

EFEKTIVITAS DIET TERI TAWAR DAN SUPLEMENTASI KALSITRIOL UNTUK MENCEGAH OSTEOPOROSIS PADA TIKUS OVARIIEKTOMI

The Effectiveness of Fresh Anchovies Diet and Calcitriol Supplementation to Prevent Osteoporosis in Ovariectomized Rats

Hartiningsih¹, Devita Anggraeni¹, dan Sudarminto¹

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

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji efektivitas diet teri tawar dan suplementasi *calcitriol* selama 6 minggu untuk mencegah osteoporosis pada tikus ovariektomi. Lima belas tikus *Wistar* umur 8 minggu, dibagi atas 3 kelompok secara acak (normal/K, ovariektomi/Ov, dan ovariektomi+kalsitriol/OvD) masing-masing 5 tikus. Tikus kelompok K dan Ov diberi diet teri tawar, sedangkan tikus kelompok OvD diberi diet teri tawar+kalsitriol. Pada umur 15 minggu, semua tikus dietanasi, tulang femur kiri diambil untuk pemeriksaan imunohistokimia *tartrate resistant acid phosphatase5b* (TRAP5b). Deteksi TRAP5b menggunakan antibodi monoklonal anti-TRAP5b, dan dideteksi menggunakan streptavidin-biotin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tulang femur distalis bagian metafisis tikus kelompok K, Ov dan OvD terlihat TRAP5b positif berwarna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang dan permukaan spikulum trabekula, namun pada tikus K dan Ov mempunyai luas rongga sumsum tulang dan spikulum trabekula normal, sedangkan pada tikus OvD terlihat pelebaran rongga sumsum tulang, akumulasi adiposit dalam rongga sumsum tulang, dan lebih pendeknya spikulum trabekula. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa diet teri tawar dan suplementasi kalsitriol selama 6 minggu tidak efektif untuk mencegah osteoporosis tikus ovariektomi.

Kata kunci: kalsitriol, tulang femur, ovariohisterektomi

ABSTRACT

This study was conducted to assess the effectiveness of a diet contained fresh anchovies and calcitriol supplementation for 6 weeks to prevent osteoporosis in ovariectomized rats. Fifteen Wistar rats aged 8 weeks were divided randomly into 3 groups (normal/K, ovariectomized/Ov, and ovariectomized + calcitriol/OVD), 5 mice each. Group K and Ov rats were fed with fresh anchovies, while the OVD group was fed with fresh anchovies + calcitriol. At the age of 15 weeks, all mice were done for euthanasia, then left femur was collected for immunohistochemistry examination of tartrate resistant acid phosphatase5b (TRAP5b). The detection of (TRAP5b) was conducted using a monoclonal antibody anti TRAP5b, and detected using a streptavidin-biotin. The results showed that the metaphysis part of distal femur bone of mice group K, Ov, and OVD were positive TRAP5b stained with brown color on trabecular bone in bone marrow cavity and trabecular spiculum surface, but rats in group K and Ov had extensive bone marrow cavity and normal trabecular spiculum, whereas OVD group showed bone marrow cavity dilation, accumulation of adipocytes in the bone marrow cavity, and shorter the spiculum of trabeculae. It can be concluded that fresh anchovies diet and calcitriol supplementation for 6 weeks are not effective in preventing osteoporosis in ovariectomized rats.

Key words: calcitriol, femur, ovariohisterectomy

PENDAHULUAN

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit degeneratif tulang akibat tidak seimbangnya antara resorpsi tulang dibandingkan dengan pembentukan tulang. Resorpsi tulang oleh osteoklas lebih tinggi atau terjadi penurunan pembentukan tulang oleh osteoblas (Chavassieux *et al.*, 2007; Martin dan Seeman, 2007; Manolagas, 2000). 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).

Konsentrasi estrogen tikus menurun dalam waktu tujuh hari pasca-ovariohisterektomi (Van Abel *et al.*, 2002), sedangkan Goodrow *et al.* (2005) melaporkan bahwa dalam 24 jam pasca-ovariohisterektomi, konsentrasi estrogen dalam darah lebih rendah dibanding tikus normal. Selain bekerja langsung pada tulang,

estrogen juga bekerja secara tidak langsung melalui aktivasi ginjal untuk mengonversi vitamin D tidak aktif menjadi vitamin D aktif (Notelovitz, 1997). Penurunan kadar estrogen pada individu pascamenopause karena faktor alami maupun karena faktor artifisial akibat pembedahan sebagai pemicu meningkatnya resorpsi tulang (Riggs *et al.*, 2002; Khosla *et al.*, 2002), turunnya densitas tulang (Harvey *et al.*, 2006; Slemenda *et al.*, 1996), dan fraktur osteoporotik (Doherty *et al.*, 2001).

Pemberian suplemen 1,25-dihidroksivitamin D₃ meningkatkan 1,25-dihidroksivitamin D₃ plasma (Vieth *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 1998), memicu pembentukan tulang dan meningkatkan densitas tulang dengan mempromotori sintesis osteokalsin oleh osteoblas dan proses mineralisasi matriks tulang (Hendy *et al.*, 2006). Peneliti lain melaporkan bahwa suplementasi 1,25-dihidroksivitamin D₃ pada tikus mengaktifasi osteoklas untuk meresorpsi tulang melalui media osteoblas (McSheehy dan Chambers, 1987). Keberhasilan penanganan osteoporosis ditandai dengan turunnya jumlah dan aktivitas osteoklas meresorpsi tulang (McClung, 1996; Vedi dan Compston, 1996).

Selama proses diferensiasi dan resorpsi tulang, osteoklas secara progresif mengekspresikan penanda *tartrate-resistant acid phosphatase 5b* (TRAP5b) (Halleen dan Ranta, 2001; Janckila *et al.*, 2001; Vaananen *et al.*, 2000; Alatalo *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2000), suatu enzim protease yang diekspresikan dalam konsentrasi tinggi oleh lisosom prekursor osteoklas dan osteoklas dewasa (Takahashi *et al.*, 1994). *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b* digunakan untuk memonitor aktivitas osteoklas selama terapi berbagai penyakit metabolisme tulang seperti osteoporosis (Alatalo *et al.*, 2004; Halleen *et al.*, 2002). Untuk memonitor efektivitas suplementasi kalsitriol sebagai antiresorptif tulang dalam mencegah osteoporosis tikus ovariektomi, dalam penelitian ini digunakan parameter aktivitas osteoklas melalui petanda TRAP5b pada bagian metafisis tulang femur distalis.

MATERI DAN METODE

Lima belas tikus *Wistar* betina umur 8 minggu dan diet teri tawar dengan komposisi protein 24%, Ca 0,6%, P 0,4% digunakan dalam penelitian ini. Komposisi bahan diet teri tawar (g/100 g pakan) yang diberikan terdiri atas 78% jagung; 20% teri tawar; 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/K sebagai kontrol, ovariektomi/Ov, dan ovariektomi + suplementasi kalsitriol/OvD) masing-masing 5 tikus. Suplementasi kalsitriol (1,25-dihidroksivitamin D₃) diberikan secara oral sebanyak 8 ng/hari/tikus.

Seminggu pasca-adaptasi 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 anestesi, digunakan campuran ketamin 10% dosis 50 mg/kg bobot badan dan xylazine 2% dosis 5 mg/kg bobot badan yang diinjeksikan intramuskular. Hal yang sama dilakukan pada tikus kontrol meskipun tidak dilakukan pengambilan ovarium (operasi semu). Satu hari pasca-operasi, semua tikus diberi perlakuan selama 6 minggu.

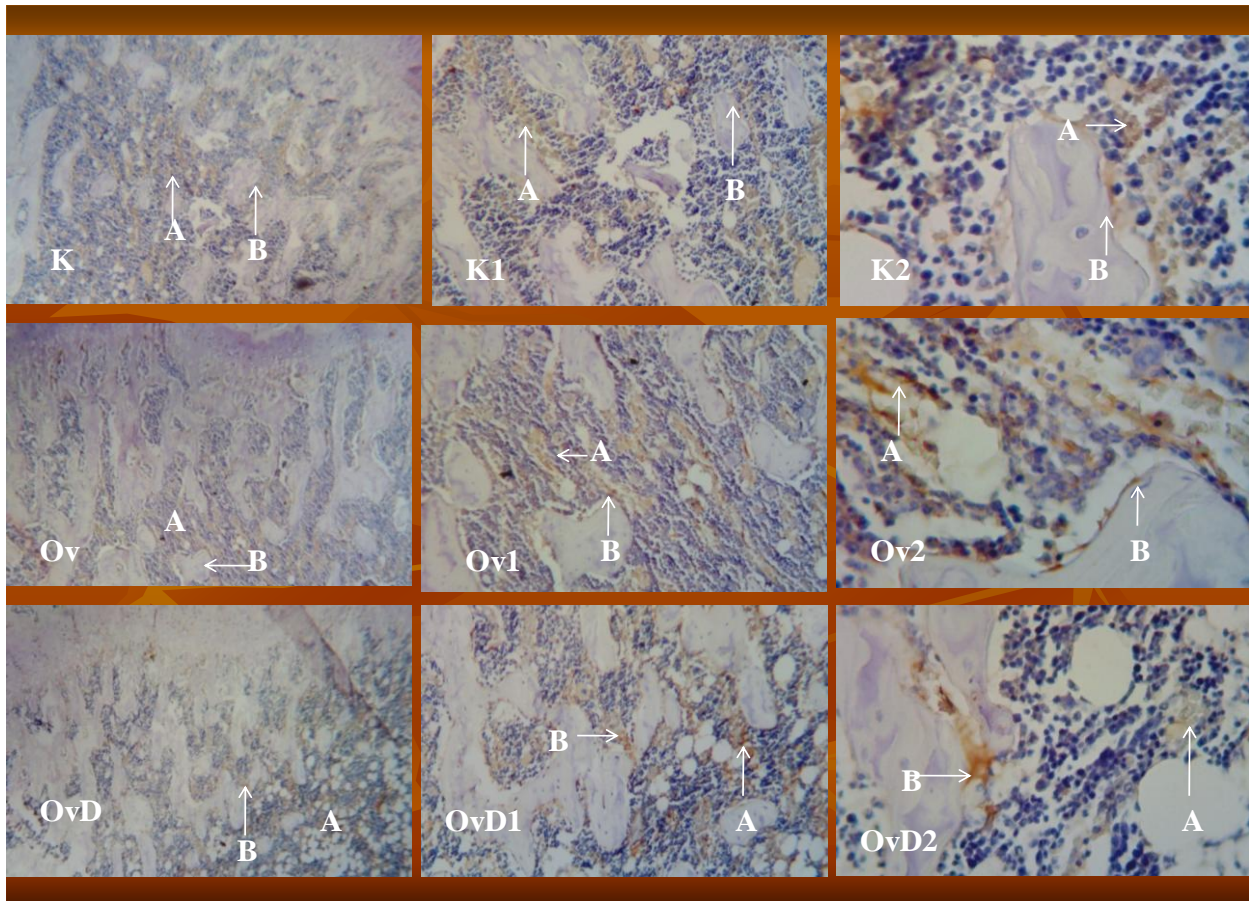
Pada akhir perlakuan, 6 minggu pasca-ovariektomi tikus dieutanasia, tulang femur kiri diambil untuk pemeriksaan imunohistokimia *tartrate resistant acid phosphatase5b* (TRAP5b) menggunakan antibodi monoklonal anti-TRAP5b dan dideteksi menggunakan streptavidin-biotin. Hasil pemeriksaan imunohistokimia bagian metafisis tulang femur dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran imunohistokimia dengan antibodi monoklonal anti-TRAP5b pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang dan permukaan spikulum trabekula bagian metafisis tulang femur distalis tikus K (Gambar 1) terlihat TRAP5b positif warna coklat yang

menunjukkan ada aktivitas osteoklas dalam proses remodeling tulang. Menurut Notelovitz (1997) remodeling tulang dimulai dari aktivasi, stimulasi, diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas dewasa yang aktif meresorpsi tulang. Selama proses diferensiasi dan resorpsi tulang, osteoklas secara progresif mengekspresikan penanda TRAP5b (Alatalo *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2000; Vaananen *et al.*, 2000; Halleen dan Ranta, 2001; Janckila *et al.*, 2001). Ljusberg *et al.* (1999) dan Minkin (1982) 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.* (1999) peran intraseluler TRAP5b selama resorpsi tulang ditunjukkan dari keberadaannya dan aktivitasnya di dalam vesikel transitotik. Pada penelitian ini, bagian metafisis tulang femur distalis tikus K (K, K1, dan K2) dan tikus Ov (Ov, Ov1, dan Ov2) juga mempunyai bentuk spikulum trabekula tulang dan luas rongga sumsum tulang terlihat normal. Shiraishi *et al.* (2000) melaporkan bahwa spikulum trabekula merupakan petanda rekrutmen, diferensiasi osteoblas, dan pembentukan tulang oleh osteoblas. Gambaran tersebut menunjukkan proses remodeling tulang tikus kontrol dan Ov berlangsung normal. Notelovitz (1997); Martin dan Sims (2005); dan Chavassieux *et al.* (2007) melaporkan bahwa selama proses remodeling, resorpsi tulang oleh osteoklas selalu diikuti pembentukan tulang baru oleh osteoblas di bagian tulang yang diresorpsi oleh osteoklas.

Hasil analisis imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal anti-TRAP5b pada bagian metafisis tulang femur distalis tikus OvD (Gambar OvD, OvD1, OvD2) terlihat TRAP5b positif warna coklat pada trabekula tulang dalam rongga sumsum tulang dan pada permukaan spikulum trabekula yang menunjukkan aktivitas osteoklas dalam proses remodeling tulang, namun bagian metafisis tulang femur distalis tikus *Wistar* ovariektomi mempunyai spikulum trabekula tulang berbentuk ireguler, lebih pendek, rongga sumsum tulang terlihat lebih luas, dan akumulasi adiposit. Lebih luasnya rongga sumsum tulang dan akumulasi jaringan adiposit pada bagian metafisis tulang femur distalis menggambarkan bahwa suplementasi kalsitriol pada tikus ovariektomi meningkatkan aktivitas osteoklas. Dilaporkan Hartiningsih *et al.* (2012) bahwa dalam waktu enam minggu pasca-ovariektomi, suplementasi kalsitriol pada tikus ovariektomi cenderung meningkatkan konsumsi Ca, ekskresi Ca dalam feses dan urine dibandingkan dengan tikus ovariektomi tanpa suplementasi kalsitriol dan tikus normal yang menggambarkan lebih rendahnya estrogen. Liang *et al.* (2002) juga melaporkan bahwa dalam waktu 3 minggu pasca-ovariektomi, tikus *Wistar* ovariektomi mengonsumsi pakan 12% lebih tinggi dibanding dengan tikus normal yang menggambarkan lebih rendahnya estrogen.



Gambar 1. K (Streptavidin-biotin, 100x.), K1 (Streptavidin-biotin, 250x.) dan K2 (Streptavidin-biotin, 1000x.). Bagian metafisis tulang femur distalis tikus tidak diovariirektomi (K) diberi antibodi monoklonal anti-*tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b), pada tulang trabekula dalam rongga sumsum tulang (A) dan permukaan spikulum trabekula (B) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat. Ov (Streptavidin-biotin, 100x.), Ov1 (Streptavidin-biotin, 250x.) dan Ov2 (Streptavidin-biotin, 1000x.). Bagian metafisis tulang femur distalis tikus ovariektomi (Ov) diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b), pada tulang trabekula dalam rongga sumsum tulang (A) dan permukaan spikulum trabekula (B) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat. OvD (Streptavidin-biotin, 100x.), OvD1 (Streptavidin-biotin, 250x.) dan OvD2 (Streptavidin-biotin, 1000x.). Bagian metafisis tulang femur distalis tikus ovariektomi yang mengkonsumsi *calcitriol* (OvD) dan diberi antibodi monoklonal anti *tartrate resistant alkaline phosphatase 5b* (TRAP5b), pada tulang trabekula dalam rongga sumsum tulang (A) dan permukaan spikulum trabekula (B) terlihat TRAP5b positif berwarna coklat.

Menurut Van Abel *et al.* (2003) dan Chen dan Kalu (1998) estrogen berperan langsung dalam absorpsi Ca usus secara transpor aktif, sedangkan menurut McKane *et al.* (1995) dan Van Abel *et al.* (2002) estrogen bekerja langsung pada ginjal untuk meningkatkan reabsorpsi Ca dalam tubulus ginjal. Menurut Baylink *et al.* (1993) dan Manolagas (2000) estrogen juga berperan menurunkan aktivitas osteoklas dan meningkatkan apoptosisnya melalui upregulasi *transforming growth factor-β* (TGF-β), suatu inhibitor resorpsi tulang yang beraksi langsung pada osteoklas dengan menurunkan pembentukan dan diferensiasi osteoklas, menurunkan aktivitas osteoklas dewasa, dan sebagai pemicu apoptosis osteoklas. Beberapa peneliti melaporkan bahwa turunnya estrogen tidak hanya menyebabkan hilangnya atau tidak adanya struktur trabekula (Rosen dan Bouxsein, 2006; Syed *et al.*, 2008), menyebabkan lebih luasnya area resorpsi di bagian trabekula tulang dan hilangnya konektivitas trabekula (Parfitt *et al.*, 1983; Eriksen *et al.*, 1999), tetapi juga meningkatkan akumulasi adiposit, jumlah dan ukuran adiposit dalam sumsum tulang pada

perempuan pascamenopause penderita osteoporosis maupun pada mencit ovariektomi (Syed *et al.*, 2008; Benayahu *et al.*, 2000).

Menurut Riggs *et al.* (2002) dan Cooke dan Naaz (2004) estrogen juga berperan penting dalam mengendalikan osteoblas dan adiposit. Dilaporkan Aubin dan Liu (1996), Pittenger *et al.* (1999), dan Muruganan dan *et al.* (2009) 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. Dari uraian tersebut memberi gambaran bahwa suplementasi kalsitriol selama 6 minggu pada tikus ovariektomi memicu aktivitas osteoklas meresorpsi tulang yang ditandai keberadaan ekspresi TRAP5b dalam rongga sumsum tulang dan permukaan spikulum trabekula, terjadi penipisan spikulum trabekula, rongga sumsum tulang menjadi lebih luas, dan akumulasi adiposit dalam rongga sumsum tulang pada bagian metafisis tulang femur distalis.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini disimpulkan bahwa diet teri tawar dan suplementasi kalsitriol 8 ng/hari selama 6 minggu pada tikus ovariektomi tidak efektif untuk mencegah osteoporosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Alatalo, S.L., J.M. Halleen, T.A. Hentunen, J. Monkkinen, and H.K. Vaananen. 2000. Rapid screening method for osteoclast differentiation *in vitro* that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. **Clin. Chem.** 46:1751-1754.
- Alatalo, S.L., K.K. Ivaska, S.G. Waguespack, M.J. Econs, H.K. Vaananen, and J.M. Halleen, 2004. Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis (ADO2)) **Clin. Chem.** 50:883-890.
- Aubin, J.E., and F. Liu. 1996. The Osteoblast Lineage. In **Principles Bone Biology**. Bilezikian, J., L. Raisz, and G. Rodan (eds) Academic Press, San Diego.
- Baylink, D.J., R.D. Finkelman, and S. Mohan. 1993. Growth factors to stimulate bone formation. **J. Bone Miner. Res.** 8:565-572.
- Benayahu, D., I. Shur, and S. Ben-Eliyahu. 2000. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. **J. Cell Biochem.** 79:407-415.
- Chavassieux, P., E. Seeman and P.D. Delmas. 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.
- Chen, C. and D.N. Kalu. 1998. Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. **J. PET.** 286:328-333.
- Cooke, P.S., and A. Naaz. 2004. Role of estrogens in adipocyte development and function. **Exp. Biol. Med.** 229:1127-1135.
- Doherty, D.A., K.M. Sanders, M.A. Kotowicz and R.L. Prince. 2001. Lifetime and five-year age-specific risks of first and subsequent osteoporotic fractures in postmenopausal women. **Osteoporos. Int.** 12:16-23.
- Eriksen, E.F., B. Langdahl, A. Vesterby, J. Rungby and M. Kassem. 1999. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. **J. Bone Miner. Res.** 14:1217-1221.
- Goodrow, G.J., V. Lisa and M.J. Cipolla. 2005. **Effect of Estrogen Therapy on Cerebral Arteries during Stroke in Female Rats**. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Halleen, J.M., and R. Ranta. 2001. Tartrate-resistant acid phosphatase as a serum marker of bone resorption. **Am. Clin. Lab.** 20:29-30.
- Halleen, J.M., S. Räisänen, J.J. Salo, S.V. Reddy, G.D. Roodman, and T.A. Hentunen. 1999. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. **J. Biol. Chem.** 274:22907-22910.
- Halleen, J.M., M. Karp, and S. Viloma. 1999. Two-site immunoassays for osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase based on characterisation of six monoclonal antibodies. **J. Bone Miner. Res.** 14:464-469.
- Halleen, J.M., S.L. Alatalo, H. Suominen, S. Cheng, A.J. Janckila, and H.K. Vaananen. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. **J. Bone Miner. Res.** 15:1337-1345.
- Halleen, J.M., H. Ylipahkala, and S.L. Alatalo. 2002. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. **Calcif. Tissue Int.** 71:20-25.
- Hartingsih, D. Anggraeni, and D. Aji. 2012. Respon metafisis tulang femur distalis tikus ovariektomi yang mengkonsumsi kalsitriol. **J. Ked. Hewan.** 6:92-98.
- Harvey, N., S. Earl, and C. Cooper. 2006. Epidemiology of Osteoporotic Fractures. In **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**. Favus, M.J. (Eds.). 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hendy, G.N., K.A. Hruska, S. Mathew, and D. Goltzman. 2006. New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D. **Kidney Int.** 69:218-223.
- Hughes, D.E. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. **Nat. Med.** 2:1132-1136.
- Janckila, A.J., I. K. Takahas, S.Z. Sun, and L.T. Yam. 2001. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. **Clin. Chem.** 47:74-80.
- Khosla, S., L.J. Melton, and B.L. Riggs. 2002. Estrogen and the male skeleton. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 87:1443-1450.
- Liang, Y.Q., M. Akishita, S. Kim, J. Ako, M. Hashimoto, K. Iijima, Y. Ohike, T. Watanebe, N. Sudoh, K. Toba, M. Yoshizumi, and Y. Ouchi. 2002. Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. **Int. J. Obesity.** 26:1103-1198.
- Ljusberg, J., B. Ek-Rylander, and G. Andersson. 1999. Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesised as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. **Biochem. J.** 343:63-69.
- 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.
- Manolagas, S.C., S. Kousteni, and R.L. Jilka. 2002. Sex steroids and bone. **Recent Prog. Horm. Res.** 57:385-409.
- Martin, T.J. and E. Seeman. 2007. New mechanisms and targets in the treatment of bone fragility. **Clin.Sci.** 112:77-91.
- Martin, T.J. and N.A. Sims. 2005. Osteoclast derived activity in the coupling of bone formation to resorption. **Trend. Mol. Med.** 11:76-81.
- McClung, M. R., 1996. Current bone mineral density data on bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis. **Bone.** 19:195-198.
- McKane, W.R., S. Khosla, M.F. Burritt, P.C. Kao, D.M. Wilson, S.J. Ory, and B.L. Riggs. 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.
- McSheehy, P. and T. Chambers. 1987. 1,25-dihidroksivitamin D₃ osteoclast stimulates osteoblastic cells to release a soluble factor that increase osteoclastic resorption. **J. Clin. Invest.** 80:425-429.
- Minkin, C. 1982. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcif. Tissue Int.** 34:285-290.
- Murugandan, S., A.A. Roman, and C.J. Sinal. 2009. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. **J. Cellular and Molecular Life Sci.** 66(2):236-253.
- Notelovitz, M. 1997. Estrogen therapy and osteoporosis: Principles & practice. **Am. J. Med. Sci.** 313(1):2-12.
- Orwoll, E.S. and R.F. Klein. 1995. Osteoporosis in men. **Endocr. Rev.** 16:87-116.
- Parfitt, A.M., C.H.E. Mathews, and A.R. Villaneuva. 1983. Relationships between surface, volume and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. **J. Clin. Invest.** 72:1396-1409.
- Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. **Science.** 284:143-147.
- Qu, Q., M. Perala-Heape, A. Kapanen, J. Dahllund, J. Salo, H.K. Vaananen, and P. Harkonen. 1998. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. **Bone.** 22:201-209.
- Reinholt, F.P., S. Mengarelli-Widholm, and B. Ek-Rylander. 1990. Ultrastructural localisation of tartrate-resistant acid ATP ase in bone. **J. Bone Miner. Res.** 5:1055-1061.
- Riggs, B.L., S. Khosla, and L.J. Melton. 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocr. Rev.** 23:279-302.
- Rosen, C.J. and M.L. Bouxsein. 2006. Mechanisms of disease: Is osteoporosis he obesity of bone? **Nature Clin. Practice Rheumatol.** 2:35-43.
- Shiraishi, A., S. Takeda, T. Masaki, Y. Higuchi, Y. Uchiyama, N. Kubodera, K. Sato, K. Ikeda, T. Nakamura, T. Matsumoto, and

- E. Ogata. 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., C. Longcope, M. Peacock, S. Hui, and C.C. Johnston. 1996. Sex steroids, bone mass, and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. **J. Clin. Invest.** 97:14-21.
- Syed, F.A., M.J. Oursler, T.E. Hefferan, J.M. Peterson, B.L. Riggs, and S. Khosla. 2008. Effects of estrogen therapy on bone marrow adipocytes in postmenopausal osteoporotic women. **Osteoporos Int.** 19(9):1323-1330.
- Takahashi, N., N. Udagawa, S. Tanaka, H. Murakami, I. Owan, T. Tamura, and T. Suda. 1994. Postmitotic osteoclast precursors are mononuclear cells which express macrophage-associated phenotypes. **Dev. Biol.** 163:212-221.
- Teitelbaum, S.L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. **Science.** 289:1504-8.
- Vaananen, H.K., H. Zhao, M. Mulari, and J.M. Halleen. 2000. The cell biology of osteoclast function. **J. Cell. Sci.** 113:377-381.
- Van Abel, M., J.G.J. Hoenderop, O. Dardenne, R. St. Arnaud, C.H. Van Os, H.J.P.T.M. Van Leeuwen, and R.J.M. Bindels. 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, J.G. Hoenderop, A.W. Van Der Kemp, J.P. Van Leeuwen, and R.J. Bindels. 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.
- Vedi, S. and J.E. Compston. 1996. The effects of long-term hormone replacement therapy on bone remodeling in postmenopausal women. **Bone.** 19:535-539.
- Vieth, R., S. Milojevic, and V. Peltekova. 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 P.A. Flecknell, 1992. Specific Surgical Operations. In **Experimental and Surgical Technique in the Rat**. Wanfort, H.B. and P.A. Flecknell (Eds.). 2nd ed. Academic Press, New York.
- Wood, R.J., J.C. Fleets, K. Cashman, M.E. Bruns, and H.F. Deluca. 1998. Intestinal calcium Absorption in the Aged rats : Evidence of Intestinal resistance to 1,25(OH)₂ Vitamin D. **Endocrinol.** 39(9):3843-3848.