

Morphometrische, elektronenmikroskopische und physikalisch-chemische Untersuchungen über die experimentelle Osteoporose bei chronischer Acidose*

Günter Delling und Karl Donath

Pathologisches Institut der Universität, Hamburg

Eingegangen am 6. November 1972

Morphometric, Electron Microscopic and Physico-Chemical Investigation in Experimental Osteoporosis Induced by Chronic Acidosis in the Rat

Summary. 10 parathyroidintact (INT) and 10 parathyroidectomized (PTX) rats received 2% ammoniumchlorid in drinking water in a 6 weeks' experiment. 10 INT and 10 PTX animals served as untreated controls. For determination of the volume and the surfaces of the spongy bone the tibia metaphysis was undecalcified prepared for microscopic examination. These sections were determined with a special integration eyepiece independent of direction. In addition, some physico-chemical properties of the femur such as density, ash and calcium content were measured. By electron microscopy the structure of the osteocytes as well as of the periosteocytic matrix was investigated.

Chronic acidosis causes in the same manner in parathyroidintact and parathyroidectomized animals an osteoporosis due to increased osteoclastic resorption. The volume and the surface extent of the osteoid, however, remained unchanged. Ash and calcium content per dry volume and per fat free substance of the femur were decreased after treatment with ammoniumchlorid. In electron microscopy the osteocytes showed an increased number of cell organelles and a demineralization of the surrounding matrix. Increased osteocytic osteolysis in chronic acidosis induces a higher removal of bone mineral than resorption of the organic components of bone. The observed bone changes are independent of the presence of functioning parathyroid glands. Thus can be concluded that in this experimental model chronic acidosis mimics the effect of parathyroid hormone on bone resorption. The relation of parathyroid hormone to the acid-base balance of the organism is discussed.

Zusammenfassung. Bei 10 epithelkörperchenintakten und bei 10 parathyreidektomierten Ratten wurde durch Ammoniumchloridgabe im Trinkwasser in einem 6wöchigen Versuch eine chronische Acidose erzeugt. Je 10 epithelkörperchenintakte und parathyreidektomierte Ratten dienten als Kontrollen. Zur Bestimmung der Oberflächen- und Volumenanteile der Spongiosa wurden die Tibiametaphysen unentkalkt histologisch aufgearbeitet und mit einem richtungsunabhängigen Punktzählverfahren quantitativ ausgewertet. Von den Femora wurden physikalisch-chemische Knocheneigenschaften bestimmt (Dichte, Aschgehalt, Calciumgehalt). Elektronenmikroskopisch erfolgte außerdem die Beurteilung der Struktur der Osteocyten und der periosteocytären Matrix.

Die chronische Acidose erzeugt in gleicher Weise bei den epithelkörperchenintakten und parathyreidektomierten Tieren eine Osteoporose mit gesteigerter osteoklastärer und osteocytärer Resorption. Das Osteoid bleibt in seinem Volumen und in seiner Oberflächenausdehnung unbeeinflusst. Durch eine erhöhte osteocytäre Osteolyse kommt es zu einer starken Demineralisation bei teilweise erhaltener organischer Knochenmatrix. Die Veränderungen treten unabhängig von der Anwesenheit funktionierender Epithelkörperchen auf. Der Wirkmechanismus des Parathormons auf das Knochen system und den Säure-Basenhaushalt wird diskutiert.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Das Skeletsystem stellt durch seinen hohen Gehalt an Phosphaten ein beträchtliches Reservoir von Pufferanionen dar (Raaflaub, 1961). Eine Änderung des physiologischen pH-Wertes im Serum auf acidotische Werte bewirkt eine Mobilisierung von Phosphaten und somit auch von Calcium aus dem Knochen. Gleichzeitig wird aber auch der organische Knochenanteil, d.h. Kollagen und Grundsubstanz gelöst, so daß eine Osteoporose entsteht (Barzel, 1969; Barzel and Jowsey, 1969). Für die Regulation des Säure-Basenhaushaltes wird ein entscheidender Einfluß der Epithelkörperchen diskutiert (Wills, 1970; Barzel, 1970). Ob bei einer chronischen Acidose auch ohne funktionierende Epithelkörperchen osteoporotische Skeletveränderungen, wie sie von Barzel (1969) beschrieben wurden, entstehen können, ist bisher noch ungeklärt.

Wir untersuchten deshalb den Einfluß einer chronischen Acidose auf das Skelet an epithelkörperchenintakten und parathyreoidektomierten Ratten.

Material und Methoden

Als Versuchstiere wurden 40 weibliche, 180 g schwere Wistar-Ratten verwendet, die eine Laborkost (Altromin) mit einem Calciumgehalt von 1 g/kg und einem Vitamin D-Gehalt von 2000 IU/kg erhielten. 10 epithelkörperchenintakte (Gruppe A: INT) und 10 parathyreoidektomierte Ratten (Gruppe B: PTX) erhielten Leitungswasser mit einem Calciumgehalt von 4–6 mg/100 ml ad libitum. Bei weiteren 10 epithelkörperchenintakten (Gruppe C: INT+ NH_4Cl) und 10 parathyreoidektomierten (Gruppe D: PTX+ NH_4Cl) Tieren wurden dem Trinkwasser 2% Ammoniumchlorid (NH_4Cl) zugesetzt. Die Parathyreoidektomie erfolgte durch Elektrokauterisation. Zur Markierung des Skelets erhielten alle Versuchstiere am Anfang und 4 Tage vor Ende des sechswöchigen Versuches 5 mg Tetracyclin pro 100 g Körpergewicht. Nach Tötung der Tiere wurden die Femora und die Tibiae beider Seiten excidiert. Von der proximalen Tibiametaphyse der rechten und linken Seite wurden von 6 unausgewählten Tieren je 3 unentkalkte Schnitte sowie ein Schliffpräparat nach vorheriger Einbettung in Methacrylat (Delling, 1972) hergestellt. Mit einem richtungsunabhängigen Integrationsocular (Merz, 1967) wurden die volumetrische Spongiosadichte, das Osteoidvolumen, die Oberflächendichte, die spezifische Trabekeloberfläche sowie die prozentualen Oberflächenanteile des Osteoids, der Howshipschen Lacunen und der neutralen Spongiosaoberfläche bestimmt. Zusätzlich wurde der Osteoclastenindex errechnet. Die Messungen erfolgten in einem ca. 15 mm² großen Areal 0,5 mm distal der Eröffnungszone. Dabei wurde so vorgegangen, daß bei einer 127fachen Vergrößerung 15 Teilfelder ausgewertet wurden. Die Meßergebnisse der drei Schnitte jeder Seite wurden zu einem Mittelwert zusammengefaßt. An den Schliffpräparaten wurde lediglich die Einlagerung des Tetracyclins beurteilt.

Vom rechten und linken Femur aller Tiere wurden physikalisch-chemische Knocheneigenschaften wie folgt bestimmt. Nach der Excision der Femora erfolgte eine schonende Entfernung der Weichteile mit einem Skalpell, nachdem die Knochen für 3 min in 90° C heißem Aqua bidest. gelegen hatten. Darauf folgte eine 24stündige Rehydrierung im Vakuum (Wasserstrahlpumpe). Die Knochen wurden dann in Wasser bei 4° C gewogen, in stets gleicher Weise abgetrocknet und erneut (in Luft) gewogen. Die Differenz des Gewichtes in Luft und in Wasser entspricht nach dem Archimedischen Prinzip dem Auftrieb. Da die Dichte von Wasser bei 4° C 1 ist, ergibt sich aus dem Auftrieb das Volumen des Femur. Der Knochen wurde dann bei 105° C 10 Tage bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichtes erfolgte eine 3tägige Entfettung in einem Gemisch aus Aceton und Alkohol (1:1). Nach erneuter Wägung wurden die Knochen bei 600° C 12 Stunden verascht. Nach Ermittlung des Aschgewichtes wurde der Calciumgehalt durch komplexometrische Titration mit EDTA gegen Calconcarbonsäure nach vorheriger Auflösung in 5 ml 6*N*-Salzsäure bestimmt (Merck, 1964; Bellwinkel, Delling und Ziegler, 1972). Alle Meßwerte wurden auf Lochkarten übertragen und die Relativwerte, d.h. die hydratisierte Dichte, die Trockendichte, der Asch- und Calciumgehalt pro Trockengewicht und Femurmatrix (Gewicht des getrockneten und entfetteten Femur abzüglich des Aschgewichtes) mit einem Computerprogramm errechnet.

Bei 4 Tieren aus jeder Gruppe wurde die Tibia mit einem Glutaraldehyd-Cacodylatpuffer-Gemisch 10 min perfundiert. Anschließend erfolgte die Excision des Knochens. Die Corticalis wurde in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von einem Millimeter geschnitten und weitere 2 Std immersionsfixiert. Nach Einbettung in Epon 812 und Anfertigung unentkalkter Feinschnitte (Donath und Delling, 1971) erfolgte die Auswertung am Elektronenmikroskop Philips EM 300.

Ergebnisse

Die *Gewichtszunahme* betrug bei den Kontrolltieren in Gruppe A: INT $32,5 \pm 13$ g und in Gruppe B: PTX $33,6 \pm 20$ g. Bei den ammoniumchloridbehandelten Tieren trat dagegen ein Gewichtsverlust von 8 ± 16 g in Gruppe C: INT + NH_4Cl und von 23 ± 18 g in Gruppe D: PTX + NH_4Cl ein. Die Serumcalciumwerte (gemessen mit Flammenphotometer Eppendorf) ergaben zwischen den epithelkörperchenintakten (Gruppe A: INT $5,6 \pm 0,3$ mval/l und Gruppe C: INT + NH_4Cl $5,7 \pm 0,3$ mval/l) und zwischen den parathyreoidektomierten Tieren (Gruppe B: PTX $2,9 \pm 0,4$ mval/l und Gruppe C: PTX + NH_4Cl $2,8 \pm 0,3$ mval/l) am Ende des Versuches keine signifikanten Unterschiede.

Histologisch bestand bei beiden ammoniumchloridbehandelten Gruppen in der proximalen Tibiametaphyse eine beträchtliche Verminderung der Spongiosa (s. Abb. 1). Die Zahl der Osteoclasten war in gleicher Weise bei den epithelkörperchenintakten und parathyreoidektomierten Tieren nach Ammoniumchloridgabe erhöht. Die volumetrische Spongiosadichte, die spezifische Trabekeloberfläche und die Oberflächendichte sind unabhängig von der Anwesenheit der Epithelkörperchen in typischer Weise wie bei einer Osteoporose verändert (s. Tabelle 1). Die Gesamtresorptionsfläche (Howshipsche Lacunen mit und ohne Osteoclasten) ist nach chronischer Acidose in Gruppe C: INT + NH_4Cl und Gruppe D: PTX + NH_4Cl signifikant erhöht. Die Ausdehnung der osteoiden Säume bleibt jedoch unverändert (s. Tabelle 2). Die Osteoidsaumbreite ist im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht. Im UV-Licht ist in allen Gruppen eine scharf begrenzte Tetracyclinfluoreszenz im Bereich der Mineralisationsfront der osteoiden Säume nachweisbar.

Elektronenmikroskopisch ist die Wand der Osteocytenlacunen der ammoniumchloridbehandelten Tiere unscharf begrenzt. Die Lacune scheint im Durchschnitt größer zu sein. Im Cytoplasma und im Lacunenbinnenraum treten vermehrt membranbegrenzte Vesikel auf. Die Mitochondrien, auch der zentral gelegenen Osteocyten, sind vermehrt (Abb. 2). Eine erheblich erweiterte Lakune mit starker Aufsplitterung der Lacunenwand ist besonders bei Gruppe D: PTX + NH_4Cl zu beobachten. Nach Schnittentkalkung (Donath und Delling, 1971) ist die osmiophile Grenzzone der Lacunenwand bei den ammoniumchloridbehandelten Tieren nur noch bruchstückweise ausgebildet. Im Cytoplasma und in lipidhaltigen Vacuolen liegen unterschiedlich große, strahlendichte Kristalle (Abb. 3). Eine Mitochondrienvermehrung konnte bei diesen Osteocyten jedoch nur vereinzelt beobachtet werden.

Die Veränderungen der physikalisch-chemischen Skeleteigenschaften sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Dichten (hydratisiert und getrocknet) sind nach Ammoniumchloridgabe in Gruppe C: INT + NH_4Cl und Gruppe D: PTX + NH_4Cl signifikant erniedrigt. Die Unterschiede zwischen Gruppe A: INT und Gruppe B: PTX beruhen auf einem anderen Prozeß und werden an anderer Stelle diskutiert (Delling, Schulz und Donath, 1972). Der Mineral- und Calciumgehalt pro Femurtrockenvolumen bzw. Femurmatrix ist ebenfalls in beiden ammoniumchloridbe-

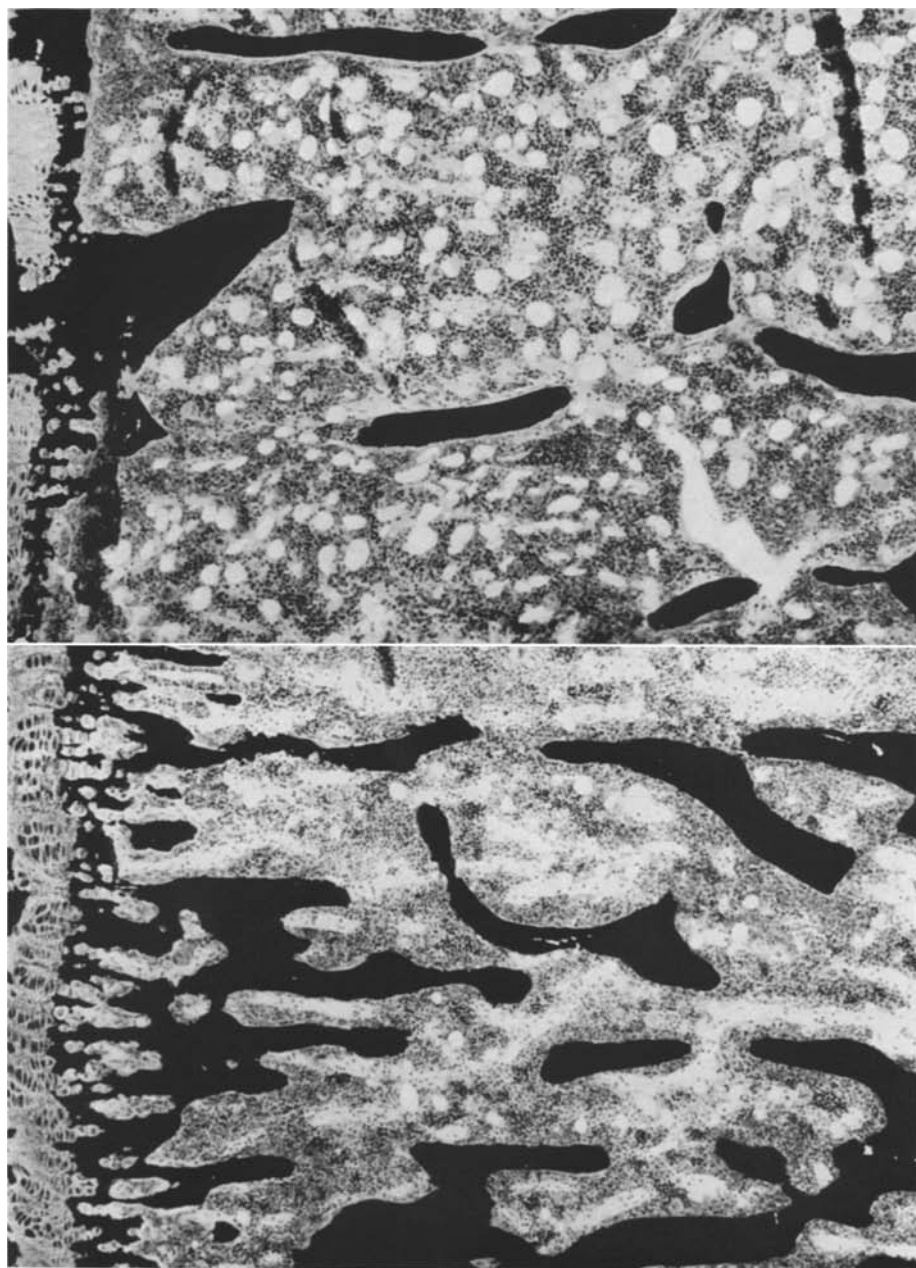


Abb. 1. Osteoporose durch chronische Acidose. Ausschnitt aus der proximalen Tibiametaphyse. Linke Bildhälfte: unbehandelte Kontrolltiere, Rechte Bildhälfte: Spongiosarefizierung nach 6wöchiger Ammoniumchloridgabe, Kossa (unentkalkt), $75\times$

Tabelle 1. Quantitative Veränderungen der Spongiosa gemessen an der proximalen Tibiametaphyse nach 6wöchiger chronischer Acidose bei epithelkörperchenintakten (INT) und parathyreoidektomierten (PTX) Ratten

Gruppe	Tierzahl (n)	Vol. Spongiosadichte	Osteoidvolumen	Spezifische Oberfläche	Oberflächendichte
		mm ³ /mm ³ Gesamtknochengewebe	mm ³ /mm ³ Gesamt-knochen-	mm ² /mm ³ Spongiosa	mm ² /mm ³ Gesamt-knochengewebe
A: INT	6	0,317 ± 0,040	0,008 ± 0,003	39,4 ± 4,4	12443 ± 1491
B: PTX	6	0,300 ± 0,052	0,007 ± 0,003	40,0 ± 3,9	11373 ± 1280
C: INT +NH ₄ Cl	6	0,157 ± 0,039	0,008 ± 0,005	52,8 ± 7,1	8263 ± 1414
D: PTX +NH ₄ Cl	6	0,201 ± 0,031	0,007 ± 0,004	46,2 ± 6,3	8720 ± 893
t-Test (p)	A: B	>0,25 n.s.	>0,25 n.s.	>0,4 n.s.	>0,1 n.s.
	A: C	<0,0005	n.s.	<0,0025	<0,0025
	B: D	<0,0025	n.s.	>0,025 n.s.	<0,0025
	C: D	>0,025 n.s.	>0,35 n.s.	>0,05 n.s.	>0,25 n.s.

M ± SD. n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 2. Quantitative Veränderungen der Spongiosaoberflächen sowie des Osteoclastenindex gemessen an der proximalen Tibiametaphyse nach 6wöchiger chronischer Acidose bei epithelkörperchenintakten (INT) und parathyreoidektomierten (PTX) Ratten

Gruppe	Tierzahl (n)	Osteoid	Howshipsche Lacunen	Neutrale Oberfläche	Osteoclastenindex (Osteoclasten/ OFD ^a)
			(% der Gesamt-spongiosa- oberfläche)		
A: INT	6	26,3 ± 5,8	16,4 ± 4,2	61,6 ± 11,8	276 ± 80
B: PTX	6	18,8 ± 7,2	14,0 ± 6,8	67,2 ± 9,8	140 ± 43
C: INT +NH ₄ Cl	6	26,2 ± 12,4	25,4 ± 4,9	39,7 ± 5,7	431 ± 97
D: PTX +NH ₄ Cl	6	25,4 ± 10,3	24,9 ± 5,2	43,4 ± 6,3	458 ± 98
t-Test (p)	A: B	>0,025 n.s.	>0,2 n.s.	>0,15 n.s.	<0,0025
	A: C	>0,45 n.s.	<0,005	<0,0005	<0,02
	B: D	>0,2 n.s.	<0,01	<0,0005	<0,0005
	C: D	>0,2 n.s.	>0,5 n.s.	>0,025 n.s.	>0,25 n.s.

M ± SD. n.s. = nicht signifikant.

^a OFD = Oberflächendichte

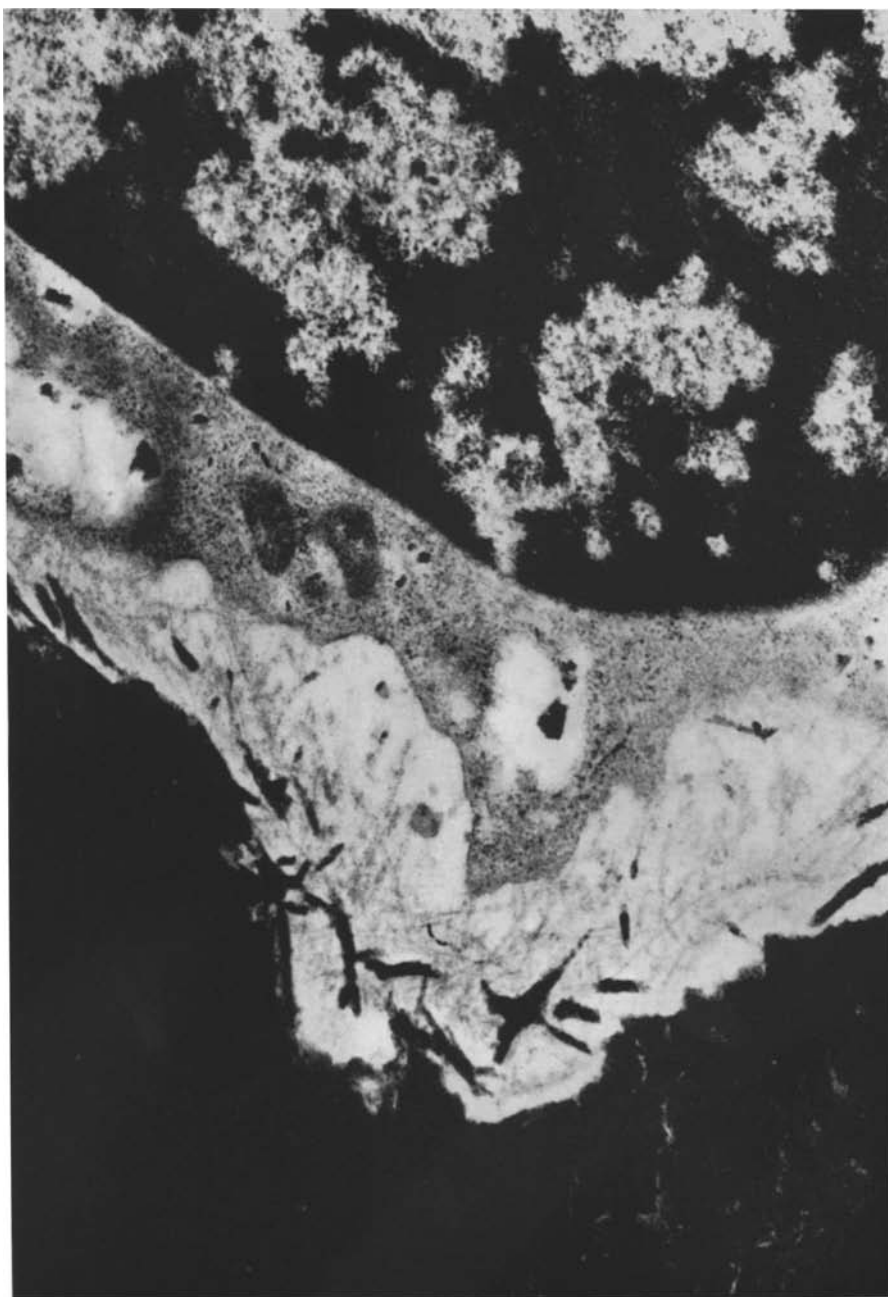


Abb. 2. Osteocyt eines epithelkörperchenintakten Tieres nach chronischer Acidose. Aufsplitterung der Lacunenwand und demineralisierte Kollagenfasern. In den Vacuolen des Cytoplasmas mineralisierte Bruchstücke. Perfusionsfixation, Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat. 75000 \times

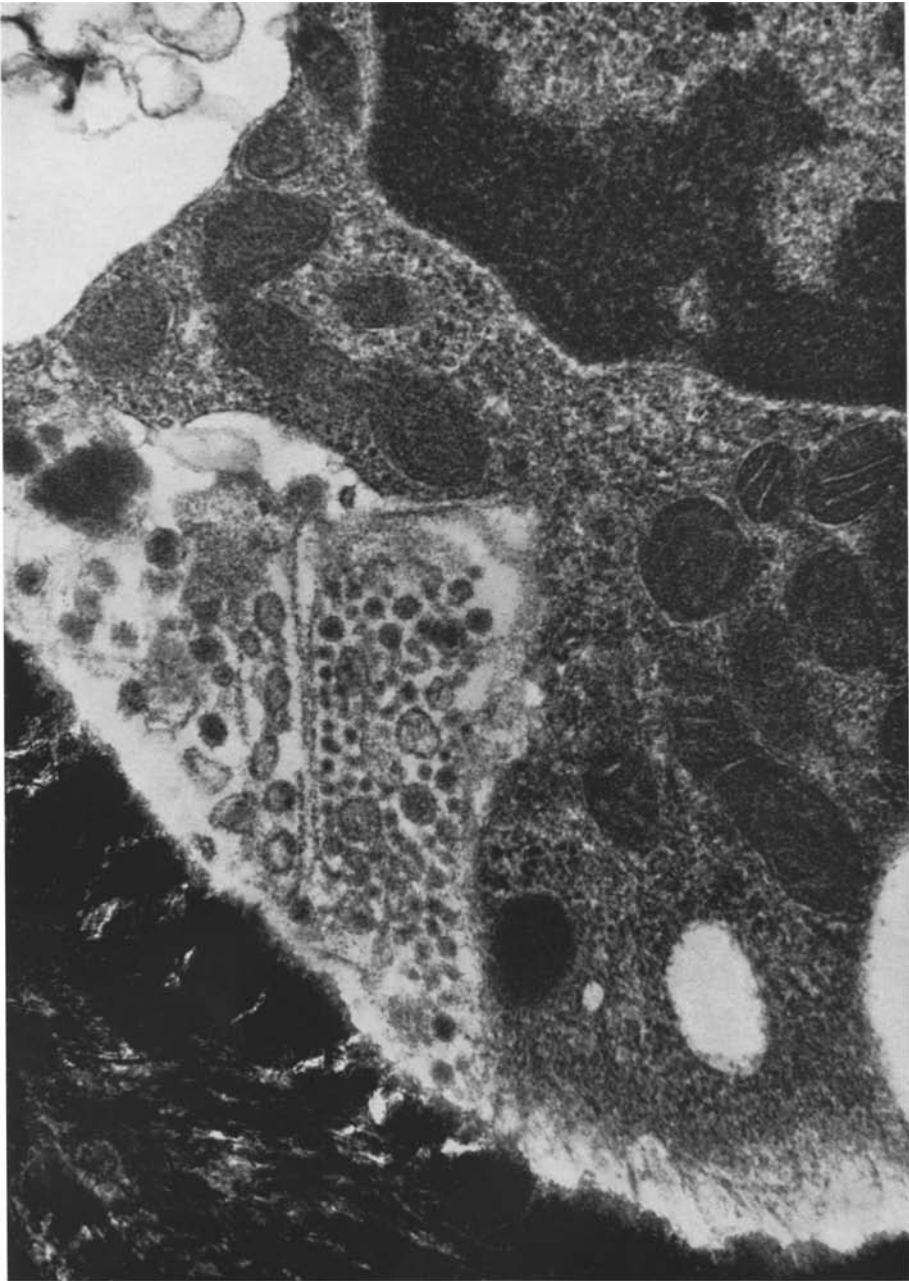


Abb. 3. Osteocyt eines epithelkörperchenintakten Tieres nach chronischer Acidose. Zahlreiche membranbegrenzte Vesicel zwischen Lacunenwand und Cytoplasma. Im Cytoplasma reichlich Mitochondrien. Perfusionsfixation, Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat.

73600×

Tabelle 3. Veränderungen der physikalisch-chemischen Knocheneigenschaften des Femur nach 6wöchiger chronischer Acidose bei epithelkörperchenintakten (INT) und parathyreoidektomierten (PTX) Ratten

Gruppe	Anzahl (n)	Dichte _{hydr} mg/mm ³	Dichte _{tr.} mg/mm ³	Asche/ Volumen _{tr.} mg/100 mm ³	Calcium/organ. Substanz mg/100 mg
A: INT	14	1,60 ± 0,01	2,35 ± 0,03	160,9 ± 3,1	80,5 ± 5,0
B: PTX	14	1,56 ± 0,02	2,28 ± 0,08	153,2 ± 9,1	78,6 ± 5,1
C: INT +NH ₄ Cl	18	1,55 ± 0,08	2,17 ± 0,06	139,5 ± 1,8	66,7 ± 8,8
D: PTX +NH ₄ Cl	18	1,54 ± 0,03	2,14 ± 0,05	137,2 ± 5,2	72,9 ± 5,9
A:B		<0,0005	<0,005	<0,005	<0,005
A:C		<0,025	<0,0005	<0,0005	<0,0005
B:D		<0,025	<0,0005	<0,0005	<0,005
C:D		>0,3 n.s.	>0,05 n.s.	>0,025 n.s.	<0,01

handelten Gruppen signifikant erniedrigt. Der prozentuale Calciumgehalt der Knochenasche ist dagegen unverändert geblieben.

Diskussion

Durch Ammoniumchloridgabe kommt es zur Acidose (Goto, 1918; Dennig, Dill und Talbott, 1929; Lennon, 1969). Diese Acidose beeinflußt den Calciumhaushalt des Säugetierorganismus. Albright und Reifenstein (1948) sowie Cochran und Nordin (1969) vermuteten, daß die Skeletveränderungen bei azotämischen Nierenerkrankungen durch die Änderung des pH-Wertes bedingt seien. Ein wesentlicher Einfluß der Acidose für die Entstehung der renalen Osteopathie wurde jedoch von zahlreichen Untersuchern verneint (Stanbury, 1968; Lennon, 1969; Barzel, 1969; Ritz, Andrassy, Krempien und Keller, 1971; Ritz, Sieberth und Krempien, 1971; Krempien, 1972).

Barzel (1969) sowie Barzel und Jowsey (1969) beobachteten bei epithelkörperchenintakten Ratten nach Ammoniumchloridgabe (2% im Trinkwasser) eine Osteoporose mit gesteigerter Knochenresorption. Skeletmineral und organische Substanz des Knochens wurden dabei zu gleichen Teilen resorbiert. Im eigenen Versuch entstand ebenfalls durch eine gesteigerte osteoklastäre Resorption eine Osteoporose. Die Resorption von Mineral- und organischem Skeletanteil zu gleichen Teilen konnten wir jedoch nicht beobachten, da der Asch- und Calciumgehalt des Femurs in Beziehung zum Trockenvolumen und zur organischen Matrix in Gruppe C: INT+NH₄Cl und Gruppe D: PTX+NH₄Cl reduziert ist. Es wurde also unter den von uns gewählten Bedingungen mehr Mineral als organische Matrix resorbiert. Der Calciumanteil der Femurasche änderte sich dagegen nicht, so daß eine gleiche Mobilisation von Calcium und Phosphat angenommen werden kann. Die Parathyreoidektomie kann die Entwicklung der Osteoporose nach chronischer Acidose nicht verhindern. Dies zeigt, daß die bei Ammoniumchloridgabe auftretenden Kno-

chenveränderungen nicht durch eine Stimulation der Epithelkörperchen bedingt sind. Die Untermineralisation des Knochens entspricht der elektronenmikroskopisch nachweisbaren gesteigerten osteocytären Osteolyse. Die gesteigerte osteoklastäre und osteocytäre Resorption treten in nahezu gleicher Weise bei den epithelkörperchenintakten und parathyreoidektomierten Tieren auf. Auch dieser Befund spricht gegen eine sekundäre Stimulation der Epithelkörperchen durch eine chronische Acidose. Da die verwendete Laborkost ausreichend Calcium enthielt, muß eine direkte Beeinflussung des Knochenzellstoffwechsels durch die Acidose angenommen werden. Die Wirkung von Parathormon am Knochen erfolgt u.a. durch eine Erhöhung der H^+ -Konzentration zwischen Knochenzelle und Knochenoberfläche (Waite and Kenny, 1969). Wills (1970, 1971) hält die Rolle der Epithelkörperchen in der Regulation des Säure-Basenhaushaltes für wesentlicher als die für den Calciumhaushalt. Barzel (1969a, 1971) beobachtete bei Patienten mit Hypoparathyreoidismus eine Alkalose, die durch die fehlende Parathormonsekretion und eine damit verbundene reduzierte H^+ -Bildung und Ausscheidung bedingt sein soll. Andererseits kommt es nach Parathormongabe zu einer Acidose (Hellmann, Au und Bartter, 1965; Brehme und Gyorgy, 1927). Kaplan, Hill, Locke und Peskin (1971) fanden nach Erzeugung einer Alkalose eine vermehrte, radioimmunologisch meßbare Parathormonsekretion. Lemann, Litzow und Lennon (1967) konnten einen Anstieg des ultrafiltrablen Calciums nach Ammoniumchloridgabe bei gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Hypoparathyreoidismus nachweisen. Durch diesen Anstieg wird die endogene Parathormonsekretion reduziert. Diese Befunde zeigen, daß die experimentelle Acidose den Wirkmechanismus von Parathormon am Skelet wahrscheinlich über eine lokale H^+ -Anreicherung nachahmt. Eine Stimulierung der Epithelkörperchen ist aufgrund der radioimmunologischen Parathormonsekretionsstudien nicht zu erwarten. Die in gleicher Weise nach Ammoniumchloridgabe auftretenden Veränderungen bei den parathyreoidektomierten Tieren unseres Versuches bestätigen diese Befunde. Die beschriebenen osteoporotischen Skeletveränderungen haben jedoch keine Ähnlichkeit mit der renalen Osteopathie, bei der in der Regel eine Vielzahl anderer Faktoren (Vitamin D-Stoffwechselstörung, sekundärer Hyperparathyreoidismus) eine dominierende Rolle spielen. Die ammoniumchloridinduzierte Osteoporose stellt ein reproduzierbares Modell dar, um eine gesteigerte Knochenresorption durch Hormone, wie z.B. Calcitonin (Delling, 1972a), zu beeinflussen und auf ihre therapeutische Anwendbarkeit bei osteolytischen Prozessen zu prüfen.

Fräulein E. Brossmann und Frau H. Storek sind wir für die sorgfältige technische Assistenz bei der Anfertigung der histologischen und elektronenmikroskopischen Präparate zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

- Albright, F., Reifenstein, E. C.: The parathyroid glands and metabolic bone disease: selected studies, p. 242. Baltimore: Williams & Wilkins 1948.
 Barzel, U. S.: The effect of excessive acid feeding on bone. *Calcif. Tiss. Res.* **4**, 94—100 (1969a).
 Barzel, U. S.: Systemic alkalosis in hypoparathyroidism. *J. clin. Endocr.* **29**, 917—918 (1969b).
 Barzel, U. S.: Role of parathyroid hormone in acid-base homeostasis. *Lancet*, 1970 I, 1363.
 Barzel, U. S.: Parathyroid hormone, blood phosphorus, and acid-base metabolism. *Lancet*, 1971 I, 1329—1331.

- Barzel, U. S., Jowsey, J.: The effect of chronic acid and alkali administration on bone turnover in adult rats. *Clin. Sci.* **36**, 517—524 (1969).
- Bellwinkel, S., Delling, G., Ziegler, R.: Der Einfluß von Calcitonin auf die experimentelle Osteoporose bei der Ratte. *Z. ges. exp. Med.* **156**, 259—267 (1971).
- Brehme, Th., Gyorgy, P.: Stoffwechselwirkung und klinische Verwendbarkeit des Epithelkörperchenhormons (Collip). *Jb. Kinderheilk.* **118**, 143 (1927).
- Cochran, M., Nordin, B. E. C.: Role of acidosis in renal osteomalacia. *Brit. med. J.* **1969 II**, 276—279.
- Delling, G.: Über eine vereinfachte Methacrylateinbettung zur Herstellung von unentkalkten Knochenschnitten. *Beitr. Path.* **145**, 100—105 (1972a).
- Delling, G.: Effect of calcitonin on increased bone resorption and osteoporotic changes induced by chronic acid feeding in the rat. *Acta endocr. (Kbh.)*, Suppl. **159**, 69 (1972b).
- Delling, G., Schulz, A., Donath, K.: Bone changes following parathyroidectomy in the rat — an electron microscopic, histological and physico-chemical investigation. 9th Symp. Calc. Tiss. Baden/Wien, 1972 (im Druck).
- Dennig, H., Dill, D. B., Talbott, J. H.: Bilanzuntersuchungen einer Salmiakacidose. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* **144**, 297 (1929).
- Donath, K., Delling, G.: Elektronenmikroskopische Darstellung der periosteocytären Matrix durch Ultradünnschnitt-EDTA-Entkalkung. *Virchows Arch. Abt. A* **354**, 305—311 (1971).
- Goto, K.: Mineral metabolism in experimental acidosis. *J. biol. Chem.* **36**, 355—376 (1918).
- Hellmann, D. E., Au, W. Y., Bartter, F. C.: Evidence for a direct effect of parathyroid hormone on urinary acidification. *Amer. J. Physiol.* **209**, 643—662 (1965).
- Kaplan, E. L., Hill, J. B., Locke, S., Peskin, G. W.: Acidbase balance and parathyroid function: Metabolic alkalosis and hyperparathyroidism. *Surgery* **70**, 198—204 (1971).
- Krempien, B.: Über den Einfluß der Niereninsuffizienz auf Knochenneubildung und Knochenresorption. *Virchows Arch. Abt. A* **355**, 354—366 (1972).
- Lemann, J., Jr., Litzow, J. R., Lennon, E. J.: Studies of the mechanism by which chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J. clin. Invest.* **46**, 1318—1334 (1967).
- Lennon, E. J.: Metabolic acidosis. A factor in the pathogenesis of azotemic osteodystrophy? *Arch. intern. Med.* **124**, 557—561 (1969).
- Merck: Komplexometrische Bestimmungsmethoden mit Titriplex. 3. Aufl. Darmstadt: E. Merck AG, 1964.
- Merz, W. A.: Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe. *Mikroskopie* **22**, 132—142 (1967).
- Raaflaub, J.: Nebenschilddrüsen, Knochensystem und Säure-Basen-Haushalt. *Schweiz. med. Wschr.* **48**, 1417—1423 (1961).
- Ritz, E., Andrassy, K., Krempien, B., Keller, U.: Knochenstoffwechsel bei metabolischer Acidose. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **77**, 252—255 (1971).
- Ritz, E., Sieberth, H. G., Krempien, B.: Calcium-Stoffwechselstörungen bei chronischer Niereninsuffizienz. *Klin. Wschr.* **49**, 1305 (1971).
- Stanbury, S. W.: Bone disease in uremia. *Amer. J. Med.* **44**, 714—724 (1968).
- Waite, L. C., Kenny, A. D.: Azetolamide and calcium metabolism in the rat. In: *Calcitonin 1969; Proceedings Second Intern. Symp. London 1969*, p. 442—450, Heinemann 1970.
- Wills, M. R.: Fundamental physiological role of parathyroid hormone in acid-base homeostasis. *Lancet* **1970 II**, 802—804.
- Wills, M. R.: Role of parathyroid hormone in acid-base homeostasis. *Lancet* **1971 II**, 142.

Dr. med. Günter Delling
Pathologisches Institut der Universität
D-2000 Hamburg 20
Martinistr. 52
Bundesrepublik Deutschland