulum trabekula di bagian metafisis tulang femur distalis pada tikus ND dan N terlihat normal, sedangkan pada tikus O dan OD terlihat pelebaran rongga sumsum tulang dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang, dan penurunan jumlah spikulum trabekula. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa tulang femur tikus ovariohisterektomi yang mengkonsumsi kasein dan atau kasein dengan suplementasi *calcitriol* 8 ng/hari selama 30 minggu menunjukkan ketidakseimbangan antara resorpsi tulang dengan pembentukan tulang yang ditandai dominasi resorpsi tulang.

Kata-kata kunci : *calcitriol*, tulang femur, ovariohisterektomi

ABSTRACT

Calcitriol supplementation in ovariohisterectomized rat was known to decreased calcium retention. The objective of the research was to study the response of femur bone to calcitriol supplementation for 30 weeks in ovariohisterectomized rats consuming casein. Twenty female Wistar rats at 8 weeks of age were randomly divided into four groups (unovariohisterectomy without calcitriol supplementation (N), unovariohisterectomy with calcitriol supplementation (ND), ovariohisterectomy without calcitriol supplementation (O) and ovariohisterectomy with calcitriol supplementation (OD) of five each. Thirty weeks after surgery, femur was taken for histopathological and immunohistochemistry examination. Immunohistochemistry of distal femur metaphysis in group O and OD were revealed decreasing *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) in trabecular bone, which was located in bone marrow space, and also in trabecular speculum surface. Histopathological analysis of distal femur metaphysis in group N and ND were showed normal structure, meanwhile, distal femur metaphysis in group O and OD were shown some abnormalities, such as increased of bone marrow space, domination of adipocytes in the bone marrow, and decreased of trabecular bone speculum in metaphysis. Based on the results, it was concluded that femur bone of ovariohisterectomized rats fed casein with and without calcitriol 8ng/day supplementation for 30 weeks were showed unbalanced between resorption and formation of bone which was domination by bone resorption.

Key words : *calcitriol*, femur, ovariohisterectomy

PENDAHULUAN

Tulang sebagai tempat penyimpanan mayoritas kalsium (Ca) tubuh berperan mempertahankan Ca darah dalam kisaran normal melalui keseimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang selama proses *remodeling* tulang (Hoenderop, 2005; Nakamura *et al.*, 2003; Hoenderop *et al.*, 2002). Estrogen berperan menekan *remodeling* tulang (Manolagas *et al.*, 2002) dengan menekan resorpsi tulang, menurunkan pembentukan, aktivitas, dan umur osteoklas (Teitelbaum, 2000; Hughes *et al.*, 1996), dan meningkatkan pembentukan tulang dengan meningkatkan pembentukan osteoblas, diferensiasi, proliferasi, dan fungsi osteoblas, meskipun bervariasi tergantung pada hewan model (Qu *et al.*, 1998). Penurunan hormon estrogen pada masa menopause sering dikaitkan dengan meningkatnya resorpsi tulang, turunnya densitas tulang, dan risiko tinggi terjadi patah tulang (Stone *et al.*, 1998; Slemenda *et al.*, 1996; Rae *et al.*, 1991).

Terapi sulih hormon dengan estradiol dapat menghambat reabsorpsi tulang, meningkatkan densitas tulang, dan menurunkan risiko patah tulang (Anderson *et al.*, 2004; Rossouw *et al.*, 2002), namun mempunyai risiko tinggi terjadi *stroke*, emboli paru, kanker payudara, dan kanker rahim (Rossouw *et al.*, 2002; Rodan dan Martin, 2000; Beresford *et al.*, 1997; Berkvist dan Persson, 1996; Colditz *et al.*, 1995). Pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan 1,25-dihidroksivitamin D₃ plasma (Vieth *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 1998), memicu pembentukan tulang oleh osteoblas (Zhou *et al.*, 2006). Hartiningsih *et al.*, (2012) melaporkan bahwa tikus ovariohisterektomi yang mengkonsumsi teri tawar dan suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu meningkatkan retensi Ca, menurunkan aktivitas osteoklas dan mencegah osteoporosis. Holick (2004) melaporkan bahwa untuk mencukupi kebutuhan vitamin D pada individu yang mendapatkan paparan matahari terbatas, dianjurkan mengkonsumsi kasein, namun dilaporkan Hartiningsih *et al.*, (2012) bahwa suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu pada tikus ovariohisterektomi yang mengkonsumsi kasein menurunkan retensi Ca. Menurut Wood (2000) retensi Ca merefleksikan keseimbangan antara pembentukan dan resorpsi tulang selama *remodeling* tulang. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengkaji respons tulang tikus ovariohisterektomi yang mengkonsumsi kasein

dan suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu melalui perubahan aktivitas sel resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang oleh osteoblas secara histopatologi dan immunohistokimia pada tulang femur.

METODE PENELITIAN

Sebanyak 20 ekor tikus putih *Wistar* betina umur delapan minggu, bobot badan 125-135 gram dan diberi pakan standar yang mempunyai kandungan protein 20%, Ca 0,6%, fosfor (P) 0,4% digunakan dalam penelitian ini. Komposisi pakan (g/100 g pakan) standar yang diberikan selama perlakuan berasal dari 75% jagung, 15% kasein, 1,0% CaCO₃ dan 0,7% CaH₂PO₄, 3,0% molase, 0,3% minyak sayur, 5% vitamin dan mineral. Tikus ditempatkan dalam kandang individu (panjang kandang 23,5 cm, lebar 15 cm, dan tinggi 13 cm) dengan suhu ruang berkisar 22-25°C, diberi pakan standar dan air minum berupa air suling/*aquabidestilata* secara *ad libitum*. Tikus dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok tidak ovariohisterektomi diberi pakan standar tanpa suplementasi *calcitriol* (N) dan dengan suplementasi *calcitriol* 8 ng/hari/tikus secara oral/*dicekok* (ND), kelompok ovariohisterektomi diberi pakan standar tanpa suplementasi *calcitriol* (O) dan dengan suplementasi *calcitriol* 8 ng/hari/tikus secara oral/*dicekok* (OD) masing-masing lima tikus. Lima minggu pasca adaptasi pakan, semua tikus dilakukan operasi laparotomi dengan membuat sayatan pada *linea alba* mulai dari umbilikus ke arah kaudal, pada tikus kelompok ovariohisterektomi dilanjutkan dengan pengambilan uterus dan ovarium sesuai metode yang digambarkan Wanfort dan Flecknell (1992). Hal yang sama dilakukan pada tikus tidak ovariohisterektomi meskipun tidak dilakukan pengambilan uterus dan ovarium (operasi semu). Anestetik yang digunakan terdiri dari campuran ketamin 10% dosis 50 mg/kg bobot badan dan *xylazine* 2% dosis 5 mg/kg bobot badan yang diinjeksikan secara intramuskuler.

Satu hari pascaoperasi, dilakukan pengekokan *calcitriol* selama 30 minggu. Pada akhir perlakuan, tikus dietansi, tulang femur kiri diambil dan difiksasi dalam formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologi dan analisis *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) dengan metode immunohistokimia *streptavidin biotin*. Gambaran histopatologi dan immunohistokimia TRAP5b pada tulang femur

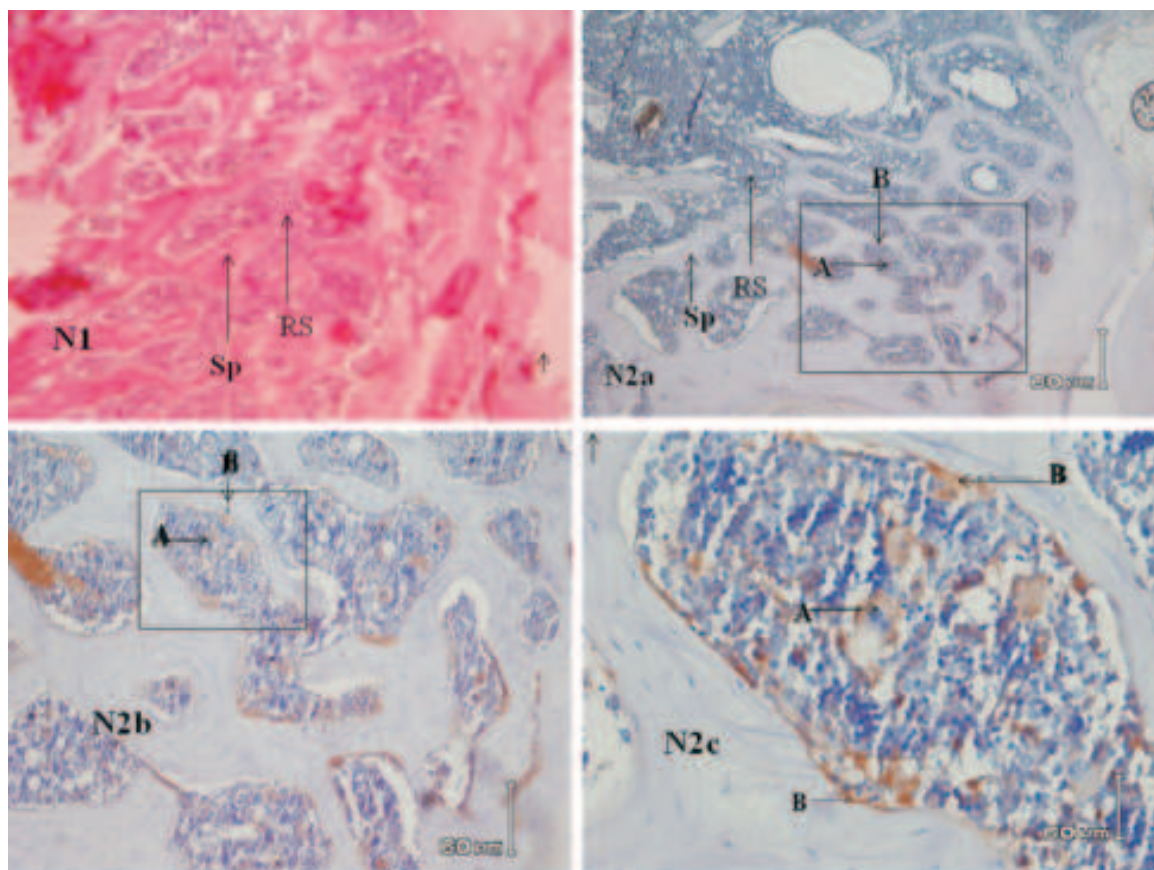
dianalisis secara diskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran immunohistokimia trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang dan permukaan spikulum trabekula bagian metafisis tulang femur distalis dengan antibodi monoklonal *anti* TRAP5b pada tikus N (Gambar 1) dan tikus ND (Gambar 2) terlihat ekspresi TRAP5b positif berwarna coklat. Penggunaan TRAP5b sebagai petanda resorpsi tulang adalah sesuai dengan laporan beberapa peneliti bahwa osteoklas selama meresorpsi tulang mensekresikan TRAP5b (Halleen *et al.*, 2000; Vaananen *et al.*, 2000; Alatalo *et al.*, 2000; Janckila *et al.*, 2001). Ljusberg *et al.*, (1999) melaporkan bahwa TRAP5b berperan dalam resorpsi tulang baik secara intraseluler maupun ekstraseluler.

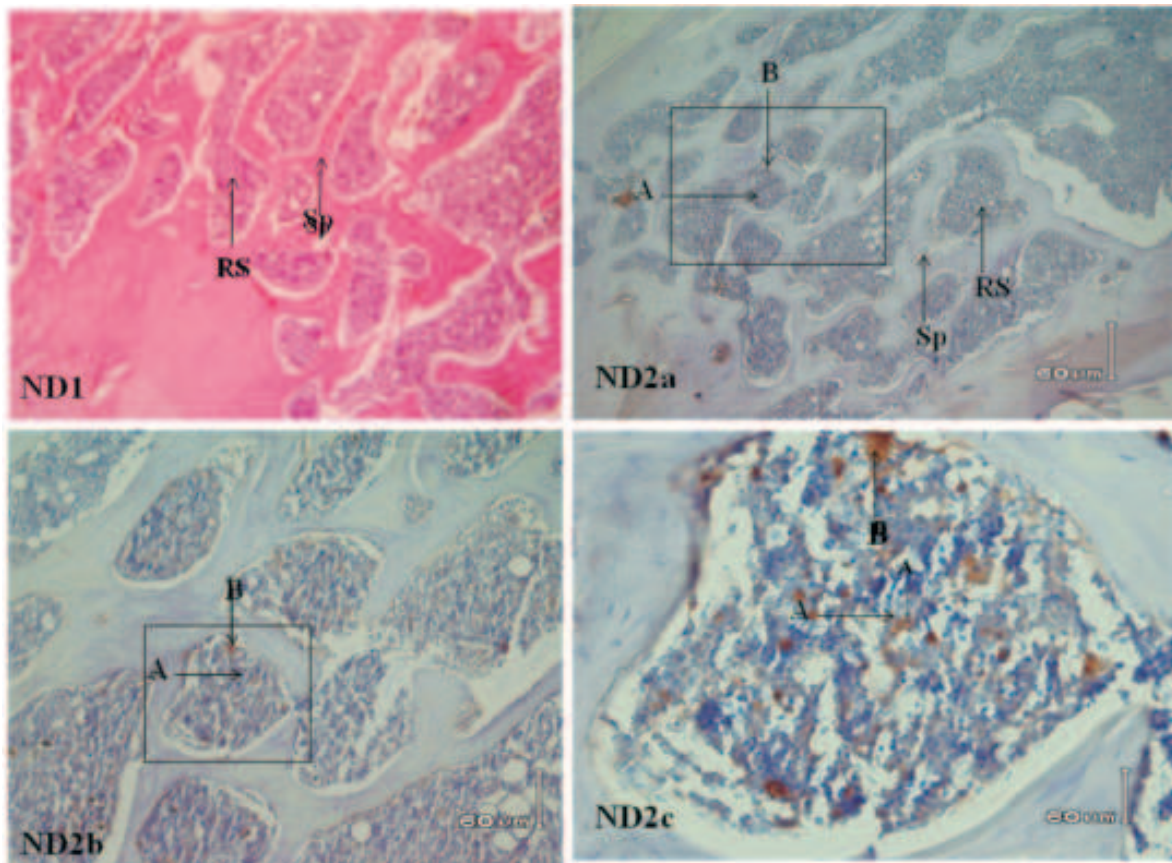
Menurut Reinholt *et al.*, (1990) peran ekstraseluler TRAP5b selama resorpsi tulang ditunjukkan oleh akumulasinya di dalam matriks tulang yang berbatasan dengan *ruffled border* osteoklas yang meresorpsi tulang, sedangkan menurut Halleen *et al.*, (1999a) peran intraseluler TRAP5b selama resorpsi tulang ditunjukkan dari keberadaannya dan aktivitasnya di dalam vesikel transitotik.

Gambaran histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus N (Gambar 1) dan tikus ND (Gambar 2) secara diskriptif tidak terlihat perbedaan, luas rongga sumsum tulang di antara spikulum trabekula terlihat normal, rongga sumsum tulang didominasi jaringan hematopoietik, tebal dan jumlah spikulum trabekula juga terlihat normal, tetapi secara kuantitatif tidak dilakukan pengukuran



Gambar 1. Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus tidak diovariorektomi tanpa suplementasi *calcitriol* (N1) terlihat rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan hematopoietik dalam rongga sumsum tulang (RS), jumlah spikulum trabekula normal (Sp) (Hematoksilin- eosin, 100x.).

Bagian metafisis tulang femur distalis tikus tidak diovariorektomi tanpa suplementasi *calcitriol* (N2) diberi antibodi monoklonal *anti tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (A) dan permukaan spikulum trabekula (B) (N2a=Streptavidin-biotin, 100x.; N2b=Streptavidin-biotin, 250x.; dan N2c=Streptavidin -biotin,1000x.).



Gambar 2. Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus tidak diovariohisterektomi yang diberi suplementasi *calcitriol* (ND1) terlihat rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan hematopoietik dalam rongga sumsum tulang (RS), jumlah spikulum trabekula normal (Sp) (Hematoksili-eosin, 100x).

Bagian metafisis tulang femur distalis tikus tidak diovariohisterektomi diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (ND2) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (A) dan permukaan spikulum trabekula (B) (ND2a=Streptavidin-biotin, 100x.; ND2b= Streptavidin-biotin, 250x.; dan ND2c=Streptavidin-biotin, 1000x).

terhadap spikulum trabekula karena tidak tersedianya alat ukur spikulum trabekula. Penggunaan spikulum trabekula sebagai penanda keberadaan osteoblas adalah sesuai laporan Shiraishi *et al.*, (2000) bahwa rekrutmen, diferensiasi osteoblas, dan pembentukan tulang oleh osteoblas ditandai dengan tebal spikulum trabekula. Chavassieux *et al.*, (2007), Martin dan Sims (2005), dan juga Notelovitz (1997) melaporkan bahwa tulang sebagai jaringan dinamis, secara konstan selalu mengganti dan memperbarui dirinya sendiri melalui proses *remodeling*, suatu proses keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh

osteoblas. Hasil pemeriksaan immunohistokimia dan histopatologi pada bagian metafisis tulang femur distalis tikus N dan ND menunjukkan proses *remodeling* tulang berlangsung normal, terjadi keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas. Sesuai laporan Chavassieux *et al.*, (2007), Martin dan Sims (2005), dan Notelovitz (1997), hal tersebut memberi gambaran tidak ada perbedaan aktivitas pada tulang sebagai organ yang terlibat dalam sistem homeostasis Ca. Hartiningsih *et al.*, (2012) melaporkan bahwa tikus normal yang diberi diet kasein dan suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu mengkonsumsi Ca, dan mengekskresi

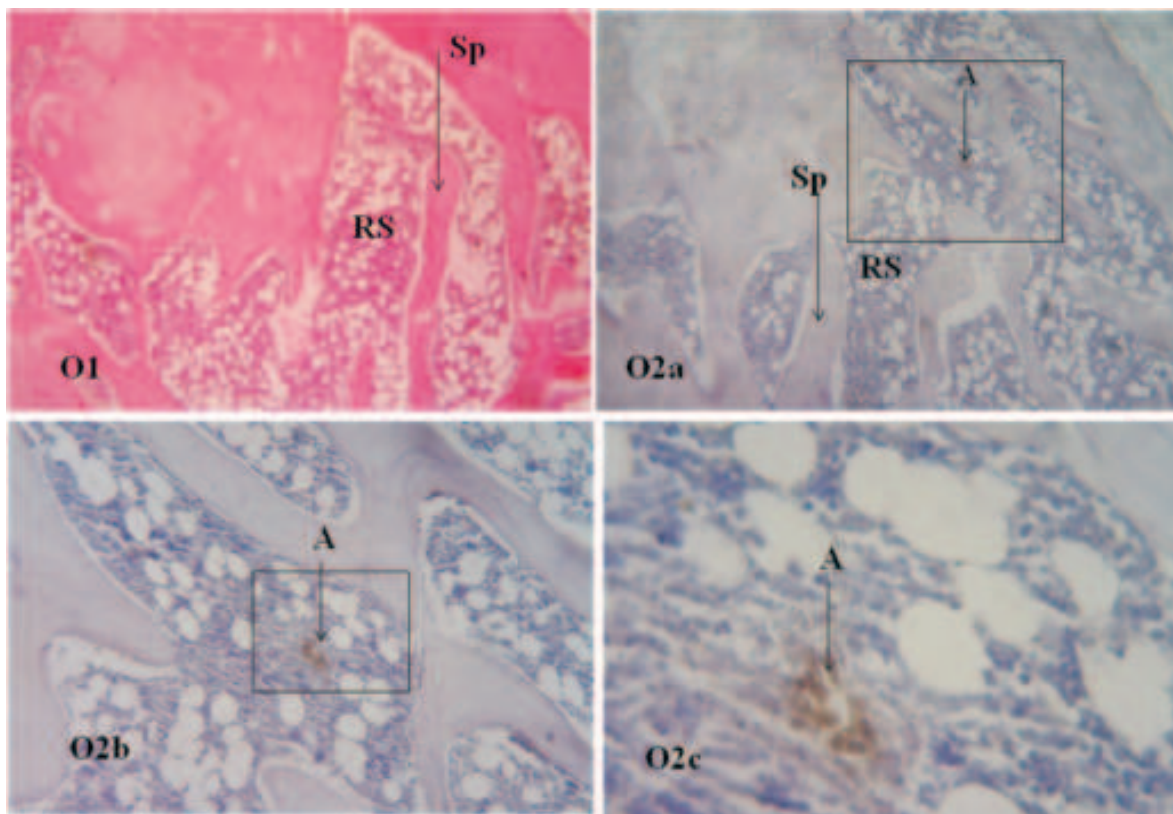
Ca feses dan urin cenderung lebih tinggi namun tidak berbeda signifikan dengan tikus normal tanpa diberi suplementasi *calcitriol* yang memberi gambaran tidak ada perubahan aktivitas pada organ yang terlibat dalam sistem homeostasis Ca.

Gambaran histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus O (Gambar 3) dan tikus OD (Gambar 4) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang, dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang, dan penurunan tebal dan jumlah spikulum trabekula yang memberi gambaran terjadi peningkatan resorpsi tulang selama proses *remodeling* pada tulang sebagai organ yang berperan dalam sistem homeostasis Ca.

Hartiningsih *et al.*, (2012) melaporkan bahwa tikus ovariohisterektomi tanpa suplementasi *calcitriol* maupun yang diberi

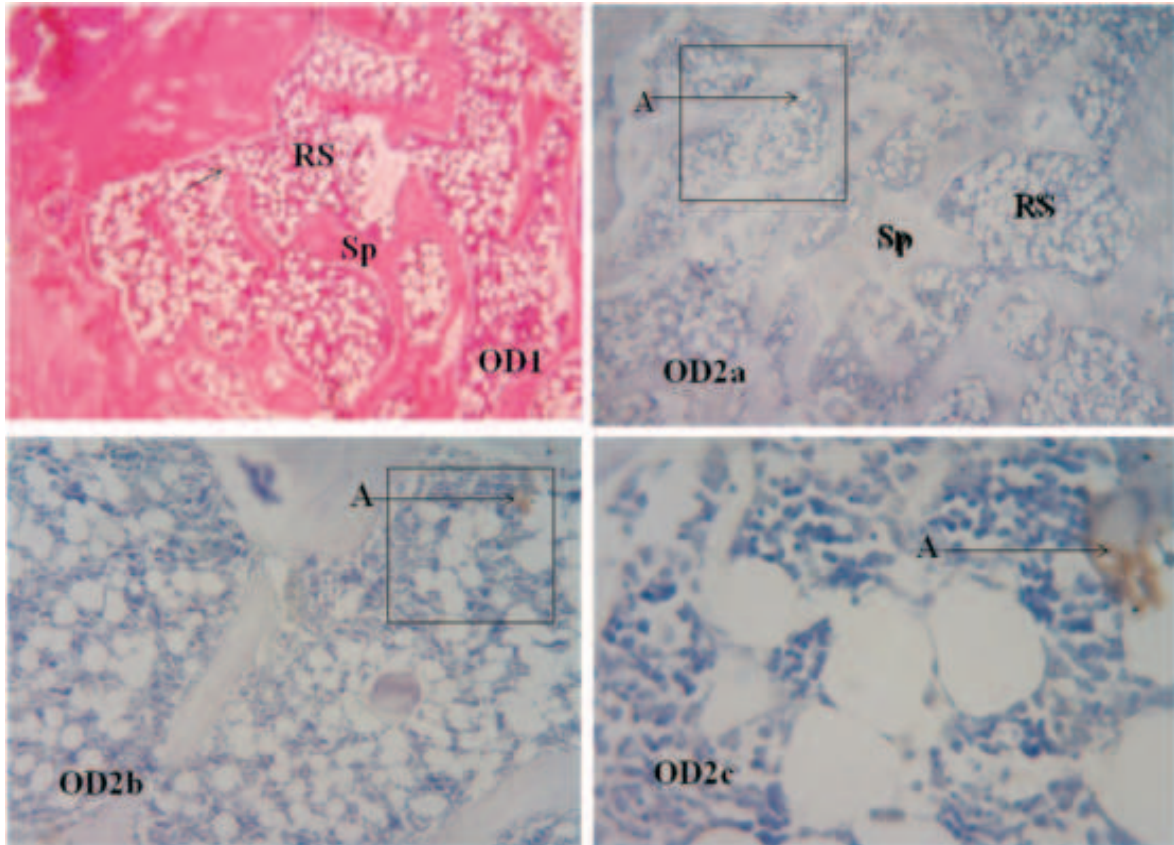
suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu menyebabkan rendahnya konsumsi Ca, dan ekskresi Ca feses rendah yang memberi gambaran meningkatnya hormon paratiroid. Pasch *et al.*, (2008) melaporkan bahwa diet rendah Ca menurunkan Ca darah, meningkatkan hormon paratiroid sebagai respons fisiologi untuk mempertahankan Ca dalam kisaran normal. Fitzpatrick dan Bilezikian (1999), dan Buckwalter *et al.*, (1996) melaporkan bahwa untuk mengendalikan homeostasis Ca, hormon paratiroid bekerja langsung pada tulang dengan memacu resorpsi tulang dan meningkatkan pembebasan Ca dari tulang. Pelebaran rongga sumsum tulang tikus O dan OD diduga akibat mempunyai hormon paratiroid tinggi.

Selain akibat meningkatnya hormon paratiroid, pelebaran rongga sumsum tulang



Gambar 3. Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus ovariohisterektomi tanpa suplementasi *calcitriol* (O1) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang normal dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (RS), jumlah spikulum trabekula menurun (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x).

Bagian metafisis tulang femur distalis tikus ovariohisterektomi tanpa suplementasi *calcitriol* diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (O2) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (A) (O2a=Streptavidin-biotin, 100x.; O2b= Streptavidin-biotin, 250x.; dan O2c = Streptavidin-biotin, 1000x.).



Gambar 4. Histopatologi metafisis tulang femur distalis tikus ovariohisterektomi yang diberi suplementasi *calcitriol* (OD1) terlihat pelebaran rongga sumsum tulang dan dominasi jaringan adiposit dalam rongga sumsum tulang (RS), jumlah spikulum trabekula menurun (Sp) (Hematoksilin-eosin, 100x.).

Bagian metafisis tulang femur distalis tikus ovariohisterektomi dan suplementasi *calcitriol* diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b) (OD2 terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang (A) (OD2a=Streptavidin-biotin, 100x.; OD2b=Streptavidin-biotin, 250x.; dan OD2c=Streptavidin-biotin, 1000x.).

tikus O dan OD juga diduga terkait dengan turunnya estrogen. Hartiningsih *et al.*, (2012) melaporkan bahwa dalam waktu 30 minggu pascaovariohisterektomi, tikus ovariohisterektomi mengekskresikan Ca dalam urin lebih tinggi yang memberi gambaran turunnya hormon estrogen. Beberapa peneliti melaporkan bahwa estrogen bekerja langsung pada ginjal untuk meningkatkan reabsorpsi Ca dalam tubulus ginjal (Van Abel *et al.*, 2002), turunnya estrogen meningkatkan ekskresi Ca melalui ginjal (Van Abel *et al.*, 2002; Hoenderop *et al.*, 1999). Hartiningsih *et al.*, (2012) juga melaporkan bahwa tikus ovariohisterektomi yang diberi suplementasi *calcitriol* selama 30 minggu mengekskresikan Ca dalam urin lebih rendah yang memberi gambaran meningkatnya hormon

paratiroid akibat turunnya hormon estrogen. Notelovitz (1997) melaporkan bahwa estrogen berperan sebagai penghambat aktivitas hormon paratiroid, turunnya estrogen berakibat pada meningkatnya aktivitas hormon paratiroid. Dick *et al.*, (2005), Mihai dan Fardon (2000), Fitzpatrick dan Bilezikian (1999) melaporkan bahwa untuk mempertahankan konsentrasi Ca darah dalam kisaran normal, hormon paratiroid sebagai sistem homeostasis bekerja pada ginjal untuk meningkatkan reabsorpsi Ca yang ditandai oleh turunnya ekskresi Ca melalui urin. Beberapa peneliti juga melaporkan bahwa defisiensi estrogen meningkatkan resorpsi tulang (Riggs *et al.*, 2002; Khosla *et al.*, 2002; Manolagas *et al.*, 2000) yang ditandai spikulum trabekula menjadi lebih tipis, jumlah trabekula

berkurang, hilangnya konektivitas antar trabekula (Weitzmann dan Pacifici, 2005; Parfitt *et al.*, 2000; Eriksen *et al.*, 1999; Doige, 1988), dan menyebabkan pelebaran rongga sumsum tulang (Palmer, 1993). Dari uraian tersebut di atas memberi gambaran bahwa pelebaran rongga sumsum tulang tikus O dan OD diduga terkait dengan turunnya estrogen.

Dalam penelitian ini, dominasi adiposit dalam rongga sumsum tulang akibat tingginya konversi sel stroma mesenkimal dalam sumsum tulang menjadi adiposit dari pada menjadi osteoblas memberi gambaran rendahnya osteoblas yang diduga terkait dengan rendahnya konsentrasi estrogen. Menurut Cooke dan Naaz (2004), Riggs *et al.*, (2002), bahwa estrogen berperan penting dalam mengendalikan osteoblas dan adiposit. Rosen *et al.*, (2009) dan Rozman *et al.*, (1989) melaporkan bahwa rongga sumsum tulang ditempati jaringan hemato-poietik, jaringan tulang dan jaringan adiposit secara bersama-sama. Muruganandan *et al.*, (2009), Pittenger *et al.*, (1999), Aubin dan Liu (1996) melaporkan bahwa osteoblas dan adiposit keduanya berasal dari prekursor sel stem mesenkimal sehingga adanya perubahan atau pergeseran laju diferensiasi, daya hidup atau eliminasi dari salah satu garis keturunan osteoblas atau adiposit akan memicu perubahan rasio antara osteoblas dengan adiposit. Syed *et al.*, (2008) dan Benayahu *et al.*, (2000) melaporkan bahwa defisiensi estrogen meningkatkan akumulasi adiposit, jumlah dan ukuran adiposit dalam sumsum tulang perempuan pascamenopause penderita osteoporosis maupun mencit ovariektomi.

Sedikitnya ekspresi TRACP5b dalam rongga sumsum tulang pada tikus O dan OD yang menunjukkan turunnya osteoklas diduga terkait dengan turunnya osteoblas akibat turunnya estrogen. Mizoguchi *et al.*, (2009), Teitelbaum dan Ross (2003), Yamada *et al.*, (2003), Khosla (2001), dan Suda *et al.*, (1999) melaporkan bahwa osteoblas berperan penting dalam pembentukan osteoklas melalui mekanisme yang melibatkan produksi *receptor activator nuclear factor- κ B ligand* (RANKL), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Menurut Cohen (2006), Pixley dan Stanley (2004), Lotze dan Hamilton (2003) *macrophage colony-stimulating factor* merupakan faktor esensial pada tahap awal osteoklastogenesis, berperan sebagai pemacu proliferasi awal prekursor osteoklas, daya bertahan hidup dan diferensiasi prekursor osteoklas.

SIMPULAN

Tulang femur distalis tikus ovariohisterektomi yang mengkonsumsi kasein dan atau kasein dengan suplementasi *calcitriol* 8 ng/hari selama 30 minggu menunjukkan ketidakseimbangan antara resorpsi tulang dengan pembentukan tulang yang ditandai dominasi resorpsi tulang.

SARAN

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang pemanfaatan suplementasi *calcitriol* yang dikombinasikan dengan estradiol pada tikus ovariohisterektomi yang diharapkan dapat terjadi keseimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang.

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 2007 yang telah memberi dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Monkkonen J, Vaananen HK. 2000. Rapid screening method for osteoclast differentiation *in vitro* that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46 : 1751-4.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. 2004. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291 : 1701-1712.
- Aubin JE, Liu F. 1996. The osteoblast lineage. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G, editors. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 51-68.
- Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S. 2000. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem* 79 : 407-415.

- Beresford SAA, Weiss NS, Voigt LF, McKnight B. 1997. Risk of endometrial cancer in relation to use of oestrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women. *Lancet* 349 : 458-461.
- Berkvist L, Persson I. 1996. Hormone replacement therapy and breast cancer : a review of current knowledge. *Drud Saf* 15 : 360-370.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. 1996. Bone biology, part II: formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *JBJS Instr Course Lect* 45 : 387–399.
- Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD. 2007. Insights into material and structural basis of bone strength and fragility from disease associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocr Rev* 28 : 151-164.
- Cohen MM Jr. 2006. The new bone bioogy: Pathologic, molecular, clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140 : 2646-2706.
- Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ. 1995. The use of estrogen and progestin and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 332 : 1589-1593.
- Cooke PS, Naaz A. 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* 229 : 1127–1135.
- Dick M, Dvine A, Beilby J, Prince RL. 2005. Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. *Am J Physiol Metab* 288 : E430-E435.
- Doige C. 1988. Skeletal system, *In Special Veterinary Pathology*, Thompson (ed). Toronto. BC. Decker Inc. Pp 467-483.
- Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. 1999. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 14 : 1217-1221.
- Fitzpatrick LA, Bilezikian JP. 1999. Parathyroid hormone: structure, function and dynamic actions. In: Seibel MJ, Robbins SP, Bilezikian JP, eds. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism* San Diego, Calif: Academic Press. Pp 187–202.
- Halleen JM, Raisanen SR, Salo J, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Vaananen HK. 1999a. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 274 : 22907–10
- Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15 : 1337–1345.
- Hartiningsih, Widiyono I, Anggraeni D. 2012. Homeostasis kalsium tikus panhisterektomi yang mengkonsumsi kalsitriol selama 30 minggu. Jogjakarta. Prosiding Seminar Nasional PPDH FKH-UGM. Hal 139-155.
- Hoenderop JG, Van der Kemp AW, Hartog A, Van de Graaf SF, Van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. 1999. Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia. *J Biol Chem* 274 : 8375–8378.
- Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M, van der Kemp AW, Van Os CH, Arnaud R, Bindels RJ. 2002. Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB J* 16 : 1398–1406.
- Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85 : 373-422.
- Holick MF. 2004. Vitamin D: Importance in the prevention of cancer, type I diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79 : 362-371.
- Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2 : 1132-1136.
- Janckila AJ, Takahasi K, Sun SZ, Yam LT. 2001. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 47 : 74–80.
- Khosla S. 2001. The OPG/RAKL/RANK system. *Endocrinology* 142 : 5050-5055.
- Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. 2002. Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 87 : 1443-1450.

- Ljusberg J, Ek-Rylander B, Andersson G. 1999. Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesised as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochem J* 343 : 63–69.
- Lotze MT, Hamilton JA. 2003. Macrophage colony stimulating factor (CSF-1). In *The cytokine handbook*. AW, Thomson AW, and Lotze MT, Editors. London. Elsevier Science Ltd. Pp 545–573.
- Manolagas SC. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21 : 115-137.
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. 2002. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57 : 385-409.
- Martin TJ, Sims NA. 2005. Osteoclast derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trend Mol Med* 11 : 76-81.
- Mihai R, Faradon JR. 2000. Parathyroid disease and calcium metabolism. *Britis Journal of Anaesthesia* 85 : 29-43.
- Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Aebi A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penniger JM, Ito M, Takahashi N. 2009. Identification of cell-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *JCB* 23 : 541-554.
- Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. 2009. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Journal Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (2) : 236-253.
- Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mog M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, and Takahashi N. 2003. Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144 : 5441-5449.
- Notelovitz M. 1997. Estrogen therapy and osteoporosis: principles & practice. *Am J Med Sci* 313(1) : 2-12.
- Palmer N. 1993. Bones and Joints. In *Pathology of domestic animals*. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Ed. Pp.1-181. San Diego. Academic Press Inc, Harcourt Brace Jovanovich Pub.
- Parfitt AM, Travers R, Rauch F, Glorieux FH. 2000 Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. *Bone* 27 : 487–494.
- Pasch A, Frey FJ, Eisenberger U, Mohaupt MG, Bonny O. 2008. PTH and 1.25 vitamin D response to a low-calcium diet is associated with bone mineral density in renal stone formers. *NDT* 23(8) : 2563-2570.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman, MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Science* 284 : 143-147.
- Pixley FJ, Stanley ER. 2004. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14 : 628-638.
- Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Vaananen HK, Harkonen P. 1998. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 22 : 201–209.
- Rae MH, Mole PA, Paterson CR. 1991. Endogenous factors affecting bone mineral content in post-menopausal women. *Maturitas* 13 : 319–324.
- Reinholt FP, Widholm SM, Ek-Rylander B, Andersson G. 1990. Ultrastructural localisation of tartrate-resistant acid ATPase in bone. *J Bone Miner Res* 5 : 1055–61.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrinol Rev* 23 : 279-302.
- Rodan GA, Martin TJ. 2000. Therapeutic approaches to bone disease. *Science* 289 : 1508-1514.
- Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. 2009. Marrow fat and the bone microenvironment: Developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19(2) : 109-124.

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick M, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. 2002. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288 : 321-333.
- Rozman C, Feliu E, Berga L, Reverter JC, Climent C, Ferran MJ. 1989. Age-related variations on fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: a stereological study. *Exp Hematol* 17 : 34-37.
- Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E. 2000. Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 15 : 235-244.
- Slemenda C, Longcope C, Peacock M, Hui S, Johnston CC. 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 DC, Black DM, Sklarin P, Ensrud KE, Cumming SR. 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.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrinol Rev* 20 : 345-357.
- Syed FA, Oursler MJ, Hefferan TE, Peterson JM, Riggs BL, Khosla S. 2008. Effects of Estrogen Therapy on Bone Marrow Adipocytes in Postmenopausal Osteoporotic Women. *Osteoporos Int* 19(9) : 1323-1330.
- Teitelbaum SL, Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4 : 638-649.
- Teitelbaum SL. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289 : 1504-1508.
- Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 : 377-381.
- Van Abel M, Hoenderop JGJ, Dardenne O, St Arnaud R., Van Os CH, Van Leeuwen HJPTM, Bindels RJM. 2002. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of EcaC1 in the kidney. *J Am Nephrol* 13 : 2102-2109.
- 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.
- Wanfort HB, Flecknell PA. 1992. Specific surgical operations. In : *Experimental and Surgical Technique in the Rat* (2nd ed.). New York: Academic Press. Pp 203-312.
- Weitzmann MN, Pacifici R. 2005. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 208 : 154-168.
- Wood RJ, Fleets JC, Cashman K, Bruns ME, Deluca HF. 1998. Intestinal calcium Absorption in the Aged rats : Evidence of Intestinal resistance to 1,25(OH)₂ Vitamin D. *Endocrinology* 39(9) : 3843-3848
- Wood RJ. 2000. Searching for determinants of intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 72 : 675-676.
- Yamada T, Yamazaki H, Yamane T, Yoshino M, Okuyama H, Tsuneto M, Kurino T, Hayashi Shin-Ichi, Sakano S. 2002. Regulation of osteoclast development by notch signaling directed to osteoclast precursors and through stroma cells. *Blood* 101 (6) : 2227-2234.
- Zhou YS, Liu YS, Tan JG. 2006. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin Med J (Engl)* 119 : 1278-1286.