

Pengaruh Panhisterektomi dan Konsumsi Suplemen 1,25-Dihidroksivitamin D₃ Selama 1,5 Bulan terhadap Retensi Kalsium pada Tikus *Wistar*

(THE EFFECT OF PANHISTERECTOMY AND THE CONSUMPTION OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ SUPPLEMENT FOR 1.5 MONTHS ON CALCIUM RETENTION IN WISTAR RATS)

Hartiningsih¹, Devita Anggraini¹, Irkham Widiyono²

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

ABSTRACT

The objective of the research was to study the effect of panhisterectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement consumption for 1.5 months on Ca retention of *Wistar* rats fed with casein. Twenty female of *Wistar* rats, 8 weeks of age were randomly divided into four groups (normal group N and NK, panhisterectomized group H and HK) in which group consisted of 5 rats. Group N and H rats were fed with a standard diet, while group NK and HK rats were fed with a standard diet+1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement. At 19 weeks of age, they were placed into individual metabolic cages for balance studies. From day 7 to 11 of the balance studies, daily unconsumed food, urine, and feces were collected and recorded for Ca analyses. The research results showed that Ca consumption and fecal Ca excretion were significantly higher ($P < 0.05$) in panhisterectomized rats consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement, as compared with the normal rats consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement. Urinary Ca excretion and Ca retention in panhisterectomized rats were not significantly different those of normal rats. While Ca consumption and fecal Ca excretion were significantly reduced ($P < 0.05$) in normal rats consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement but urinary Ca excretion and Ca retention in normal rats consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement were not significantly different compare with normal rats not consuming 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement. It is evident that panhisterectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplement did not affect the calcium retention.

Key words : panhisterectomized, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, Ca retention Tongku Nizwan Siregar¹, Teuku Armansyah², Arman Sayuti³ dan Syafruddin³

PENDAHULUAN

Kalsium (Ca) adalah salah satu kation dalam tubuh hewan mau pun manusia yang sangat esensial untuk berbagai fungsi fisiologi seperti eksitasi saraf, kontraksi otot jantung, pembekuan darah, dan mineralisasi tulang. Untuk berlangsungnya proses fisiologi tersebut Ca darah dipertahankan dalam kisaran normal melalui aksi absorpsi Ca intestinal, pertukaran Ca dari tulang, dan reabsorpsi Ca dalam ginjal (Hoenderop *et al.*, 2005). Defisiensi Ca akibat rendahnya absorpsi Ca oleh usus dan tingginya ekskresi Ca melalui ginjal karena menurunnya fungsi organ sehubungan dengan semakin bertambahnya umur, dan defisiensi hormon reproduksi terutama hormon estrogen dapat

menjadi penyebab meningkatnya absorpsi Ca tulang. Suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ selain berfungsi untuk mempertahankan konsentrasi Ca darah agar tetap berada dalam kisaran normal, juga berfungsi dalam proses mineralisasi tulang rangka (Jones *et al.*, 1998). Pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus ovariektomi dapat meningkatkan absorpsi Ca intestinal (O'Loughlin and Morris, 1998), pada mencit negatif 1 α -hidroksilase menstimulasi media transportasi Ca transeluler, meningkatkan absorpsi Ca dan normalisasi Ca serum (Armbrecht *et al.*, 1999; van Abel *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003). Namun kemampuan 1,25-dihidroksivitamin D₃ untuk memacu absorpsi Ca juga menurun seiring bertambahnya umur (Armbrecht *et al.*, 1980;

Horst *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1998). Menurut Hartiningsih *et al.*, (2004) lebih tingginya absorpsi Ca yang ditandai lebih rendahnya ekskresi Ca dalam feses menjadi faktor penentu lebih tingginya retensi Ca. Sementara O'Loughlin dan Morris (1994) melaporkan adanya keterkaitan antara retensi Ca dengan pengendapan mineral Ca dalam tulang.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji pengaruh suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ yang diberikan selama 1,5 bulan terus menerus terhadap retensi Ca (konsumsi Ca, ekskresi Ca dalam feses dan urin) tikus yang mengkonsumsi kasein. Dengan demikian selain diharapkan bermanfaat untuk mencegah demineralisasi Ca tulang pada individu pascapanhisterektomi (menopause), juga dapat diperoleh informasi tentang pemanfaatan 1,25-dihidroksivitamin D₃ yang aman, tanpa ada komplikasi pada bagian tubuh seperti ginjal apabila dikonsumsi dalam waktu yang lama.

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini digunakan 10 tikus *Wistar* betina dewasa normal dan 10 tikus *Wistar* dewasa panhisterektomi. Pakan yang diberikan pada tikus percobaan selama penelitian berupa pakan standar (mempunyai kandungan protein 20%, Ca 0,6% dan P 0,4% atau dengan rasio Ca:P=1,5:1). Komposisi pakan (% atau gram/100 gram pakan) berasal dari 75% tepung jagung, 15% tepung kasein, 1,0% CaCO₃ dan 0,7% CaH₂PO₄, 1,0% molase, 0,7% minyak sayur, 0,5% vitamin dan mineral. Setiap tikus ditempatkan dalam kandang individu dengan suhu ruang berkisar 21-23°C, diberi pakan standar dan air minum aquabidestilata secara *ad libitum*. Pada waktu tikus berumur 8 minggu, secara acak dibagi 4 kelompok (normal N dan NK, panhisterektomi H dan HK) masing-masing 5 tikus. Tikus normal N dan panhisterektomi H diberi pakan standar, tikus normal NK dan panhisterektomi HK diberi pakan standar+suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ (kalsitriol) 8 µgram/hari per oral. Pada umur 13 minggu tikus kelompok normal N dan NK dioperasi semua, tikus kelompok H dan HK dipanhisterektomi. Studi balan untuk mengetahui konsumsi, retensi, dan ekskresi Ca, dilakukan pada waktu tikus 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 O-kresophthalein-komplekson (Ray Sarker dan Chaunan, 1967), sedang P organik diperiksa dengan metoda molibdat-vanadat (Kruse-Jarres, 1979). Pemeriksaan Ca dalam feses dilakukan dengan metoda yang sama, setelah pakan dan feses ditentukan kadar airnya, diabukan pada suhu 600°C sesuai dengan metoda yang diterangkan oleh Harris (1970). 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 sesuai dengan metoda Harris (1970). Data yang diperoleh dianalisis dengan uji faktorial dan dilanjutkan dengan uji-t.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tikus panhisterektomi mempunyai estrogen yang tidak berbeda signifikan dengan tikus normal, konsumsi Ca juga tidak berbeda signifikan dengan tikus normal meskipun lebih tinggi, namun ekskresi Ca dalam feses lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan (P<0,01) dengan tikus normal (Tabel 1). Berbeda dengan laporan Goodrow *et al.*, (2005) bahwa dalam waktu 24 jam pascapanhisterektomi estrogen tikus panhisterektomi lebih rendah dibanding tikus normal. Selain itu, menurut Liang *et al.*, (2002) dalam waktu 3 minggu pasca ovariektomi, tikus *Wistar* mengkonsumsi pakan 12% lebih tinggi dibanding tikus normal, dan menurut beberapa peneliti, ovariektomi pada tikus menurunkan absorpsi Ca intestinal (Watanabe *et al.*, 2001; Kalu *et al.*, 1999; O'Loughlin and Morris, 2003), dan meningkatkan ekskresi Ca dalam feses (Irwanto, 2005; Ismaryanto, 2006). Dengan uji-t, tikus panhisterektomi HK selain mengkonsumsi Ca lebih tinggi dan berbeda signifikan (P<0,05) dengan tikus normal NK, juga mengekskresikan Ca dalam feses lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan (P<0,01) dengan tikus normal NK. Sementara konsumsi

Tabel 1. Rata-rata konsumsi Ca (g/hari), Ca urin (mg/hari), Ca feses (mg/hari), retensi Ca (mg/hari), estrogen darah (pg/ml) tikus *Wistar* yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ dalam waktu 1,5 bulan pasca panhisterektomi

kelompok	estrogen	Konsumsi Ca	Ca feses	Ca urin	Retensi Ca
panhisterektomi	14,89±1,43	57,49±7,85	38,98±4,84	1,74±1,45	20,81±10,68
normal	14,81±0,62	48,92±7,43	32,71±4,79	1,23±1,00	13,73±6,07
signifikansi	ns	ns	**	ns	ns
vitamin D+	14,88±1,20	49,16±6,22	33,28±6,08	3,23±1,48	14,38±4,49
vitamin D -	14,82±1,00	57,25±9,09	38,40±4,09	2,70±1,49	20,15±11,84
signifikansi	ns	*	*	ns	ns

Keterangan : ns = tidak signifikan * berbeda signifikan (P<0,05); ** berbeda sangat signifikan (P<0,01)

Tabel 2. Rata-rata konsumsi Ca (g/hari), Ca urin (mg/hari), Ca feses (mg/hari), retensi Ca (mg/hari), estrogen darah (pg/ml) tikus *Wistar* yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ dalam waktu 1,5 bulan pasca panhisterektomi

parameter	panhisH	normalN	panhis+	normal+	Signifikansi			
			kalsitriol HK	kalsitriol NK	HN	HKNK	HHK	NNK
KonsumsiCa	61,54±9,54	52,95±7,03	53,44±2,69	44,89±5,85	ns	*	ns	*
Ca feses	40,22±4,74	36,58±2,61	37,74±5,12	28,84±2,72	ns	**	ns	**
% Ca feses	66,48±6,56	70,08±6,34	70,22±4,69	64,21±2,95	ns	ns	ns	ns
Ca urin	2,47±1,71	2,94±1,38	0,94±0,57	2,04±1,19	ns	ns	ns	ns
Retensi Ca	26,86±11,8	13,44±7,98	14,76±5,10	14,01±4,35	ns	ns	ns	ns
estrogen	14,48±0,28	15,15±0,7	15,29±1,65	14,50±1,22	ns	ns	ns	ns

Keterangan :

Panhis = panhisterektomi; % Ca feses = (Ca feses : konsumsi Ca)x100%

ns = tidak signifikan * berbeda signifikan (P<0,05); ** berbeda sangat signifikan (P<0,01)

N = tikus normal yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃

H = tikus panhisterektomi yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃

NK = tikus normal yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃

HK = tikus panhisterektomi yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃

Ca dan ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi H tidak berbeda signifikan dengan tikus normal N (Tabel 2). Uraian tersebut menggambarkan bahwa pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus panhisterektomi selain menyebabkan lebih tingginya konsumsi Ca, juga menyebabkan lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses. Konsumsi Ca tikus panhisterektomi HK yang lebih tinggi dan berbeda signifikan dengan tikus normal NK kemungkinan menjadi penyebab lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses. Penelitian yang dilakukan Song *et al.*, (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±2,8%) dibanding mencit yang mengkonsumsi Ca 0,5% (17,3 ± 2,0%), dan mencit yang mengkonsumsi pakan mengandung Ca tinggi 2% menurunkan absorpsi Ca intestinal sebanyak 75% (4,4 ± 0,5%) dibanding mencit yang mengkonsumsi Ca 0,5% (17,3±2,0%). Armbrecht *et al.*, (1999) juga melaporkan bahwa injeksi 1,25-dihidroksivitamin D₃ menstimulasi transpot Ca transeluler intestinal tikus muda tiga kali lebih tinggi dibanding tikus dewasa. Dalam penelitian ini pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus normal (analog dengan tikus muda) meningkatkan absorpsi Ca intestinal yang ditandai lebih rendahnya ekskresi Ca dalam feses tikus normal NK, sementara pemberian suplemen 1,25-

dihidroksivitamin D₃ pada tikus panhisterektomi (analog dengan tikus tua) tidak meningkatkan absorpsi Ca intestinal yang ditandai dengan tidak berbedanya ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi HK dibanding tikus panhisterektomi H. Dalam penelitian ini, ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi yang lebih tinggi tidak diikuti peningkatan ekskresi Ca melalui urin (Tabel 1). Hasil penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan O'Loughlin dan Morris (1998) bahwa ovariektomi pada tikus *Sprague Dawley* umur 7 bulan (10 minggu pascaovariektomi) meningkatkan ekskresi Ca dalam urin. Hal yang sama dilaporkan Morris *et al.*, (1995); O'Loughlin dan Morris (2003); dan Draper *et al.*, (1999) bahwa Ca yang diekskresikan dalam urin tikus dewasa oophorektomi yang diberi pakan kasein meningkat signifikan dibanding tikus normal. Dalam penelitian ini, konsumsi Ca tikus panhisterektomi yang lebih tinggi dan diikuti ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi yang lebih tinggi dibanding tikus normal (Tabel 1) dengan demikian tidak menyebabkan peningkatan Ca darah, kemungkinan menjadi penyebab tidak terjadinya peningkatan ekskresi Ca dalam urin tikus panhisterektomi. Dilaporkan Sairanen *et al.*, (2000) bahwa lebih tingginya absorpsi Ca intestinal individu yang mendapat suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ memicu peningkatan Ca plasma dan Ca urin.

Tikus yang diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ mempunyai estrogen yang tidak berbeda dengan tikus yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃, namun konsumsi Ca dan ekskresi Ca dalam feses lebih rendah dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan tikus yang tidak diberi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ (Tabel 1). Dengan uji-t, konsumsi Ca tikus normal NK lebih rendah dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan tikus normal N, sementara ekskresi Ca dalam feses lebih rendah dan berbeda sangat signifikan ($P < 0,01$), dengan demikian menunjukkan lebih tingginya absorpsi Ca intestinal tikus normal NK. Hal yang sama terjadi pada tikus panhisterektomi HK dibanding dengan tikus panhisterektomi H meskipun tidak berbeda signifikan (Tabel 2). Menurut Scholz-Ahrens *et al.*, (2007) nilai absorpsi Ca intestinal adalah selisih dari jumlah Ca yang dikonsumsi dengan jumlah Ca yang diekskresikan dalam feses. Uraian tersebut di atas menggambarkan bahwa pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus

normal menyebabkan lebih tingginya absorpsi Ca intestinal yang ditandai lebih rendahnya ekskresi Ca dalam feses dan menyebabkan lebih rendahnya konsumsi Ca. Song *et al.*, (2003) juga melaporkan bahwa absorpsi Ca intestinal terkait dengan perubahan kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃ dalam plasma, semakin tinggi kadar 1,25-dihidroksivitamin D₃ semakin rendah konsumsi Ca dan semakin tinggi absorpsi Ca, dan sebaliknya. Beberapa peneliti lain juga melaporkan bahwa suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan absorpsi Ca intestinal yang ditandai oleh meningkatnya media transpot Ca transeuler (Hoenderop *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2003; Bronner, 2003; Slepchenko and Bronner; 2001; Kip and Strehler, 2004). Menurut Sairanen *et al.*, (2000) lebih tingginya Ca yang diabsorpsi usus individu yang mendapat suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ memicu peningkatan Ca plasma dan urin. Dalam penelitian ini, konsumsi Ca dan ekskresi Ca dalam feses tikus normal NK yang lebih rendah dan diikuti ekskresi Ca dalam urin tikus normal NK yang tidak berbeda dengan tikus normal N (Tabel 2) menunjukkan terjadinya kompensasi tubuh dalam mengendalikan Ca darah agar tetap dalam kisaran normal akibat pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ menyebabkan peningkatan absorpsi Ca intestinal. Menurut Van Cromphaut *et al.*, (2001) dan van de Graaf *et al.* (2004) pemberian 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan absorpsi Ca intestinal, sementara menurut Hoenderop *et al.*, (2001) dan Hoenderop *et al.*, (2002) 1,25-dihidroksivitamin D₃ menurunkan ekskresi Ca urin dengan meningkatkan reabsorpsi Ca oleh ginjal.

Lebih tingginya konsumsi Ca tikus panhisterektomi yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ dan diikuti lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses dibanding tikus normal yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃, dan lebih rendahnya konsumsi Ca tikus normal yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ yang juga diikuti oleh lebih rendahnya ekskresi Ca dalam feses dibanding tikus normal yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ nampaknya menjadi penyebab tidak berbedanya retensi Ca tikus panhisterektomi dengan tikus normal maupun tikus yang mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ dengan yang tidak mengkonsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa panhisterektomi dan konsumsi suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ selama 1,5 bulan tidak berpengaruh terhadap retensi Ca tikus *Wistar*.

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 HJ, Boltz MA, Kumar VB. 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.
- Armbrecht HJ, Zenser TV, Davis BB. 1980. Effect of age on the conversion of 25-hydroxyvitamin D₃ to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by kidney of rat. *J Clin Invest* 66:1118-1123.
- Bronner F. 2003. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J Cell Biochem* 88: 387-393.
- Bikle DD, Munson S, Zolock DT. 1983. Calcium flux across chick duodenal brush border membrane vesicles: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 113:2072-2080.
- Draper CR, Dick DI, Prince RL. 1999. The effect of estrogen deficiency on calcium balance in mature rats. *Calcif Tissue Int* 64:325-328.
- Fontaine O, Matsumoto T, Goodman DB, Rasmussen H. 1981. Liponomic control of Ca²⁺ transport: relationship to mechanism of action of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1751-1754.
- Fullmer CS, Chandra S, Smith CA, Morrison GH, Wasserman RH. 1996. Ion microscopic imaging of calcium during 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated intestinal absorption. *Histochem Cell Biol* 106:215-222.
- Goodrow GJ, Vitullo, Lisa, and Cipolla MJ. 2005. Effect of estrogen therapy on cerebral arteries during stroke in female rats. The north American Menopause Societ. Lippincott Williams and Wilkins.
- Harris LE. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals, Vol. 1. Animal Science Dept. Utah State Univ., Logan, Utah.
- Hartiningsih, Widiyono I, Anggraeni D. 2004. Respon tulang dan ginjal tikus penderita osteopati terhadap konsumsi ikan teri tawar atau kedelai : studi penanggulangan osteodistrofia fibrosa. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada.
- 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. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373-422.
- Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. 1990. Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology* 126:1053-1057.
- Irwanto A. 2005. Retensi kalsium pada tikus *Sprague Dawley* 8 minggu pasca panhisterektomi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- Ismaryanto A. 2006. Metabolisme Ca pada tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang diberi pakan kedelai dengan imbalanced Ca:P=3:1. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.
- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78:1193-1231.
- Kalu DN, Orchii PB. 1999. Calcium absorption and bone loss in ovariectomized rats fed varying level dietary calcium, *Calcif. Tissue Int.* 65:73-77.

- Kip SN, Strehler EE. 2004. Vitamin D₃ upregulates plasma membrane Ca²⁺-ATPase expression and potentiates apico-basal Ca²⁺ flux in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F363–F369.
- Kruse-Jarres JD. 1979. Klinische chemie, band II, Spezielle Klinisch-chemische analytic. Stuttgart. Gustav Fischer Verlag.
- Liang YQ, 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 α is involved in the anorectic action of estrogen. *International Journal of Obesity* 26:1103-1198.
- Miller A, Bronner F. 1981. Calcium uptake in isolated brush-border vesicles from rat small intestine. *Biochem J* 196:391–401.
- Morris HA, O'Loughlin PD, Mason RA, Schulz SR. 1995. The effect of oophorectomy on calcium homeostasis. *Bone* 17:189S-174S.
- O'Loughlin PD, Morris HA. 2003. Oophorectomy acutely increases calcium excretion in adult rats. *J Nutr* 133:2277-2280.
- O'Loughlin PD, Morris HA. 1998. Estrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in rat. *J Physiology* 511:313-322.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediated intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274:22739–22746.
- Rasmussen H, Fontaine O, Max E, Goodman DP. 1979. The effect of 1-hydroxyvitamin D₂ administration on calcium transport in chick intestine brush border membrane vesicles. *J Biol Chem* 254:2993–2999.
- Ray Sarker BC, Chaunan UPS. 1967. A new methode for determining microquantities of calcium in biological material. *Anal Biochem* 20, 155.
- Sairanen S, Karkkainen M, Tahtel R, Laitinen K, Makela P, Lamberg-Allardt C, Valimaki MJ. 2000. Bone mass and markers of bone and calcium metabolism in postmenopausal women treated with 1,25-dihydroxyvitamin D (Calcitriol) for four years. *Calcif Tissue Int* 67:122–127.
- Song Y, Kato S, Fleet JC. 2003. Vitamin D Receptor (VDR) Knockout Mice Reveal VDR-Independent Regulation of Intestinal Calcium Absorption and ECaC2 and Calbindin D_{9k} mRNA. *J Nutr*. 133:374-380.
- Slepchenko BM, Bronner F. 2001. Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry. *Am J Physiol* 281:C270–C281
- 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.
- Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, 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 SF, Boullart I, Hoenderop JG, Bindels RJ. 2004. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 by 1 alpha,25 dihydroxy vitamin D₃ and dietary Ca²⁺. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:303-308.
- Van den Heuvel EG, Schoterman MH, Muijs T. 2000. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J Nutr* 130:2938-2942.
- Wasserman RH, Brindak ME, Meyer SA, Fullmer CS. 1982. Evidence for multiple effects of vitamin D₃ on calcium absorption: response of rachitic chicks, with or without partial vitamin D₃ repletion to 1, 25 dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci US* 79:7939–7943.
- 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 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