

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Parathormones am Knochen*

HANSPETER ROHR und BERNHARD BREMER**

Ludwig-Aschoff-Haus, Pathologisches Institut der Universität Freiburg i.Br.
(Direktor: Prof. Dr. H. U. ZOLLINGER)

Eingegangen am 17. September 1966

Nach einer einmaligen Injektion von Parathormon tritt eine massive Knochenresorption ein, welche von einer langsamer ablaufenden Regenerationsphase gefolgt wird. Mit Hilfe von ^3H -Thymidin, einem spezifischen DNS-Vorläufer, konnte die Entstehung der gehäuft auftretenden Osteoclasten abgeklärt werden (ROHR, 1965). Auf dem Höhepunkt der Parathormonwirkung lassen sich 40 min nach der Injektion von ^3H -Thymidin keine markierten Osteoclastenkerne nachweisen, d.h. in den Osteoclasten findet keine DNS-Neusynthese statt. Dieser Befund spricht für eine Entstehung der Osteoclasten durch Fusion. An dieser Fusion sind sowohl die Präosteoblasten, als auch die Osteoblasten beteiligt. Der Vorgang des Knochenabbaues ist bisher weitgehend ungeklärt, das Schicksal der aufgelösten organischen und anorganischen Knochenmatrix nach der Auflösung unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll der Mechanismus des Knochenabbaues unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Speicherfunktion der Osteoclasten elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Methodik

Zwölf weibliche, 150—180 g schwere Wistaratten erhalten zu Versuchsbeginn eine einmalige Injektion einer mittleren Dosis von je 200 I. E. Parathormon (Lilly) i.p., und werden 15 min, 1, 2, 6, 12, 24 und 48 Std nach der Hormongabe durch Decapitation getötet.

Die primäre Spongiosa der proximalen Tibiaepiphysenfuge wird in Blöcke von 1 mm Kantenlänge geschnitten und bei 4°C während 4—6 Std in Glutardialdehyd (pH 7,4, Na-Veronalacetatpuffer) fixiert. Nach einer Zwischenwässerung in einem Na-Veronalacetatpuffer werden die Organstücke 2 Std in OsO_4 (pH 7,4) nachfixiert, und über die aufsteigende Alkoholreihe in Epon 812 eingebettet. Zur Ermittlung der geeigneten Knochenpartien werden semidicke Schnitte (2000—2500 Å) hergestellt. Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte mit der Bleifärbung nach KARNOVSKY (1961). Auswertung der Ultradünnschnitte mit dem Zeiss-Elektronenmikroskop EM 9 (Baujahr 1964).

Ergebnisse

Das Zellbild des normalen Knochens wird beherrscht durch das Auftreten von *Osteoblasten* (Abb. 1). Das hochentwickelte rauhe endoplasmatische Reticulum der Osteoblasten entspricht der lichtmikroskopischen Basophilie. Es bildet ein weitverzweigtes Kanalsystem, welches den größten Teil der Zelle ausfüllt. Teilweise erweitern sich die meist eng und dicht aneinanderliegenden Membranen des

* Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Teile der vorliegenden Arbeit werden von BERNHARD BREMER der medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. als Doktorarbeit vorgelegt.

Ergastoplasmas zu Zisternen, deren Inhalt elektronendichter als das Grundcytoplasma ist, eine netzförmige Anordnung zeigt und mit großer Wahrscheinlichkeit den Kollagenvorläufern entspricht. Die spärlichen Mitochondrien liegen zwischen den Anteilen des Ergastoplasmas eingestreut. Sie sind länglich bis oval und besitzen eine deutlich erkennbare Doppelmembran und gut ausgebildete, parallel angeordnete Cristae (Abb. 1). Der Zellkern befindet sich meist auf der dem Knochenbälkchen abgewandten Seite. Ein Nucleolus ist fast immer vorhanden. Die

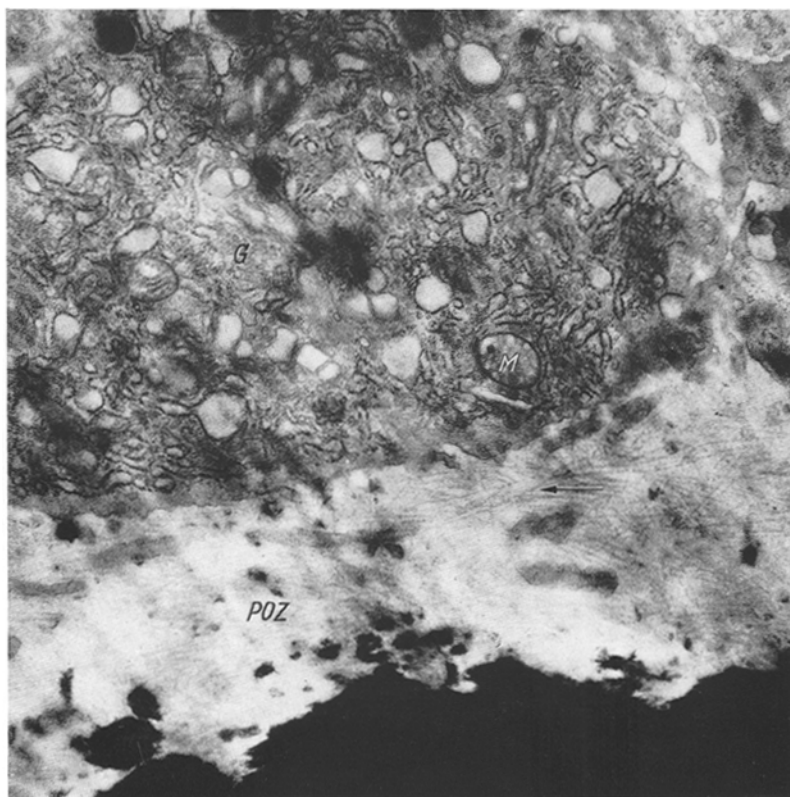


Abb. 1. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte, Kontrolle. Osteoblastenteilansicht. Das gut ausgebildete Ergastoplasma (ER) zeigt viele Zisternen. Der Golgikomplex (G) weist deutlich sichtbare Vesikel auf. Mitochondrien (M). Präössäre Zone (POZ) mit kollagenen Fibrillen (Pfeil). Circa 14 000:1 (2028/65)

Zellmembran bildet gegen die präössäre Zone zu fingerartige Ausläufer, welche oft tief in die noch unverkalkten kollagenen Fasern einstrahlen. Die präössäre Zone setzt sich aus zwei Regionen zusammen:

1. der zellnahen Region, in der unregelmäßig angeordnete kollagene Fasern ohne sichtbare Querbänderung liegen, und
2. der an die Mineralisationszone grenzenden Region (Abb. 1).

Dort finden sich in der Mehrzahl parallel angeordnete, vereinzelt bereits verkalkte kollagene Fibrillen mit einer deutlichen Querbänderung. Die Hydroxylapatitkristalle, am Übergang zur verkalkten Matrix, setzen sich aus nadelförmigen, verschieden langen Elementen zusammen. Meist sind diese

Kristalle entsprechend der Anordnung der kollagenen Fasern in der präossären Zone parallel zueinander ausgerichtet.

Die frisch eingeschlossenen *Osteocyten* sind von einer, wenn auch nur schmalen, präossären Zone umgeben, die sich mit zunehmendem Abstand von der Mineralisationszone noch verschmälert. Die Ausläufer des Cytoplasmas der Osteocyten strahlen oft bis tief in die Canaliculi der verkalkten Matrix ein. Osteoclasten lassen sich beim normalen Knochen nur ganz vereinzelt nachweisen. Sie kommen

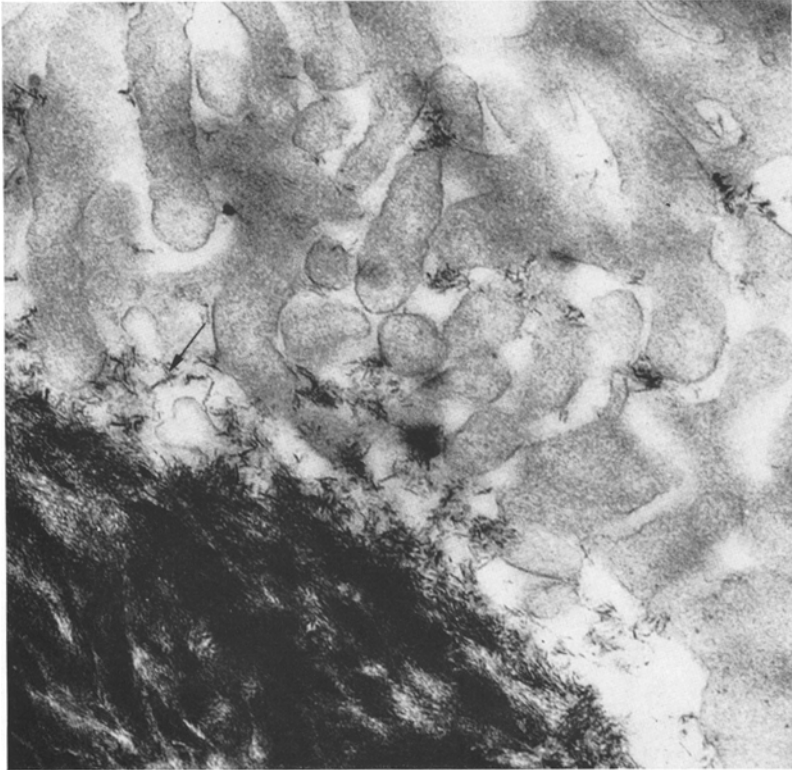


Abb. 2. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Osteoclastenteilansicht. Zwischen den zahlreichen Mikrovilli liegen viele feine Calciumhydroxylapatitkristalle (Pfeil). Die Knochenoberfläche ist aufgelockert. Circa 36000:1 (3619/65)

lediglich an den Orten des intensiven Knochen- und Knorpelumbaus, d.h. in der primären und sekundären Spongiosa vor.

Nach *Parathormongabe* hingegen ist die Zahl der *Osteoclasten* vermehrt. Innerhalb von 12 Std nach der Hormoninjektion steigt der Prozentsatz der Osteoclasten, bezogen auf die Gesamtzahl der Knochenzelelemente, von 3% auf 12% (ROHR, 1962). Es lassen sich elektronenmikroskopisch zwei Osteoclastentypen unterscheiden: eine aktive und eine ruhende Form.

Der aktive Osteoclast steht in engstem Kontakt mit dem Knochen. Die den Knochen berührende Zellmembran zeigt sehr stark ausgebildete fingerartige Ausläufer und Ausbuchtungen (Microvilli). Das Cytoplasma dieser Fortsätze ist homogen, elektronendichter als das übrige Cytoplasma. Unter dem Microvilli-besatz der Osteoclasten erscheint der verkalkte Knochen stark aufgelockert

(Abb. 2). Der scharfe Übergang von der verkalkten Knochenmatrix zur prä-ossären Zone, welche hier äußerst schmal ist, verschwindet. Die normalerweise fast glatte Oberfläche der Knochen ist an manchen Stellen unterbrochen und läßt viele feine Kristalle erkennen (Abb. 2). Diese Hydroxylapatitkristalle sind sehr zahlreich zwischen den fingerartigen Fortsätzen der Osteoclasten zu finden, wo sie sich parallel zur Plasmamembran anzuordnen scheinen. Derartige Kristalle beobachtet man auch in Vacuolen der Osteoclasten (Abb. 3). Mit Hilfe von

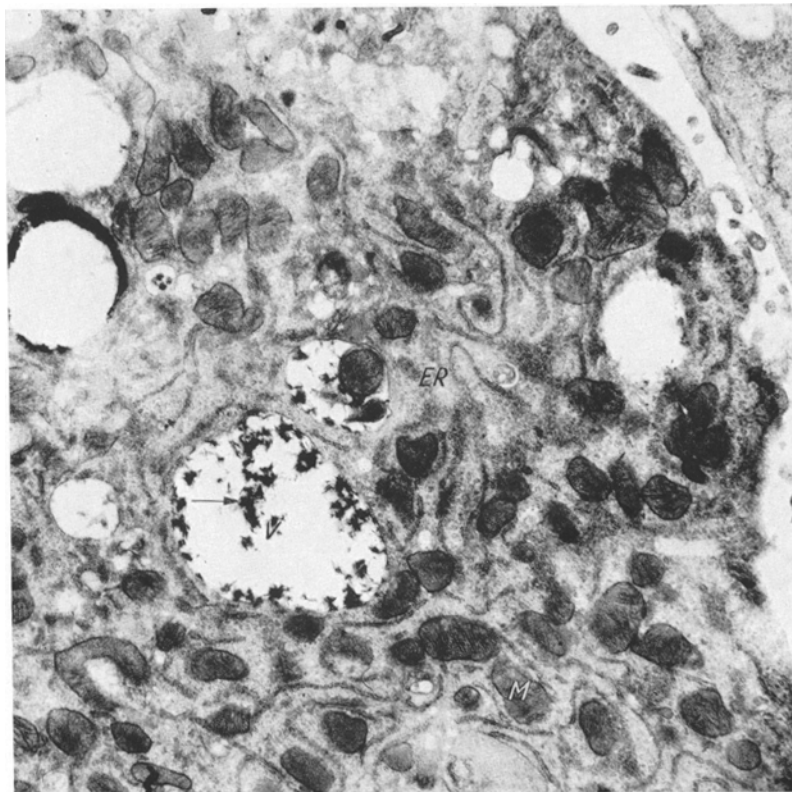


Abb. 3. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Osteoclastenteilansicht mit Vacuolen (V), welche teilweise Kristalle in sich einschließen (Pfeil), Mitochondrien (M), Ergastoplasma (ER). Circa 12000:1 (3460/65)

Serienschnitten konnte nachgewiesen werden, daß ein Teil dieser Vacuolen mit der Zellmembran in Verbindung steht. Vacuolen treten in verschiedenen Größen auf. Ihre Zahl und Größe nimmt mit ihrer Entfernung vom Knochen ab. Die Kristalle in den Vacuolen lagern sich meist peripher an die Vacuolenwand und entsprechen den Hydroxylapatitkristallen des Knochens. In den meisten Zonen der Knochenresorption kann die organische Matrix nicht nachgewiesen werden. Nur ganz vereinzelt findet man feinste kollagene Fibrillen ohne Kristalle (Abb. 4). Die dem Knochen abgewandte Zellmembran ist meist glatt und zeigt nur wenige, dünnere und sehr kurze fingerartige Fortsätze. Die Zellkerne liegen im zentralen Teil der Osteoclasten und besitzen meist einen deutlichen Nucleolus. Alle Kerne weisen Einstülpungen auf.

Die perinucleär gelegenen Golgifelder sind meist stark entfaltet (Abb. 5). Dabei ist für die Golgifelder der Osteoclasten charakteristisch, daß nur wenig vesiculäre Anteile vorhanden sind, und die sehr zahlreichen Lamellen lang gestreckt und parallel angeordnet sind. Die Mitochondrien sind sehr zahlreich.

Der *ruhende Osteoclast* steht nicht in unmittelbarer Beziehung mit den Knochenbälkchen und besitzt eine sternförmige Gestalt (Abb. 6). Seine Zellgrenze ist glatt, d.h. ohne die für den aktiven Osteoclasten typischen fingerartigen Aus-

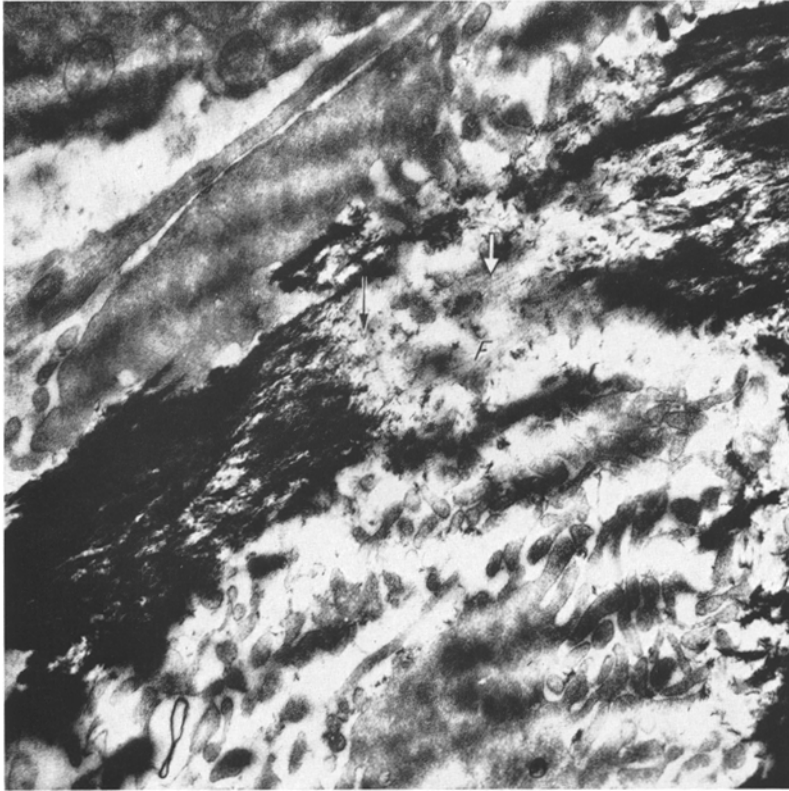


Abb. 4. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte, Osteoclastenteilansicht mit Mikrovillibesatz. In enger Nachbarschaft der Mikrovilli finden sich demaskierte kollagene Fibrillen (F) mit einer deutlichen Querbänderung, sowie freie Kristalle (Pfeil). Circa 17 000:1 (3478/65)

buchtungen. Vacuolen sind nur selten anzutreffen. In ihrem Innern beobachtet man keine Kristalle. Mitochondrien treten in großer Zahl auf. Das rauhe endoplasmatische Reticulum ist im Vergleich zum aktiven Osteoclasten weniger kräftig ausgebildet.

Im Gegensatz zum normalen Knochen lassen sich 12 Std nach Parathormoninjektion regelmäßig in unmittelbarem Kontakt mit der verschmälerten prä-ossären Zone Spindelzellen aufzeigen. Sie sind parallel zum Knochenbälkchen ausgerichtet. In gleicher Richtung verlaufen im Zellinneren auch die Membranen des stark entwickelten, dicht gelagerten, rauhen endoplasmatischen Reticulum, welches sich nur selten zu kleinen Zisternen erweitert. Mitochondrien sind nur wenig vorhanden.

Diskussion

Die auffälligsten Veränderungen am Knochen nach Parathormoneinwirkungen lassen sich an den Orten des intensivsten Spongiosaumbaues und Knochenlängenwachstums aufzeigen. Dabei bewirken bei jungen Ratten schon kleine Dosen von Parathormon deutlich sichtbare Veränderungen des Knochens. Charakteristisch für jede Knochenresorption ist das Auftreten von ein- und mehrkernigen Osteoclasten. Obwohl lichtmikroskopisch in den Osteoclasten nie Knochensalze nach-

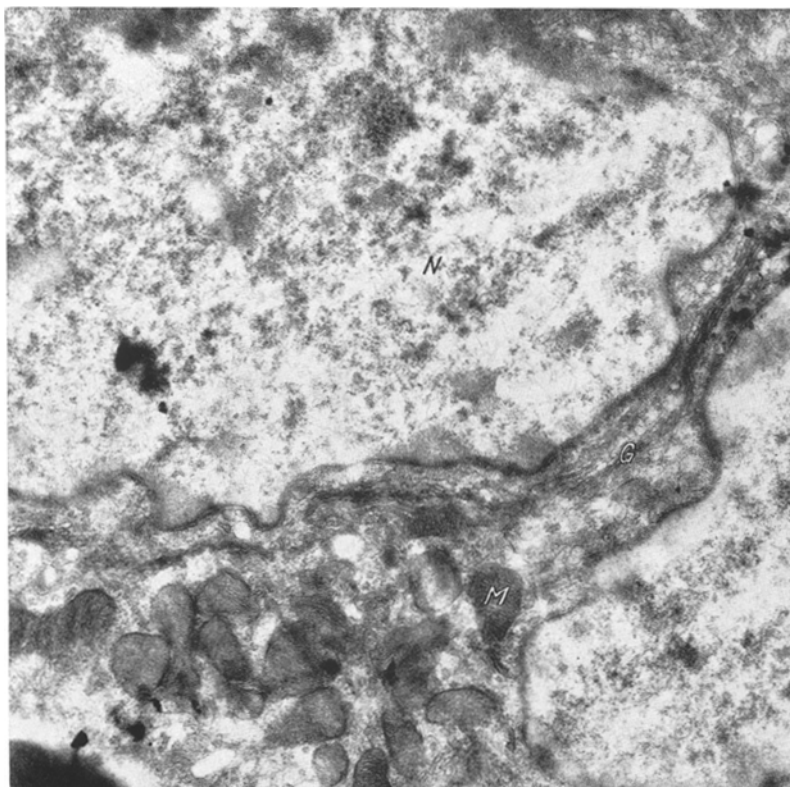


Abb. 5. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Osteoclastenteilansicht mit einem perinucleär gut ausgebildetem Golgikomplex, welcher sich hauptsächlich aus Lamellen aufbaut (G), Mitochondrien (M), Zellkern (N). Circa 17 000:1 (3463/65)

gewiesen werden konnten, wurden organische Anteile der Knochenmatrix in den Vacuolen dieser Zellen aufgefunden (ENGEL, 1952). Knochensalze sollen lediglich in benachbarten Makrophagen vorkommen. Im Elektronenmikroskop dagegen werden Kristalle, welche ganz frei von Kollagen erscheinen, in Vacuolen von Osteoclasten beobachtet. Die Menge der Kristalle, die durch die Osteoclasten aufgenommen wird, ist wahrscheinlich so gering, daß sie sich der lichtmikroskopischen Beobachtung entzieht.

An der Knochenoberfläche lassen sich nur selten in unmittelbarer Nachbarschaft von aktiven Osteoclasten demaskierte, d.h. von Kristallen freie kollagene Fasern nachweisen. In den Osteoclasten selbst und deren Vacuolen sind keine kollagenen Fasern zu sehen. Freie, nadelförmige Kristalle liegen hingegen überall

am Knochenrand in enger Nachbarschaft zu aktiven Osteoclasten, ebenso zwischen den Mikrovilli und in den Vacuolen im Zellinnern. Bei der forcierten Resorptionstätigkeit nimmt die Zelle Kristalle auf, bevor diese vollständig aufgelöst worden sind. Die Beobachtung an Seriensechnitten, daß ein Teil der Vacuolen noch mit den Membranen der Microvilli in Verbindung steht, spricht für eine Phagocytose der Osteoclasten, wie dies auch für andere mehrkernige Riesenzellen bekannt ist (vgl. z.B. LETTERER, 1959).



Abb. 6 Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Ruhender Osteoclast mit vier Kernanschnitten (N), Ergastoplasma (ER) und vielen Mitochondrien (M). Nucleolus (Pfeil). Circa 3400:1 (3465/65)

Die vorliegenden Ergebnisse ergeben keine sicheren Aufschlüsse über die Art des Knochenabbaues durch die Osteoclasten.

Hingegen stehen sie im Gegensatz zu den Ansichten von KÖLLIKER (1873), McLEAN (1954, 1957), URIST und McLEAN (1957), daß organische und anorganische Teile der Knochenmatrix gleichzeitig abgebaut und durch die Osteoclasten „verdaut“ würden. Vielmehr kann man auf Grund der elektronenmikroskopischen Beobachtungen annehmen, daß die organische Matrix zuerst extracellulär aufgelöst oder abgebaut wird und sodann die freien Kristalle von den Osteoclasten phagocytiert und verdaut werden (vgl. dazu auch SCOTT und PEASE, 1956; CAMERON und ROBINSON, 1958; GONZALES und KARNOVSKY, 1961; KNESE und KNOOP, 1961; GOLDBABER, 1962 und GAILLARD, 1962). Der Osteoclast müßte somit mindestens zwei Stoffe bilden: Eine Substanz, welche die organische

Knochenmatrix, das Kollagen und den Mucopolysaccharidproteinkomplex, depolymerisiert und auflöst, und einen zweiten Stoff, welcher die Knochenkristalle zerstört. Der letztere Vorgang, der sich auch teilweise innerhalb der Zelle in den Vacuolen abspielt, wurde auf eine Säurewirkung zurückgeführt (GOLDHABER, 1962; GAILLARD, 1962). Nach unseren Befunden scheint die anorganische Knochenmatrix in den Osteoclasten angereichert und u.U. teilweise in die Blutbahn abgegeben zu werden. Diese Speicherung ist wahrscheinlich an lysosomale Zellstrukturen gebunden. Dafür spricht auch der hohe Gehalt an saurer Phosphatase in den Osteoclasten. Die Speicherfähigkeit der Osteoclasten konnte auch GOLDHABER (1962) durch eine Plutoniumanhäufung in Osteoclasten nach Resorption eines vorher mit Plutonium markierten Knochens aufzeigen. Ähnliche Ergebnisse erhielten schließlich ARNOLD und JEE (1957) bei der autoradiographischen Untersuchung des Knochens nach Injektion von ^{239}Pu .

Für die Resorption oder besser nach DODDS (1932) „removal“ oder „destruction“, der organischen Matrix wird ein proteolytisch enzymatischer Prozeß angenommen (NEUMANN, 1960; KNESE und KNOOP, 1961). Bei der aktiven Knochenresorption wird zunächst durch enzymatische Spaltung das Kollagen zu Peptiden abgebaut (STERN u. Mitarb., 1965). Diese Spaltprodukte gleichen in Größe und Aminosäurezusammensetzung denjenigen, welche bei der Kollagenauflösung durch bakterielle Kollagenase entstehen.

Diese Peptide könnten sodann teilweise durch andere Enzyme in freie Aminosäuren gespalten und daraufhin durch das Blut abtransportiert werden. Tatsächlich ist nach Parathormoninjektion der Mucoproteingehalt des Serum erhöht (ENGEL, 1952).

Auch die elektronenmikroskopischen Befunde sprechen gesamthaft für einen solchen enzymatischen Vorgang. Dabei entziehen sich allerdings schon die Peptide und erst recht die freien Aminosäuren der Darstellung, da sie während der Präparation größtenteils herausgelöst werden. Die große Zahl von Mitochondrien in den Osteoclasten unterstreicht den großen Energieverbrauch dieser Zellen, welcher für die ausgeprägte enzymatische und sekretorische, sowie für die phagocytotische und speichernde Aktivität der Osteoclasten erforderlich ist. Auch die enorme Oberflächenvergrößerung durch die Mikrovilli spricht für eine Resorptions- und eine Sekretionsleistung der Zelle. HANCOX (1956) vermutete, daß die große Anzahl von lichtmikroskopisch festgestellten Vacuolen in Osteoclasten sekretorischer Natur sind. Allerdings zeigt das Vorhandensein von Kristallen und ihre enge Beziehung zu den Mikrovilli, daß zumindest ein Teil dieser Vacuolen eher als Ausdruck einer Phagocytose, denn als solcher einer Sekretion aufzufassen ist. Für eine Speicherung von organischer Matrix in diesen Vacuolen ergeben sich jedoch keine Anhaltspunkte. Lediglich kleinere aus dem Golgifeld stammende Vacuolen könnten sekretorischer Natur sein.

Der Golgikomplex ist in den Osteoclasten gut ausgebildet. Die Bedeutung dieses Zellkompartiments für Synthese- und Sekretionsvorgänge der Zelle wurde in jüngster Zeit auch elektronenmikroskopisch-autoradiographisch unterstrichen (ROHR, 1966). Dafür, daß der lamelläre Anteil des Golgifeldes ein Membranreservoir darstellt, könnte die Tatsache sprechen, daß in den aktiven Osteoclasten wohl große Golgifelder, jedoch nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum vorhanden ist. Umgekehrt zeigen die Osteoblasten mit dem sehr gut

ausgebildeten rauhen endoplasmatischen Reticulum nur wenig Golgilamellen. Unter der Annahme, daß die Osteoclasten durch Fusion von Präosteoblasten und Osteoblasten entstehen (ROHR, 1964), müßten sich die Membranen des Ergastoplasma zurückbilden. Für die Bedeutung des Golgifeldes als Membranreservoir könnte schließlich die Beobachtung sprechen, daß der Osteoclast mehr lamelläre als vesiculäre Membransysteme aufweist.

Das Schicksal der Osteoclasten nach Beendigung ihrer Tätigkeit ist ungeklärt. Diese Zellen besitzen eine verhältnismäßig kurze Lebensdauer von etwa 12 Std (vgl. dazu auch TONNA, 1960; GOLDHABER, 1962; ROHR, 1964). Zugrundegehende Osteoclasten wurden bisher nicht beobachtet. Daher könnte angenommen werden, daß sich diese wieder in Osteoblasten und Präosteoblasten umwandeln (HELLER, 1950; TONNA, 1960; YOUNG, 1962).

12 Std nach der Parathormongabe finden sich im Gegensatz zu den Befunden am normalen Knochen regelmäßig in unmittelbarer Beziehung zu den Knochenbälkchen spindelige Zellen, welche ein stark entwickeltes, enges Ergastoplasma besitzen. Dabei handelt es sich u.E. um junge, noch nicht funktionstüchtige Osteoblasten. Sie schieben sich oft keilförmig zwischen die Osteoclasten und die Reste der Knochenbälkchen und leiten so die Knochenneubildungsphase ein.

Zusammenfassung

1. Zur Prüfung der Parathormonwirkung auf den Knochen erhalten 150 bis 180 g schwere Wistarratten je eine einmalige Dosis von 200 I. E. Parathormon i. p. Diese Ratten werden in Intervallen von 15 min bis zu 48 Std getötet. Zur elektronmikroskopischen Verarbeitung kommt die proximale Tibiaepiphysenfuge.

2. 6 Std nach der Parathormongabe treten die Osteoclasten in einer ruhenden und in einer aktiven Form auf. Der aktive Osteoclast unterscheidet sich vom ruhenden hauptsächlich durch seine Vacuolen mit freien Calciumhydroxylapatitkristallen, dem Mikrovillibesatz und den unmittelbaren Kontakt mit dem Knochenbälkchen, welches zerstört wird. Die nicht verkalkte präossäre Zone verschwindet. Demaskiertes Kollagen läßt sich nur selten nachweisen.

3. Diese Befunde deuten auf einen enzymatisch bedingten Abbau der organischen Matrix mit anschließender Phagocytose und „Verdauung“ der freien anorganischen Knochenmatrix hin.

Electronmicroscopic study of the mode of action of Parathormone on bone

Summary

Wistar rats weighing 150—180 g received a single injection of 250 I.U. Parathormone i.p. Small pieces of the proximal part of the tibia were examined in intervals from 15 min up to 48 hours.

Six hours after the injection of Parathormone two types of osteoclasts were found: An inactive and an active type. The active osteoclast is represented by vacuoles containing crystals of calciumhydroxyapatite, by a brush border and by its intimal contact with the calcified bone. The non-calcified preosseous zone disappears. Sometimes demasked collagen fibrils are found.

The results suggest an enzymatically conditioned destruction of the organic bone matrix with subsequent phagocytosis and „digestion“ of the liberated inorganic bone matrix.

Literatur

- ARNOLD, J. S., and W. S. S. JEE: Bone growth and osteoclastic activity as indicated by radioautographic distribution of plutonium. *Amer. J. Anat.* **101**, 367 (1957).
- BURROWS, R. B.: Variations produced in bones of growing rats by parathyroid extract. *Amer. J. Anat.* **62**, 237 (1938).
- CAMERON, D. A., and R. S. ROBINSON: Electron microscopy of primary spongiosa of metaphysis at distal end of femur in newborn infant. *J. Bone Jt Surg. A* **40**, 687 (1958).
- DODDS, G. S.: Osteoclasts and cartilage removal in enchondral ossification of certain mammals. *Amer. J. Anat.* **50**, 97 (1932).
- ENGEL, M. B.: Mobilization of mucoprotein by parathyroid extract. *Arch. Path.* **53**, 339 (1952).
- GAILLARD, P. J.: Parathyroid gland tissue and bone in vitro (I). *Exp. Cell Res., Suppl.* **3**, 154 (1955).
- Parathyroid gland tissue and bone in vitro (II). *Proc. kon. red. Akad. Wet., Ser. C*, **58**, 286 (1955).
- A comparative study on the influence of thyroxine and of parathyroid extract on the histological structure of the explanted embryonic radius rudiment. *Acta morph. neerl.-scand.* **5**, 21 (1962).
- Parathyroid and bone in vitro. *Voeding* **23**, 283 (1962).
- GOLDHABER, P.: Some current concepts of bone Physiology (I). *New Engl. J. Med.* **266**, 870 (1962).
- Some current concepts of bone Physiology (II). *New Engl. J. Med.* **266**, 924 (1962).
- GONZALES, F., and M. J. KARNOVSKY: Electron microscopy of osteoclasts in healing fractures of rat bone. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 299 (1961).
- HANCOX, N.: The osteoclast. In: G. H. BOURNE (ed.), *The biochemistry and physiology of bone*, p. 213. New York: Academic Press, Inc. (1956).
- HELLER, M., F. C. McLEAN, and W. BLOOM: Cellular transformations in mammalian bones induced by parathyroid extract. *Amer. J. Anat.* **87**, 315 (1950).
- KNESE, K. H., u. A. M. KNOOP: Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Zellen in der Eröffnungszone des Epiphysenknorpels. *Z. Zellforsch.* **54**, 1 (1961).
- KOELLIKER, A.: *Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenform.* Leipzig 1873.
- LETTERER, E.: *Allgemeine Pathologie.* Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- McLEAN, F. C.: Biochemical and biomechanical aspects of the resorption of bone. *J. Periodont.* **25**, 176 (1954).
- The parathyroid hormone and bone. *Clin. Orthop.* **9**, 46 (1957).
- NEUMAN, W. F., B. J. MULRYAN, and G. R. MARTIN: Chemical view osteoclasts based on studies with yttrium. *Clin. Orthop.* **18**, 124 (1960).
- ROHR, H. P.: Autoradiographische Untersuchungen über die Zellkinetik der enchondralen Ossifikation der Ratte nach Parathormonverabreichung. *Z. ges. exp. Med.* **138**, 461 (1964).
- Zur Entstehung der mehrkernigen Osteoklasten nach Parathormongabe (Autoradiographische Untersuchungen mit ³H-Thymidin). *Klin. Wschr.* **42**, 1209 (1964).
- Autoradiographische Untersuchungen über den Kollagenstoffwechsel bei der experimentellen Rattenrachitis (Untersuchungen mit Tritium-Glycin). *Z. ges. exp. Med.* **139**, 621 (1965).
- Die Kollagensynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur des Osteoblasten (elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchung mit Tritium-markiertem Prolin). *Virchows Arch. path. Anat.* **338**, 342 (1965).
- Elektronenmikroskopische Autoradiographie. *Habil.-Schr.* 1966.
- SCOTT, B. L., and D. C. PEASE: Electron microscopy of epiphyseal apparatus. *Anat. Rec.* **126**, 465 (1956).
- SELYE, H.: On the stimulation of new bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology* **16**, 547 (1932).
- STERN, B. D., M. J. GLIMCHER, G. L. MECHANIC, and P. GOLDHABER: Studies of collagen degeneration during bone resorption in tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **199**, 577 (1965).

- TONNA, E. A.: Osteoclasts and aging skeleton: cytological, cytochemical and autoradiographic study. *Anat. Rec.* **137**, 251 (1960).
- Periosteal osteoclasts, skeletal development and aging. *Nature (Lond.)* **185**, 405 (1960).
- URIST, M. R., and F. C. McLEAN: Accumulation of mast cells in endosteum of bones of calcium-deficient rats. *Arch. Path.* **63**, 239 (1957).
- YOUNG, R. W.: Autoradiographic studies on postnatal growth of the skull in young rats injected with tritiated glycine. *Anat. Rec.* **143**, 1 (1962).
- Regional differences in cell generation time in growing rat tibiae. *Exp. Cell Res.* **26**, 562 (1962).
- Cell proliferation and specialization during enchondral osteogenesis in young rats. *J. Cell Biol.* **14**, 357 (1962).

Dozent Dr. H. ROHR
Pathologisches Institut der Universität
7800 Freiburg, Albertstraße 19