

Elektronenmikroskopische und mikroradiographische Befunde am Knochen der mit Dihydrotachysterin behandelten Ratte*

W. REMAGEN, R. CAESAR und F. HEUCK

Pathologisches Institut der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. K. LENNERT)
und Zentral-Röntgeninstitut des Katharinenhospitals der Stadt Stuttgart
(Direktor: Prof. Dr. F. HEUCK)

Eingegangen am 29. Mai 1968

Electron-Microscopic and Microradiographic Findings in Bones of Rats Treated with Dihydrotachysterol

Summary. Rats were treated with Dihydrotachysterol (0.1 mg twice a week) and the following electron microscopic and microradiographic findings were made:

1. The cancellous bone of the epiphysis and metaphysis were sclerotized by newly formed bone which appears in the microradiogramm to be incompletely calcified.
2. Electron microscopically and microradiographically there were decalcified regions around numerous osteocyte lacunae. In the old, fully calcified bone these altered lacunae were arranged in small groups; in the young, incompletely calcified bone they were dispersed more homogenously.
3. In the mucopolysaccharide sheath of many osteocytes we found different quantities of a material made up of fine, electron-dense particles. We presume this material to be free calcium dissolved from the surrounding bone matrix.

We consider these alterations to be the morphological equivalent of osteocytic activity in the metabolism of calcium. We discuss the relationship of these alterations to "periosteocytic osteolysis" and "onkosis".

Zusammenfassung. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Mikroradiographie wurde der Knochen von Ratten untersucht, die mit 2mal 0,1 mg/Woche Dihydrotachysterin behandelt worden waren. Dabei erhoben wir folgende Befunde:

1. Durch Neubildung eines mikroradiographisch schwach verkalkt erscheinenden Knochens wird die Spongiosa der Epi- und Metaphyse sklerosiert.
2. Elektronenmikroskopisch und mikroradiographisch sieht man um zahlreiche Osteocyten Entkalkungshöfe; sie liegen im alten, voll verkalkten Knochen in Gruppen, im jungen, schwach verkalkten Knochen mehr gleichmäßig verteilt.
3. In der periosteocytären Mucopolysaccharidscheide findet sich bei einer großen Zahl von Zellen in wechselnder Menge ein aus feinen, elektronendichten Partikeln bestehendes Material; dieses Material wird als freies Calcium angesehen, welches aus der periosteocytären Grundsubstanz stammt.

Die beschriebenen Veränderungen werden als morphologischer Ausdruck einer Aktivität der Osteocyten im Calciumstoffwechsel aufgefaßt. Ihre Beziehungen zur periosteocytären Osteolyse und zur Onkose werden diskutiert.

Der Vitamin D-Abkömmling Dihydrotachysterin (DHT) ähnelt in seiner Wirkung dem Nebenschilddrüsenhormon; es erhöht den Serum-Calcium-Spiegel (v. BRAND et al., 1932). Seine Wirkungsweise und seine Angriffspunkte im Calciumstoffwechsel wurden bereits vielfach untersucht (s. REMAGEN, 1968). Unter anderem konnte einer von uns (REMAGEN, 1967) durch radiochemische Untersuchungen des Calciumstoffwechsels anhand eines Stoffwechselmodells (AUBERT

* Mit Unterstützung der DFG durchgeführt.

et al., 1960) mit Hilfe von Calcium 45 zeigen, daß DHT neben der Calciumresorption aus dem Darm auch die Mineralmobilisation im Knochen verstärkt. Bei der Mineralmobilisation spielen — neben dem osteoklastischen Knochenabbau — die Osteocyten eine wesentliche Rolle (BÉLANGER et al., 1965). Bei unseren Stoffwechseluntersuchungen mit DHT erhob sich daher die Frage, ob die Aktivität der Osteocyten bei der Calciummobilisation morphologisch nachweisbar ist. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Mikroradiographie diese Frage zu beantworten.

Material und Methoden

Zu unseren Versuchen verwendeten wir weibliche Ratten (Wistar CFM) von 150—160 g Gewicht. Die Versuchstiere erhielten 2mal wöchentlich 0,1 mg (insgesamt 0,6 mg) DHT in Maisöl gelöst durch die Schlundsonde.

Für den elektronenmikroskopischen Teil der Untersuchung benutzten wir 10 Versuchs- und 3 Kontrolltiere. Wir töteten die Tiere in Äthernarkose durch Eröffnung der Brustaorta und legten das distale Ende des Femur so schnell wie möglich frei, brachen die Epiphyse ab und zerlegten den metaphysären Knochen unter gepuffertem 1%igem Osmiumtetroxyd von 4°C mit der Rasierklinge in Stückchen von etwa 0,5 mm Kantenlänge. Der Zeitraum zwischen Tötung und Einbringung des Knochens in die Fixierflüssigkeit betrug maximal 1 min. Nach zweistündiger Fixierung wurden die Stückchen in Pufferlösung gespült, über eine aufsteigende Acetonreihe entwässert und in Araldit eingebettet. Mit dem Porter-Blum-Mikrotom fertigten wir unter Verwendung eines Diamantmessers Feinschnitte an, kontrastierten die Schnitte teils mit Bleicitrat, teils mit Uranylacetat und untersuchten sie mit dem Siemens-Elmiskop I. Von einzelnen Versuchstierblöckchen wurden, parallel zu den anderen, Schnitte direkt in einer gesättigten Lösung von tertärem Calciumphosphat aufgefangen und unkontrastiert untersucht.

Für die Mikroradiographie standen uns aus den Stoffwechseluntersuchungen (REMAGEN, 1967) von 30 intakten Versuchs- und 30 Kontrolltieren jeweils die Hälften der Femurkondylen sowie von 21 thyreoparathyreoidektomierten Versuchstieren außer den Femurkondylen der Tibiapfopf, mehrere Wirbel, die Knorpelknochengrenze von drei Rippen und eine Unterkieferhälfte zur Verfügung. Die Knochen wurden in dreimal gewechseltem Aceton-Alkohol abs. $\ddot{\text{aa}}$ fixiert, entfettet und entwässert und dann unentkalkt in Methylmethacrylat (Methylmethacrylat 10 ml; Benzoylperoxyd 0,2 g; Polyäthylenglykol 4000 4 g) nach Durchtränkung (2mal gewechselt) möglichst hart eingebettet. Wir zerlegten die Blöcke mit der Mikrosäge nach WAGNER (1965) (Firma Jung, Heidelberg) in ca. 100 μ dicke Sägeschnitte und schliffen von Hand auf eine Dicke von durchschnittlich 50—60 μ nach. Von diesen Schlitffen fertigten wir mit dem Mikroradiographieapparat Philips CMR 5 auf Kodak spectroscopic safety film, type 649 GH, Kontaktaufnahmen bei 2 mA und 4,5 kV an und entwickelten sie mit Gevaert G 230 konstant 10 min. Wir vergrößerten die Mikroradiogramme mit dem Zeiss-Photomikroskop nach.

Ergebnisse

1. Elektronenmikroskopische Untersuchung

a) *Kontrolltiere.* Die Knochenzellen sind auch im Dünnschnitt zumeist spindelig geformt. Der Zellkern nimmt gewöhnlich den größten Teil der Zelle ein. Eine typische doppelte Kernmembran grenzt ihn vom Cytoplasma ab. Die Kernsubstanz ist feinkörnig und ziemlich gleichmäßig verteilt. Das Cytoplasma enthält mäßig viele, ziemlich geschwollene Mitochondrien mit deutlich sichtbaren Cristae. Das wechselnd gut ausgeprägte rauhe endoplasmatische Reticulum ist teilweise zu Zisternen erweitert; ferner finden sich Anschnitte des Golgi-Apparates sowie meist rundliche, ziemlich elektronendichte Einschlüsse von der Größe der Mitochondrien, sog. dense bodies, die wohl Lysosomen entsprechen. Außerdem sieht

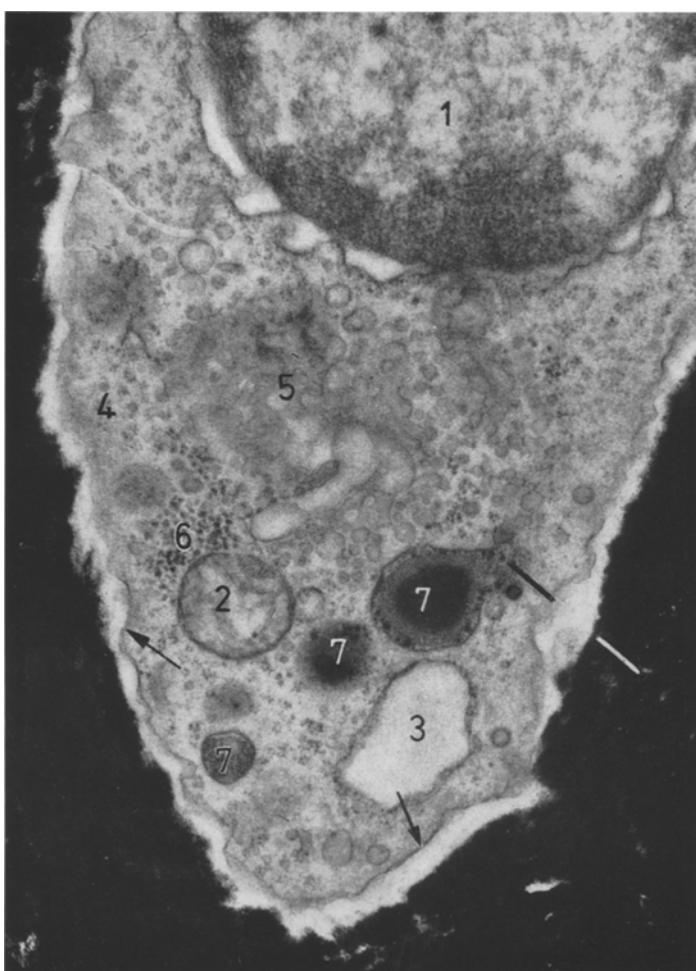


Abb. 1. Elektronenmikroskopisches Bild eines regelhaften Osteocytens. Im breiten Cytoplasma zahlreiche Zellorganellen und Einschlüsse. Die Zellmembran ist mäßig gebuchtet, die Mucopolysaccharidscheide schmal. Die verkalkte Grundsubstanz erscheint hier an der Grenze gegen die Zellhöhle deutlich aufgerauht. In der Zellscheide einige Kollagenfibrillen. $28000\times$. Bedeutung der Bezeichnung: 1 Kern, 2 Mitochondrien, 3 endoplasmatisches Reticulum mit Zisternen, 4 Ribosomen, 5 Golgi-Zone, 6 Glykogen, 7 "dense bodies", 8 Zellfortsätze, 9 Zellmembran (dünne Pfeile), 10 Mucopolysaccharidscheide (zwischen --), 11 feine Kollagenfibrillen, 12 freies Calcium, 13 „osmiophile Lamina“ (dicke Pfeile), 14 verkalkte interlacunäre Matrix, 15 Entkalkungsbezirke

man freie Ribosomen sowie Glykogenkörnchen. Die Zellmembran ist im allgemeinen faltenfrei, gelegentlich aber auch stärker gebuchtet und gefaltet oder in Form von Mikrovilli ausgezogen; sie umgibt auch die Zellausläufer, die sich häufiger aufgabeln, bevor sie in die Kanälchen der Grundsubstanz eintreten. Der Raum zwischen der Zellmembran und der verkalkten elektronendichten Grundsubstanz ist meist schmal, oft nur spaltförmig; er entspricht der Mucopolysaccharidscheide der Zelle und enthält vielfach feine quergestreifte, ungeordnet

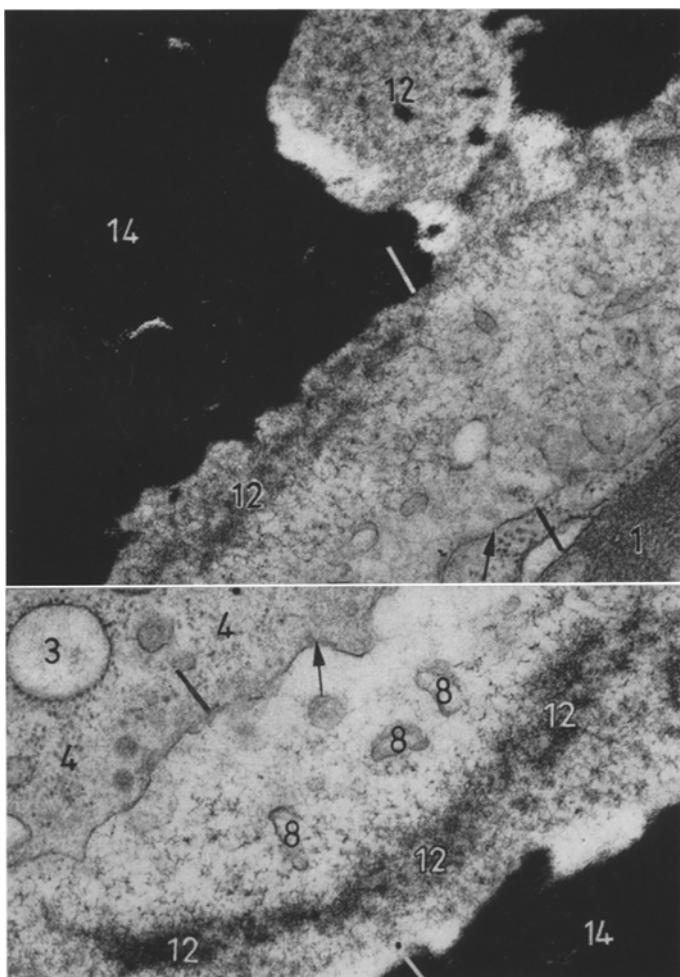


Abb. 2. Elektronenmikroskopisches Bild des Osteozyten eines Versuchstieres. Die Zellorganelen gleichen denen der regelhaften Zelle in Abb. 1. In der stark verbreiterten Zellscheide zahlreiche Anschnitte von Zellfortsätzen und, in ungleichmäßiger Verteilung, reichlich freies Calcium. Oben im Bild ein erweiterter Kanälchenabgang, der ebenfalls Calcium enthält.
38500×

liegende Fibrillen. Die verkalkte Grundsubstanz grenzt unvermittelt an die Mucopolysaccharidscheide. Die Begrenzung der Knochenhöhle ist vielfach glatt, die Zellscheide spaltförmig und die Zellmembran eben. Um andere Knochenzellen ist die Grenzlinie der verkalkten Knochengrundsubstanz rauh; kurze nadelartige Zacken ragen in die Zellscheide vor. Die Zellscheide ist an diesen Stellen gewöhnlich breiter, die Zellmembran stärker gegliedert. In der verkalkten Knochengrundsubstanz ist nur gelegentlich die Querstreifung der Kollagenfibrillen erkennbar (Abb. 1).

b) Versuchstiere. Die Cytoplasmaorganellen und die Cytoplasmaeinschlüsse in den Knochenzellen unterscheiden sich prinzipiell nicht von denen der Kontroll-

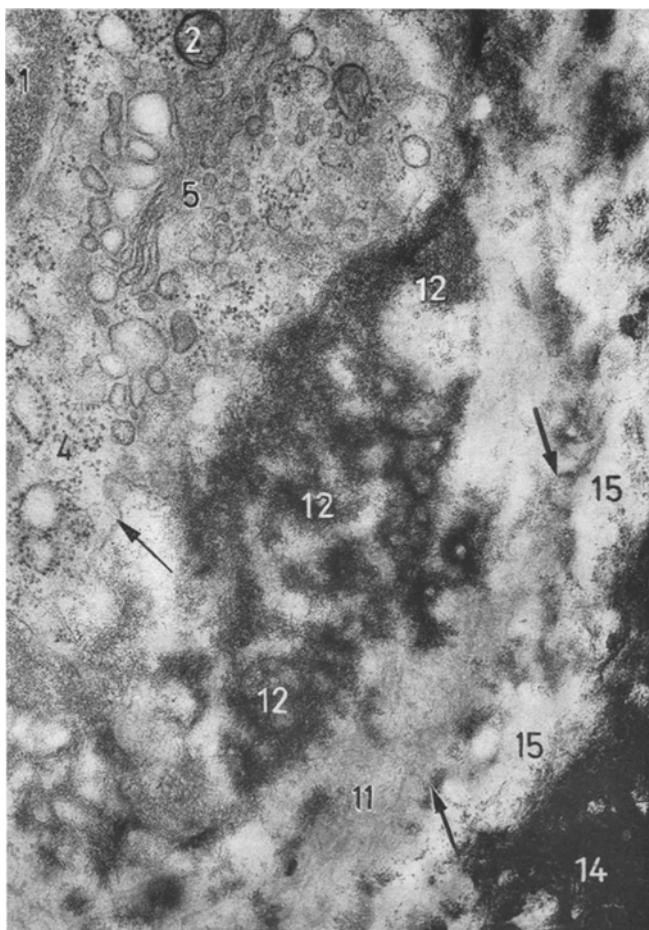


Abb. 3. Elektronenmikroskopisches Bild des Osteocytens eines Versuchstieres. Stark geschwollene Mitochondrien. Reichlich freies Calcium und viele feine Kollagenfibrillen in der breiten Zellscheide. Durch ausgedehnte Entkalkung der Zellhöhlenwand ist die „osmiophile Lamina“ freigelegt. $38500\times$

tiere. Dagegen ist die Zellmembran der Osteocytens meist stärker eingebuchtet und gefaltet. Der wesentliche Unterschied zu den Kontrollen besteht in der starken Verbreiterung der Mucopolysaccharidscheide; diese enthält auch hier feine quergestreifte Kollagenfibrillen. Ferner findet man in der Mucopolysaccharidscheide zahlreicher Zellhöhlen, entweder gleichmäßig fein verteilt oder streifenförmig zusammengeschoben und gehäuft, sehr kleine nadelartige Partikel von der Elektronendichte der verkalkten Grundsubstanz. Diese Partikel liegen auch in Buchten der Zellmembran und in den gelegentlich erweiterten Kanälchenabgängen (Abb. 2).

Nur selten sieht man glatt begrenzte Zellhöhlen; meist ist die Wand stark aufgerauht und mit unregelmäßigen Zacken versehen. Der angrenzende Teil der Knochengrundsubstanz ist bei einem Teil der Zellen von regelhafter Elektronendichte, bei anderen aber fleckförmig oder durchgehend aufgehellt, so daß die

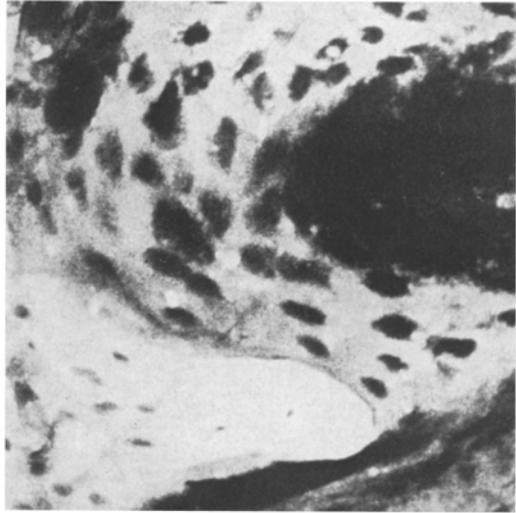


Abb. 4

Abb. 4. Mikroradiogramm der proximalen Tibiaepiphyse eines thyreoparathyreidektomierten Versuchstieres. Oben die sklerotische Spongiosa mit alten, voll verkalkten strahlendichten Bälkchen und dazwischen eingebautem jungen, unvollständig bis gering verkalktem Knochen. Die Osteocytenhöhlen im alten Knochen sind klein, die im jungen haben deutliche Entkalkungshöfe. Unten der Epiphysenkörper. 70×

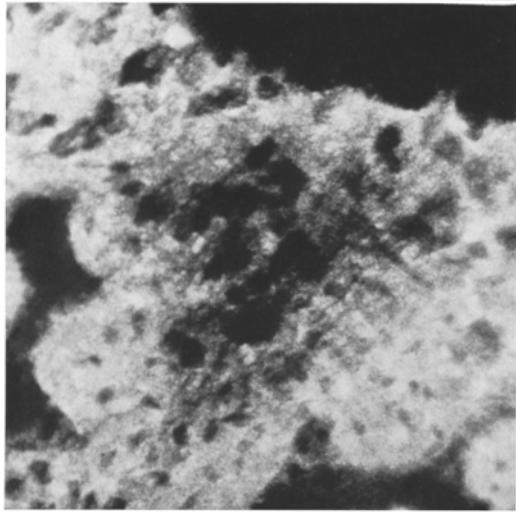


Abb. 5

Abb. 5. Mikroradiogramm der Epiphysen-Spongiosa eines Versuchstieres. Eine Gruppe von Osteocyten mit unscharfen, strahlendurchlässigen Höfen und diffus vermindelter Dichte der Grundsustanz in diesem Bereich. Daneben liegen strahlendichtere Bezirke mit kleinen, scharf begrenzten Osteocytenhöhlen. 350×

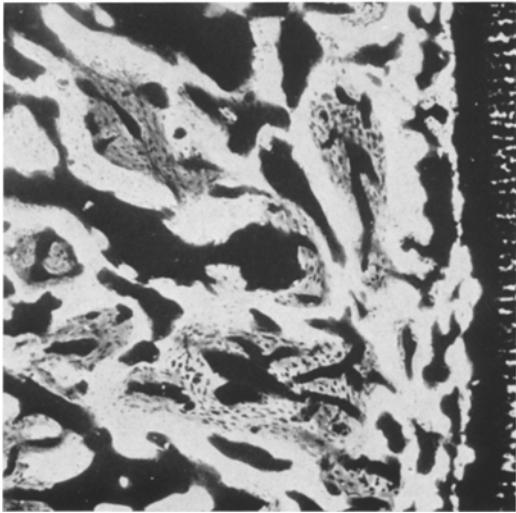


Abb. 6

Abb. 6. Mikroradiogramm der Epiphysenspongiosa eines thyreoparathyreidektomierten Versuchstieres. Links ein altes, voll verkalktes Bälkchen mit kleinen, scharf begrenzten Osteocytenhöhlen. Daran angelaget junger, schwach verkalkter „Sklerosatknochen“ mit unscharf erweiterten, z.T. zusammenfließenden Zellhöhlen. 350×

quergestreiften Kollagenfibrillen in wechselnder Ausdehnung sichtbar werden. Diese Höfe verminderter Dichte werden gegen die Zellscheide fast immer durch einen schmalen, deutlich dichteren Saum abgegrenzt (Abb. 3).

Die auf gesättigter Calciumphosphatlösung aufgef Fangenen und nicht kontrastierten Schnitte zeigen die gleichen Veränderungen in der Zellscheide und in der umgebenden Grundsubstanz. Die Feinstruktur des Cytoplasma ist aus verständlichen Gründen nur angedeutet zu erkennen.

2. Mikroradiographische Untersuchung

a) *Kontrolltiere*. Die Kontrolltiere dieser Versuchsserie wurden mit gleich schweren Versuchstieren paargefüttert. Da die Versuchstiere teilweise schlecht fraßen, ist dadurch auch die Calciumaufnahme der Kontrolltiere teilweise erheblich verringert. Bei Tieren mit hoher Calciumaufnahme finden sich nur vereinzelt erweiterte Osteocytenhöhlen mit unscharfer Begrenzung, während die überwiegende Mehrzahl der Höhlen klein, spindelförmig und scharf begrenzt ist. Bei Tieren mit geringerer Calciumaufnahme sind die erweiterten Osteocytenhöhlen etwas zahlreicher.

b) *Versuchstiere*. Bei den Versuchstieren mit geringer Calciumaufnahme weisen zahlreiche Osteone in der Corticalis der Diaphyse eine deutlich geringere Strahlendichte auf. In der Epi- und Metaphyse findet man zwischen den alten Spongiosa-Bälkchen wechselnd viel neu angebauten Knochen, der die Markräume entsprechend stark einengt und das Bild einer Sklerose hervorruft. Dieser „Skleroseknochen“ ist deutlich schwächer verkalkt als die alte Spongiosa (Abb. 4). Sowohl im jungen als auch im alten Knochen sind zahlreiche Osteocytenhöhlen ausgeweitet und unscharf begrenzt. Im alten, voll verkalkten Knochen liegen sie meist in kleinen Gruppen beisammen; die Grundsubstanz ist in diesem Bereich in wechselndem Grade verstärkt strahlendurchlässig (Abb. 5). Im schwach verkalkten, jungen Knochen sind die veränderten Osteocytenhöhlen mehr gleichmäßig verteilt zu finden. Auch hier kann durch eine diffus verminderte Strahlendichte der Grundsubstanz der Eindruck eines „Zusammenfließens“ der Zellhöhlen entstehen (Abb. 6). Bei starker Vergrößerung kann man gelegentlich die erweiterten Kanälchen erkennen.

Diskussion

Unsere Befunde lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: In dem untersuchten Knochen unserer Versuchstiere rief die DHT-Behandlung eine Sklerosierung der Spongiosa durch Anbau eines jungen, schwach verkalkten Knochens an die alten Bälkchen hervor. Im alten und jungen Knochen erschienen Osteocytenhöhlen erweitert und unscharf begrenzt. Diese Entkalkungshöfe um die Osteocyten waren auch elektronenmikroskopisch nachweisbar. Ferner war die Mucopolysaccharidscheide zwischen Osteocyt und Zellhöhlenwand deutlich verbreitert und enthielt vielfach eine feindisperse Substanz mit der gleichen Elektronendichte wie die verkalkte Grundsubstanz.

Die Sklerosierung der Spongiosa der Röhrenknochen nach länger andauernder Behandlung mit DHT wurde bereits von LENEL (1941) sowie EGER et al. (1942) beobachtet. LENEL betrachtete die Sklerose als Endstadium der morphologischen Veränderungen. Dieser junge Skleroseknochen befindet sich wahrscheinlich auf

dem Wege zur vollständigen Verkalkung. Es ist jedoch auch möglich und läßt sich aufgrund der mikroradiographischen Bilder nicht ausschließen, daß dieser Knochen auch sekundär entkalkt wurde, wie HEUCK (1961, 1965) bei ähnlichen Befunden am menschlichen Knochen annahm.

Die mikroradiographisch und elektronenmikroskopisch um Osteocytenhöhlen nachweisbaren Entkalkungshöfe sind die Folge einer Calciummobilisation durch die Zelle im Rahmen des durch DHT gesteigerten Calciumstoffwechsels. Die nach der Methode von BOOTHROYD (1964) durchgeföhrten Kontrollen schließen die Möglichkeit aus, daß diese Entkalkungshöfe durch die Einwirkung wäßriger Lösungen bei der Präparation entstanden sind. Auf den mikroradiographischen Bildern kann man feststellen, daß die Entkalkungshöfe in charakteristischer Weise gruppenförmig im alten und mehr gleichmäßig verteilt im jungen Knochen angeordnet sind. Diese Verteilung gleicht derjenigen von Knochenveränderungen um Osteocyten, wie sie von BÉLANGER et al. (1965), v. RECKLINGHAUSEN (1910) und HEUCK (1961—1966) beschrieben wurden. BÉLANGER prägte für die von ihm beobachteten Veränderungen um die Knochenzelle den Ausdruck „periosteocytäre Osteolyse“, da er mit histologischen und histochemischen Methoden auch einen Abbau organischer Grundsubstanz um die Zelle nachweisen konnte. v. RECKLINGHAUSEN beschrieb eine lichtmikroskopisch bei Rachitis und Osteomalacie sichtbare Erweiterung der Höhle von Osteocyten mit gleichzeitiger Nekrobiose der Zelle unter dem Namen „Onkose“. Er nahm an, daß die Onkose Ausdruck einer Aktivität der Zellen im Calciumstoffwechsel sei; diese Vorstellungen über die Onkose sowie die Lokalisation dieser Veränderung wurden später von der Genfer Schule (s. KIND, 1950/51) aufgegriffen und eingehend diskutiert. Auch BÉLANGER vertrat die Auffassung, daß die periosteocytäre Osteolyse Folge einer Stoffwechselaktivität der Zelle sei. Einer von uns (HEUCK, 1961) konnte bei Untersuchungen menschlicher Osteopathien zeigen, daß die Osteocyten auf die lokalen Vorgänge der Mineralisation und Demineralisation einen richtungsweisenenden Einfluß ausüben.

Diese Vorstellungen erhalten durch unsere Befunde in der Mucopolysaccharidscheide der Osteocyten eine weitere, sehr wesentliche Stütze: Das in der Zellscheide nachgewiesene, aus feinen Nadeln bestehende Material entspricht in seiner Struktur den Ablagerungen, die von anderen Autoren (DUDLEY et al., 1961; HANCOX et al., 1962; COOPER et al., 1966; ROHR et al., 1967) zwischen den Mikrovilli und im Zellinneren von Osteoklasten gefunden und als Calciumsalz angesprochen wurden. Wir halten diese feinen Partikel gleichfalls für Calcium und schließen daher aus unseren Befunden, daß die Osteocyten am Mineralstoffwechsel teilnehmen: Wird der Stoffwechsel — wie in unserem Experiment — über das physiologische Maß gesteigert, so mobilisieren die Osteocyten in ihrer Umgebung Calcium in solcher Menge, daß es morphologisch in der Zellscheide nachweisbar wird. Die Oberfläche der an die Osteocytenhöhlen und die Knochenkanälchen grenzenden Grundsubstanz ist außerordentlich groß; BAUD (1962) gab sie mit $250 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ Knochensubstanz an. Sie ermöglicht daher eine schnelle Mobilisation, ohne daß organische Grundsubstanz aufgelöst werden müßte. Diese Stoffwechselvorgänge laufen nach den Vorstellungen von WASSERMANN et al. (1965) in der den Osteocyten und seine Ausläufer umgebenden Mucopolysaccharidscheide ab, was durch unsere elektronenmikroskopischen Befunde bestätigt wird.

Unsere elektronenmikroskopischen Bilder zeigen die gleiche Feinstruktur der Osteocyten, wie sie von anderen Autoren dargestellt wurde (ROBINSON et al., 1958; DUDLEY et al., 1961; BAUD et al., 1962; WASSERMANN et al., 1965). Zu der Kontroverse über die Faserstruktur der unmittelbar an die Osteocytentöhle grenzenden Grundsubstanz können wir nicht Stellung nehmen, da wir nur unentkalktes Material untersuchten. An der Grenze zwischen Zellscheide und verkalkter Grundsubstanz fanden wir, wenn der Entkalkungshof stärker ausgeprägt war, als dunklen Saum die von WASSERMANN et al. (1965) beschriebene „osmiophile Lamina“; sie wurde auch von COOPER et al. (1966) beschrieben und von DUDLEY et al. (1961) abgebildet. WASSERMANN et al. waren nicht sicher, ob es sich um eine eigene Struktur handele, und BAUD et al. (1963) faßten sie als ein Artefakt auf. Die von uns fast immer beobachteten feinen Fibrillen in der Mucopolysaccharidscheide wurden auch von BAUD et al. (1962) und WASSERMANN et al. (1965) beschrieben, wogegen DUDLEY et al. (1961) die Zellscheide faserfrei fanden.

Literatur

- AUBERT, J.-P. et G. MILHAUD: Méthode de mesure des principales voies du métabolisme calcique chez l'homme. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **39**, 122—139 (1960).
- BAUD, C. A.: Morphologie et structure inframicroscopique des ostéocytes. *Acta anat. (Basel)* **51**, 209—225 (1962).
- , and D. H. DUPONT: The fine structure of the osteocytes in the adult compact bone. *5. Intern. Congr. Electron Microscopy 1962*, Q.Q.10.
- et P. W. MORGENTHALER: Structure submicroscopique du rebord lacuno-canaliculaire osseux. *Morph. Jb.* **104**, 476—486 (1963).
- BÉLANGER, L. F., T. SEMBA, S. TOLNAI, D. H. COPP, L. KROOK, and C. GRIES: The two faces of resorption. *Proc. 3. Europ. Symp. on Calcified Tissues*, p. 1—10. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.
- BOOTHROYD, B.: The problem of demineralisation in thin sections of fully calcified bone. *J. Cell Biol.* **20**, 165—173 (1964).
- BRAND, T. v., F. HOLTZ u. W. PUTSCHAR: Vergleichende pharmakologische Untersuchungen über Calcinozefaktor und Nebenschilddrüsenhormon. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **167**, 113—145 (1932).
- COOPER, R. R., J. W. MILGRAM, and R. A. ROBINSON: Morphology of the osteon: an electron microscopic study. *J. Bone Jt Surg.* **48 A**, 1239—1271 (1966).
- DUDLEY, H. R., and D. SPIRO: The fine structure of bone cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 627—649 (1961).
- EGER, W. u. G. TITZE: Die Epithelkörperchen, Vitamin D und A.T. 10 und die Beziehungen zu den Knochen. *Klin. Wschr.* **21**, 859—862 (1942).
- HANCOX, N. M., and B. BOOTHROYD: Structure-function relationships in the osteoclast. In: *Mechanisms of hard tissue destruction* (R. F. SOGNNAES, ed.), p. 497—512. Washington: A.A.A.S. 1962.
- HEUCK, F.: Zur Topographie des mobilen Kalzium im Knochen. *Acta histochem. (Jena)*, Suppl. **3**, 57—62 (1961).
- Neue Ergebnisse der Mikroradiographie bei Systemerkrankungen des Skelets. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **71**, 597—607 (1965).
- The osteolytic action of the osteocytes in disorders of bone metabolism. *4. Europ. Symp. on Calcified Tissues*, Leiden 1966, Abstr. 38.
- KIND, H.: Studien zur Frage der Osteolyse. *Beitr. path. Anat.* **111**, 283—312 (1950/51).
- LENEL, R.: Experimentelle Untersuchungen über die A.T.10-Vergiftung der Ratte. Frankfurt. Z. Path. **56**, 31—58 (1941).
- RECKLINGHAUSEN, F. v.: Untersuchungen über Rachitis und Osteomalacie. Jena: Gustav Fischer 1910.

- REMAGEN, W.: Influence of dihydrotachysterol (AT 10) on the calcium metabolism of the normal and the parathyroidectomized rat; kinetic analysis. Proc. 5ème Symp. Europ. sur les Tissus Calcifiés. Bordeaux 1967 (im Druck).
- Vergleichende Untersuchungen der Calciumkinetik und der Knochenmorphologie am Modell des mit Dihydrotachysterin gesteigerten Calciumstoffwechsels der Ratte. Habil.-Schr. 1968 (im Druck).
- ROBINSON, R. A., and D. A. CAMERON: Electron microscopy of the primary spongiosa of the metaphysis at the distal end of the femur in the newborn infant. J. Bone Jt Surg. **40** A, 687—697 (1958).
- ROHR, H. P. u. B. BREMER: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Parathormons am Knochen. Virchows Arch. path. Anat. **342**, 50—60 (1967).
- WAGNER, H.: Präsenile Osteoporose. Physiologie des Knochenumbaus und Messung der Spongiosadichte. Stuttgart: Georg Thieme 1965.
- WASSERMANN, F., and J. A. YAEGER: Fine structure of the osteocyte capsule and of the wall of the lacunae in bone. Z. Zellforsch. **67**, 636—652 (1965).

Priv.-Doz. Dr. W. REMAGEN
Pathologisches Institut der Universität
2300 Kiel, Hospitalstr. 42