

Die Wirkung einer Calcitonin-Langzeittherapie auf Knochenzellen und Knochenmineralisation bei der Ratte*

Andreas Schulz und Günter Delling

Institut für Pathologie der Universität Hamburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Seifert)

Eingegangen am 5. August 1975

The Effect of Long-Term Calcitonin Administration on Bone Cells and Bone Mineralization in the Rat

Summary. The effect of calcitonin on bone tissue was studied in rat cortical and trabecular bone after long-term treatment. The aim of this study was to get exact data on calcitonin action on bone tissue by histomorphometry.

Histomorphometric analysis of bone alterations was performed using undecalcified longitudinal as well as ground sections of the tibial metaphysis and diaphysis.

In agreement with other authors our experimental results show that calcitonin inhibits bone resorption. This inhibitory effect is not caused by a reduction of the number of osteoclasts but by a reduced cellular resorption activity of osteoclasts. Bone formation is not affected by calcitonin in intact as well as in parathyroidectomized animals. On the contrary bone mineralization is clearly improved under calcitonin administration in parathyroidectomized rats. This favourable effect is probably caused by a direct hormonal influence on calcium transport in the osteoblast.

Key words: Calcitonin — Bone remodelling — Bone mineralization — Histomorphometry.

Zusammenfassung. In einer Langzeitstudie wurde mit quantitativen histologischen Methoden die Wirkung von Calcitonin an der Spongiosa und Corticalis der Ratte untersucht. Neben den Veränderungen des Serumcalciums wurden Art und Ausmaß der Hemmwirkung auf die Knochenresorption, sowie die Beeinflussung der Knochenneubildung und der Knochenmineralisation durch das Hormon beurteilt.

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen anderer Autoren wird die Knochenresorption bei sonst unbehandelten Ratten durch Calcitonin gehemmt. Diese Hemmung ist jedoch nicht durch eine Reduktion der Osteoklastenzahl, sondern durch eine Verminderung der zellulären Resorptionsleistung bedingt. Unter den gewählten Bedingungen beeinflußt Calcitonin nicht die Matrixsynthese der Osteoblasten. Calcitonin fördert aber die Mineralisationsleistung der Osteoblasten bei parathyreidektomierten Ratten, bei denen eine erhebliche Mineralisationsstörung ausgebildet ist. Als Ursache für die verbesserte Mineralisation wird eine direkte hormonale Beeinflussung des Mineraltransports im Osteoblasten angenommen.

Einleitung

Calcitonin wirkt hypocalciämisch und hypophosphatämisch (Hirsch *et al.*, 1964; Raisz *et al.*, 1967; Copp, 1970; Hirsch *et al.*, 1973; Orimo und Hirsch, 1973; Talmage *et al.*, 1973). Die Bedeutung des Hormons für den menschlichen Organismus ist umstritten. Mit verschiedenen Methoden konnte nachgewiesen werden,

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft SFB 34-„Endokrinologie“, Hamburg.

daß Calcitonin die Knochenresorption hemmt (Friedman und Raisz, 1965; Belanger und Rasmussen, 1968; Haddad und Avioli, 1970; Kallio *et al.*, 1972). Unterschiedliche Auffassungen bestehen allerdings über die Art der Calcitoninwirkung auf die Knochenresorption. In früheren Untersuchungen wurde angenommen, daß die Zahl der Osteoclasten verringert wird (Foster *et al.*, 1966; Matrajt-Denys *et al.*, 1971). Andererseits zeigen neuere Arbeiten, daß Calcitonin offenbar nur die Osteoclastenaktivität hemmt (Zichner, 1974; Weisbrode und Capen, 1974).

Da in der Regel keine isolierte Beeinflussung einer Knochenzelle, sondern des gesamten Knochenzellsystems (Mesenchymzelle, Osteoblast, Osteocyt, Osteoclast) erfolgt, wird ein Einfluß des Calcitonins auch auf die Knochenneubildung und Knochenmineralisation diskutiert. Ein erhöhter Knochenanbau wurde nach Calcitoningespritzung im Tierversuch beobachtet (Matrajt *et al.*, 1968; van Nguyen und Jowsey, 1970), der ebenfalls bei lokalen Knochenumbauprozessen (Delling und Glückselig, 1971; Delling *et al.*, 1970) und extraossären Knochenmatrix-implantaten (Thompson und Urist, 1973) sowie in der Gewebekultur (Reynolds, 1968; Reynolds und Minkin, 1969; Reynolds und Dingle, 1970) nachweisbar war. Andere Untersucher konnten dagegen diesen Calcitonineffekt weder *in vitro* (Flanagan und Nichols, 1975) noch am intakten Tiermodell (Bellwinkel *et al.*, 1971; Russel *et al.*, 1973) bestätigen.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse veranlaßten uns daher, eine experimentelle Untersuchung mit folgenden Voraussetzungen durchzuführen:

1. Verwendung verschiedener Calcitonindosierungen über einen langen Zeitraum, um eine Anpassung der Knochenzellen zu gewährleisten.
2. Die auftretenden Skeletveränderungen sollten quantitativ getrennt nach den Veränderungen an der Corticalis und Spongiosa ausgewertet werden.
3. Da die Knochenmineralisation einen wesentlichen Teilprozess des Knochenumbaus darstellt, sollte der Einfluß des Hormons auf eine verzögert ablaufende Mineralisation beim Hypoparathyreoidismus gesondert geprüft werden.

Material und Methoden

60 weibliche Ratten (Wistar CFN) mit einem Körpergewicht von 150 g wurden in 6 Gruppen geteilt. 30 Tiere wurden durch Elektroauterisation parathyreidektomiert. Es wurden nur solche Tiere als parathyreidektomierte verwendet, deren Serumcalcium am 3. postoperativen Tag nach 24stündigem Hungern unter 2.5 mval/l lag. 10 Epithelkörperchenintakte (INT) und 10 parathyreidektomierte (PTX) Ratten dienten als Kontrollen. 10 INT und 10 PTX Ratten erhielten 2mal 30 mE (MRC) Calcitonin täglich im Abstand von 12 Std. 10 weitere INT und PTX Ratten erhielten jeweils 2mal 200 mE (MRC) Calcitonin. Verwendet wurde extraktives Schweine-Calcitonin (Ciba, Basel) mit einer Aktivität von 8 MRC Einheiten pro Ampulle. Der Ampulleninhalt wurde in 1 ml 0.1 mol Ameisensäure gelöst und anschließend mit 5% gepufferten Gelatinelösung (pH 4,6) weiter verdünnt, so daß jedem Tier jeweils zur Erreichung eines Depoteffektes 1 ml Gesamtlösung subcutan gespritzt wurde. Die Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel allein. Die Tiere wurden mit einer Altromindiat (C 1000:Calcium 0,95%, Phosphor 0,80%, Vitamin D 3 500 IE/kg) und Leitungswasser ad libitum ernährt. Dauer des Versuchs: 10 Wochen. Calcium im Serum wurde mit dem Atomabsorptionspektrophotometer (Perkin—Elmer, Typ 300) bestimmt. Zur Markierung der Knochenmineralisation erhielten alle Tiere in wöchentlichen Abständen intraperitoneal 10 mg Oxytetracyclin (Vendarcin, Schering). Am Ende des Versuches wurde unmittelbar nach der Tötung eine Tibia von jedem Tier entnommen und im oberen Drittel mit einer Diamantsäge

Tabelle 1. Histomorphometrie der Tibiacorticalis: Knochenanbau- und Knochenresorptions-indexes

A I (Anbau Index)	=	$\frac{T_a}{T_t} \times 100 (\%)$
R I (Resorptions Index)	=	$\frac{T_m}{T_t} \times 100 (\%)$

T a (Treffer auf tetracyclinmarkierter subperiostaler Knochenanbaufläche).

T m (Treffer auf der Markraumfläche, deren Größe durch die endostale Knochenresorption bedingt ist).

T t (Totale Trefferanzahl auf der Gesamtquerschnittsfläche einschließlich des Markraumes).

durchtrennt. Die Fixation erfolgte in Carnoy'scher Lösung für 2 Stunden, anschließend wurde das Gewebe dehydriert und nach Stückfärbung in basischem Fuchsin in Acrylat ohne vorherige Entkalkung eingebettet (Delling, 1972). Von der proximalen Tibia wurden 5 μ dicke Längsschnitte angefertigt und nach Trichrom-Goldner und von Kossa gefärbt. Die quantitative Analyse der Anbau- und Resorptionsoberflächen sowie der Knochenstruktur (Volumendichte) wurde mit einem Integrationsokular durchgeführt (Merz, 1967). 12 Meßfelder unmittelbar im Anschluß an die primäre Eröffnungszone wurden an zwei Schnitten von jeder Tibia bei einer Vergrößerung von 300 ausgewertet.

5 μ dicke Querschliffe der Tibiadiaphyse 2 mm proximal des Abganges der Fibula wurden auf wasserfestem Naßschleifpapier angefertigt. Die Vergrößerungen (60fach) von Mikroaufnahmen im uv-Licht der gesamten Tibiaquerschnitte wurden mit einem Punktzählverfahren ebenfalls quantitativ ausgewertet. Bestimmt wurden die Gesamtquerschnittsfläche, die Markraumfläche sowie der neugebildete Knochen während der Versuchsdauer (Tetracyclin markierte Fläche). Um Unterschiede in der topographischen Höhe des Querschliffes auszuschalten, wurden Knochenanbau und Knochenresorption in Form von Indices errechnet (Tabelle 1).

Die statistische Signifikanz wurde nach dem *t*-Test nach Student geprüft. Die Mineralisation des Knochengewebes wurde außerdem qualitativ untersucht. Eine eindeutige Abgrenzung der 10 verschiedenen Mineralisationsfronten entspricht einer normalen Knochenmineralisation. Eine diffuse Markierung der gesamten Fläche ist Ausdruck einer verzögert ablaufenden Mineralisation mit einer allmählichen Einlagerung von Calcium bzw. Tetracyclin. Ebenfalls als Zeichen der Untermineralisation wird die Permeabilität des Knochengewebes für den basischen Farbstoff Fuchsin gedeutet (Delling, 1975).

Ergebnisse

Bei einem Ausgangsgewicht der Tiere von 155 ± 11 g war die Gewichtszunahme in allen Tiergruppen am Ende des zehnwöchigen Versuches gleich (INT-Kontrollen 250 ± 17 g, PTX-Kontrollen 252 ± 18 g, INT-60 mE CT 243 ± 18 g, PTX-60 mE CT 241 ± 21 g, INT-200 mE CT 261 ± 27 g, PTX-200 mE CT 259 ± 14 g). Während des Behandlungszeitraumes von 10 Wochen trat ein Verlust der hypocalciämischen Aktivität des Hormons ein. Zu Versuchsbeginn bewirkte die subcutane Injektion von 200 mE (MRC) Calcitonin einen Abfall des Serumcalciums von $0,91 \pm 0,25$ mval/l nach 60 min. Mit der gleichen Hormondosis konnte am Versuchsende nur noch ein Abfall von $0,48 \pm 0,32$ mval/l nach 60 min erreicht werden. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,0125$).

Die Knochenstruktur und die Knochenmasse der Tibiametaphysenspongiosa blieben nach zehnwöchiger Calcitonintherapie unverändert. Die Volumendichte der Spongiosa weist keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und

Tabelle 2. Histomorphometrische Parameter der Tibiametaphysenspongiosa. Die Knochenresorption wird durch Parathyreoidektomie in allen Tiergruppen reduziert: Kontrollen ($p < 0,0005$), 60 mE (MRC) Calcitonin pro Tag ($p < 0,01$), 400 mE (MRC) Calcitonin pro Tag ($p < 0,2$). Volumendichte und Osteoidoberflächen (Knochenanbau) zeigen keine signifikanten Differenzen

	Volumendichte				Osteoid-Oberfläche				Resorptions-Oberfläche			
	INT	n	PTX	n	INT	n	PTX	n	INT	n	PTX	n
Kontrollen	21,7 ± 2,6	(6)	24,7 ± 2,9	(5)	2,0 ± 0,7	(6)	3,6 ± 1,7	(5)	9,7 ± 0,1	(6)	2,1 ± 0,4	(5)
60 mE CT/d	21,9 ± 1,0	(5)	17,0 ± 1,4	(6)	0,6 ± 0,6	(4)	2,4 ± 0,4	(6)	9,6 ± 1,7	(5)	2,6 ± 0,4	(6)
400 mE CT/d	21,7 ± 1,3	(6)	22,8 ± 1,3	(5)	2,4 ± 0,5	(6)	0,7 ± 0,3	(5)	9,2 ± 1,3	(6)	6,1 ± 2,9	(5)

M ± SEM, Messungen in %.

Tabelle 3. Histomorphometrische Parameter der Tibiacorticalis. Durch Parathyreoidektomie wird bei den unbehandelten Kontrolltieren die Knochenresorption significant vermindert ($p < 0,025$). Bei den intakten sowie parathyreoidektomierten Tieren ergibt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Knochenresorption unter der hohen Calcitonindosierung von 400 mE (MRC) pro Tag: INT ($p < 0,0005$), PTX ($p < 0,05$). Die Anbau-Indexe zeigten keine signifikanten Unterschiede

	Anbau-Index				Resorptions-Index			
	INT	n	PTX	n	INT	n	PTX	n
Kontrollen	26,9 ± 1,0	(6)	26,7 ± 2,3	(5)	23,8 ± 1,1	(6)	18,6 ± 1,7	(5)
60 mE CT/d	26,8 ± 1,3	(6)	23,9 ± 1,7	(6)	18,0 ± 1,6	(6)	20,7 ± 1,5	(6)
400 mE CT/d	27,1 ± 1,9	(6)	25,8 ± 1,1	(6)	17,4 ± 0,9	(6)	15,0 ± 0,7	(6)

M ± SEM, Messungen in %.

unbehandelten Tieren auf. Sowohl die Zahl der Osteoclasten als auch die Ausdehnung der Resorptionsoberflächen wurden durch die Parathyreoidektomie bei den unbehandelten Tieren um 80% des Ausgangswertes reduziert. Eine weitere Abnahme konnte bei den parathyreoidektomierten Tieren auch durch Calcitonin nicht erreicht werden (Tabelle 2). An der Metaphysenspongiosa konnte eine Reduktion der Resorptionsoberflächen nach Calcitonintherapie bei den epithelkörperchen-intakten Tieren nicht nachgewiesen werden (Tabelle 2). An der Corticalis ließ sich dagegen eine Reduktion der Knochenresorption unter der Calcitonintherapie nachweisen. Die niedrigsten Werte wurden in der PTX Gruppe mit hoher Calcitonindosierung beobachtet (Tabelle 3).

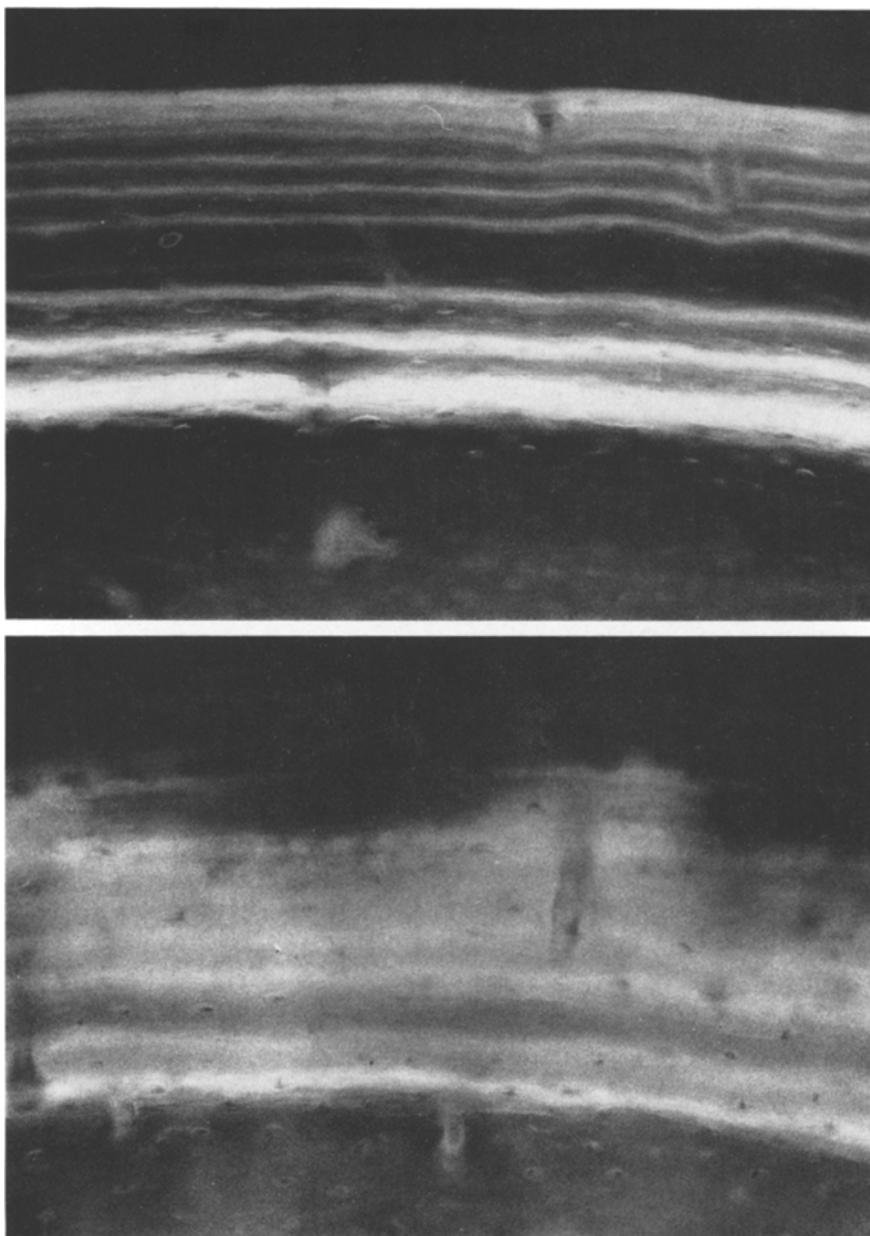


Abb. 1. Tetracyclinmarkierung der Tibiacorticalis im Querschnitt. Oben: Unbehandeltes Kontrolltier mit scharf markierten Mineralisationsfronten. Unten: Mineralisationsstörung nach Parathyreidektomie mit diffuser Tetracyclinmarkierung und Fuchselpermeabilität (dunkle subperiostale Areale) des Knochens. Unentkalkter Schliff, 50 μ , UV-Licht, $\times 200$

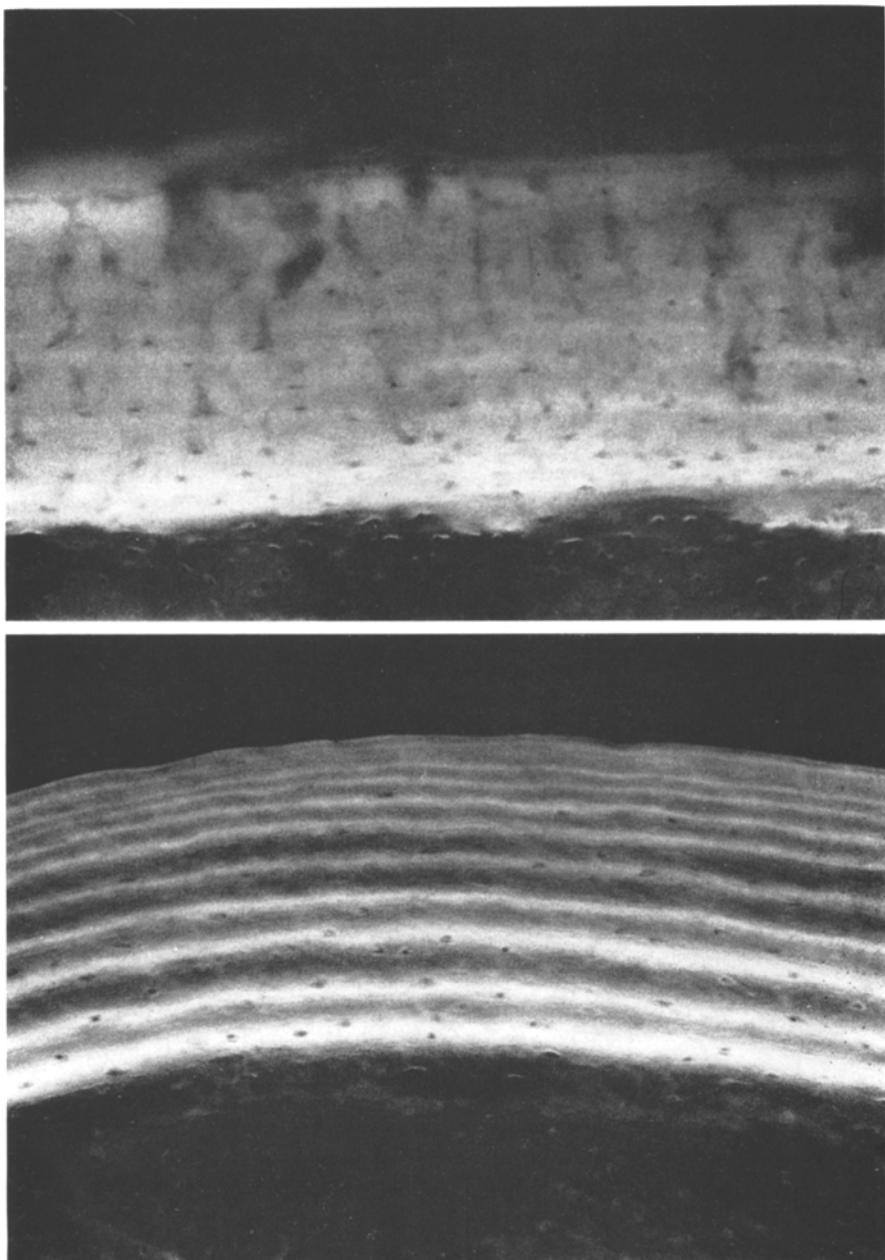


Abb. 2. Tetracyclinmarkierung der Tibiacorticalis im Querschnitt. Oben: Schemenhafte Ausbildung von Mineralisationsfronten und Rückbildung der Fuchsinspermeabilität des Knochens bei parathyreidektomierten Tieren unter gleichzeitiger Behandlung mit der geringen Calcitonindosierung von 2mal 30 mE (MRC) pro Tag. Unten: Vollständige Erhaltung scharf markierter Mineralisationsfronten bei parathyreidektomierten Tieren unter gleichzeitiger Behandlung mit 2mal 200 mE (MRC) Calcitonin pro Tag. Unentkalkter Schliff, 50 μ , UV-Licht, $\times 200$

Die Knochenneubildung zeigte weder an der Tibiametaphysenspongiosa noch an der Tibiacorticalis in der Diaphyse einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen (Tabellen 2 und 3).

Überraschenderweise ergaben sich bei der Beurteilung der Knochenmineralisation durch die Tetracyclinfluoreszenz die auffälligsten Unterschiede. Bei den INT Kontrolltieren lassen sich die 10 im Abstand von je einer Woche gegebenen Tetracyclinmarken eindeutig voneinander abgrenzen (Abb. 1 oben). Bei den PTX Tieren kommt es zu einer verzögert ablaufenden Mineralisation und damit auch zu einer erhöhten Fuchsinspermeabilität des neugebildeten Knochens sowie einer undeutlichen diffusen Tetracyclinmarkierung im Vergleich zu den INT Kontrollen (Abb. 1 unten). Die niedrige Dosierung von 2mal 30 mE (MRC) Calcitonin läßt stellenweise diese Abgrenzung der Tetracyclinmarken wieder deutlicher werden, gleichzeitig wird auch die Fuchsinspermeabilität des Knochengewebes erheblich reduziert (Abb. 2 oben). Dies bedeutet eine stärkere Mineralisation des Knochengewebes. Die Gabe der hohen Calcitonindosis von 2mal 200 mE (MRC) pro Tag hat einen überzeugenden Effekt auf die Knochenmineralisation im Vergleich zu den parathyreoidektomierten Kontrolltieren. Die einzelnen Tetracyclinmarken sind wieder scharf voneinander abgrenzbar. Eine diffuse Tetracyclinmarkierung wie bei den parathyreoidektomierten Kontrolltieren ist nicht mehr nachweisbar (Abb. 2 unten).

Diskussion

Während des gesamten Versuches von 10 Wochen ließ sich eine eindeutige Calcitoninwirkung nachweisen. Mit zunehmender Versuchsdauer kommt es jedoch zu einer Reduktion der Hormonwirkung. Die abnehmende hypocalciämische Aktivität des Hormons kann einerseits mit dem zunehmenden Alter der Ratten erklärt werden (Orimo and Hirsch, 1973), andererseits ist jedoch auch die Entwicklung eines milden sekundären Hyperparathyreoidismus nicht auszuschließen (Sörensen *et al.*, 1972).

Bei Betrachtung der Resorptionsparameter nach Calcitonintherapie entsteht der Eindruck einer unterschiedlichen Reaktion von Spongiosa und Corticalis. Dies wurde auch von anderen Autoren vermutet (Russel *et al.*, 1973). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß bei der quantitativen Auswertung der Spongiosaveränderungen zelluläre Resorptionsparameter, bei der quantitativen Auswertung der Corticalisveränderungen hingegen das Resultat der Knochenresorption bestimmt wurden. Weisbrode und Capen (1974) konnten zeigen, daß nach Calcitonintherapie die Zahl der Osteoclasten pro Resorptionsoberflächeneinheit der Spongiosa nicht signifikant reduziert wird. Andererseits wird auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen eine Hemmung der Osteoclastenaktivität mit Verlust des Bürstensaumes unter Calcitonineinfluß beschrieben (Kallio *et al.*, 1972; Lucht, 1973; Malkani *et al.*, 1973; Weisbrode und Capen, 1974; Zichner, 1974). Diese Hemmung der Osteoclastenaktivität muß zu einer verringerten Resorptionsleistung und damit auch zu einer verringerten Knochenresorption führen. Die Knochenresorption wurde an der Corticalis durch den Resorptionsindex erfaßt, der bei den mit Calcitonin behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt ist. An der Metaphysenspongiosa

kann diese verminderte osteoclastäre Knochenresorption durch direkte Bestimmung der Osteoclasten nicht erfaßt werden. Damit scheint Calcitonin einen wesentlichen Einfluß auf die Zellaktivität und weniger auf die cytogenetische Entwicklung der Osteoclasten zu haben.

Bei Prozessen mit erhöhtem Knochenumbau (Knochenregeneration) konnte in eigenen Versuchen ein positiver Calcitonineffekt auf die Knochenneubildung gezeigt werden (Delling und Glückselig, 1971; Ziegler und Delling, 1969, 1972). Foster *et al.* (1966) beobachteten bei der Ratte nach Gabe von 200 mE (MRC) Calcitonin pro Tag eine erhöhte röntgenologische Dichte der Wirbelkörper. Die Autoren schlossen daraus, daß auch die Knochenneubildung durch Calcitonin stimuliert wird. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen sowie zu den eigenen experimentellen Untersuchungen mit erhöhtem Knochenumsatz konnte bei Normaltieren kein wesentlicher Effekt des Hormons auf die Knochenneubildung nachgewiesen werden. Weder die Corticalis noch die proximale Tibiametaphysen-spongiosa zeigten bei der quantitativen Auswertung eine signifikante Differenz zwischen behandelten INT und PTX sowie unbehandelten INT und PTX Tieren. Daraus kann geschlossen werden, daß Calcitonin unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluß auf die Knochenneubildung, d.h. auf die Matrixsynthese der Osteoblasten hat.

Unabhängig von dem Einfluß auf die Knochenumbauprozesse hat Calcitonin einen Einfluß auf die Knochenmineralisation in der Gewebekultur. Die Freisetzung von radioaktivem ⁴⁵ Calcium ist in der Gewebekultur vermindert, wenn dem Medium Calcitonin zugesetzt wird (Reynolds and Dingle, 1970). Auch unter *in vivo* Bedingungen wurde von verschiedenen Autoren eine verstärkte Mineralisation des Osteoids sowie des Knorpels nach Anwendung von Calcitonin vermutet (Haas *et al.*, 1968; Zichner, 1970; Thompson and Urist, 1973). Eine quantitative Analyse der Knochenmineralisation, insbesondere eine quantitative Analyse der Tetracyclinfluoreszenz ist derzeit nicht möglich. Die Bestimmung muß sich daher im wesentlichen auf eindeutig voneinander abgrenzbare bzw. auf eine diffuse Tetracyclinmarkierung der Mineralisationsfronten (verzögert ablaufende Mineralisation) stützen. Im Tierexperiment kommt es durch Parathyreoidektomie zu einer eindeutigen Mineralisationsstörung (Jowsey *et al.*, 1958; Bernick, 1971; Rösler und Rabinowitz, 1973). Die Tetracyclinmarkierung ist bei diesen Tieren diffus (Abb. 1 unten). Nach Gabe von 2mal 30 mE (MRC) Calcitonin pro Tag wird diese Mineralisationsstörung verringert und durch eine Dosierung von 2mal 200 mE/Tag vollständig aufgehoben. Daraus kann geschlossen werden, daß Calcitonin die Knochenmineralisation bei einer vorbestehenden Mineralisationsstörung günstig beeinflußt. Der Mechanismus dieser Calcitoninwirkung ist noch nicht endgültig geklärt. Radiokinetische Untersuchungen mit ⁴⁵ Calcium lassen vermuten, daß Calcium zunächst in der Knochenflüssigkeit angereichert wird (Hirsch *et al.*, 1973). Danach kommt es zu einer Akkumulation amorphen Calciumphosphatgranula im Osteoid wie auch in der periosteocytären Matrix (Matthews *et al.*, 1972). Talmage *et al.* (1972) vermuten, daß Calcitonin primär einen verstärkten Phosphateinbau in das Knochengewebe bewirkt. Möglicherweise wird durch einen erhöhten Phosphateinbau bei der parathyreoidektomierten Ratte nach Calcitoningabe die Mineralisation so erheblich gebessert. Aufgrund dieser Untersuchungen scheint Calcitonin einen isolierten Einfluß auf den Mineral-

transport im Osteoblasten zu nehmen, während die Matrixsynthese als zweite Funktion der Osteoblasten und Osteocyten unter den gewählten experimentellen Bedingungen unbeeinflußt bleibt.

Anhand weiterer Studien müßte geprüft werden, ob sich der günstige Effekt auf die Mineralisation auch therapeutisch bei der Behandlung menschlicher Osteopathien mit gestörter Mineralisation (Vitamin D-resistente Osteomalacien, Fluor-behandelte Osteoporosen) ausnutzen läßt.

Literatur

- Belanger, L. F., Rasmussen, H.: Inhibition of osteocytic osteolysis by thyrocalcitonin and some anti-growth factors. In: R. V. Talmage and L. F. Belanger (eds.), Parathyroid hormone and thyrocalcitonin (calcitonin), p. 156, ICS 159, Amsterdam: Excerpta Medica, 1968
- 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)
- Bernick, S.: Histochemical study of bone in parathyroidectomized rats. *Calcif. Tiss. Res.* **6**, 316—328 (1971)
- Copp, D. H.: Endocrine regulation of calcium metabolism. *Ann. Rev. Physiol.* **32**, 61—86 (1970)
- Delling, G.: Über eine vereinfachte Methacrylateinbettung für unentkalkte Knochenschnitte. *Beitr. path. Anat.* **145**, 100—105 (1972)
- Delling, G.: Endokrine Osteopathien. In: Veröffentlichungen aus der Pathologie, W. Büngeler, M. Eder, K. Lennert, G. Peters, W. Sandritter, G. Seifert (Hrsg.), Bd. 98, Stuttgart: Fischer 1975
- Delling, G., Glückselig, W.: The effect of calcitonin on the regeneration of circumscribed tibia defects and on mineral content of bone. *Israel J. med. Sci.* **7**, 367—368 (1971)
- Delling, G., Schäfer, A., Ziegler, R.: The effect of calcitonin on fracture healing and ectopic bone formation in the rat. *Proc. Symp. on Thyrocalcitonin and C-Cells*, p. 175—181. London: Heinemann 1970
- Flanagan, B., Nichols, G.: Bone matrix turnover and balance in vitro. I. The effects of parathyroid hormone and thyrocalcitonin. *J. clin. Invest.* **48**, 595—606 (1975)
- Foster, G. V., Doyle, F. H., Bordier, P., Matrajt, H.: Effects of thyrocalcitonin on bone. *Lancet* **1966 II**, 1428—1431
- Friedman, J., Raisz, L. G.: Thyrocalcitonin: inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science* **150**, 1465—1467 (1965)
- Haas, G., Dambacher, M. A., Schenk, R., Olah, A.: Mode of thyrocalcitonin action in man. *Calcif. Tiss. Res.* **2**, Suppl. 21 (1968)
- Haddad, J. G., Avioli, L. V.: Comparative effects of phosphate and thyrocalcitonin on skeletal turnover. *Endocrinology* **87**, 1245—1250 (1970)
- Hirsch, P. F., Sliwowski, A., Orimo, H., Darago, L. S., Mewborn, Q. A.: On the mode of the hypocalcemic action of thyrocalcitonin and its enhancement by phosphate in rats. *Endocrinology* **93**, 12—19 (1973)
- Hirsch, P. F., Voelkel, E. F., Munson, P. L.: Thyrocalcitonin: hypocalcemic—hypophosphatemic principle of the thyroid gland. *Science* **146**, 412—413 (1964)
- Jowsey, J., Rowland, R. E., Marshall, J. H., McLean, F. C.: The effect of parathyroidectomy on haversian remodelling of bone. *Endocrinology* **63**, 903—908 (1958)
- Kallio, D. M., Garant, P. R., Minkin, C.: Evidence for an ultrastructural effect of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. In: R. V. Talmage and P. L. Munson (eds.), Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins, p. 383—388. Amsterdam: Excerpta Medica 1972
- Lucht, U.: Effects of calcitonin on osteoclasts in vivo. An ultrastructural and histochemical study. *Z. Zellforsch.* **145**, 75—88 (1973)
- Malkani, K., Luxemburger, M.-M., Rebel, A.: Cytoplasmic modifications at the contact zone of osteoclasts and calcified tissue in the diaphyseal growing plate of foetal guinea pig tibia. *Calcif. Tiss. Res.* **11**, 258—264 (1973)

- Matrajt, H., Bordier, P., Tun-Chot, S., Hioco, D., Foster, G. V., Doyle, F. H.: Histological bone changes produced by calcitonin. In: Proc. Symp. on Thyrocalcitonin and the C-Cells, p. 338—346. London: Heinemann 1968
- Matrajt-Denys, H., Tun-Chot, S., Bordier, P., Hioco, D.: Effect of calcitonin on vitamin A induced changes in bone in the rat. *Endocrinology* **88**, 129—137 (1971)
- Matthews, J. C., Martin, J. H., Collins, E. J., Kennedy, J. W., Powell, E. L.: Intermediate changes in the ultrastructure of bone cells following thyrocalcitonin administration. In: R. V. Talmage and P. L. Munson (eds.), *Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins*, p. 375—382. Amsterdam: Excerpta Medica 1972
- 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)
- Orimo, H., Hirsch, P. F.: Thyrocalcitonin and age. *Endocrinology* **93**, 1206—1211 (1973)
- Raisz, L. G., Au, W. Y., Friedman, J., Nieman, I.: Thyrocalcitonin and bone resorption. Studies employing a tissue culture bioassay. *Amer. J. med.* **43**, 684—690 (1967)
- Reynolds, J. J.: Inhibition by calcitonin of bone resorption induced in vitro by vitamin A. *Proc. roy. Soc. Sci. B* **170**, 61—67 (1968)
- Reynolds, J. J., Dingle, J. T.: A sensitive in vitro method for studying the induction and inhibition of bone resorption. *Calcif. Tiss. Res.* **4**, 339—349 (1970)
- Reynolds, J. J., Minkin, C.: Bone studies in vitro: Use of calcitonin as a specific inhibitor of bone resorption. In: S. Taylor and G. V. Foster (eds.), *Calcitonin*, p. 168. London: Heinemann 1969
- Rösler, A., Rabinowitz, D.: Magnesium-induced reversal of vitamin D resistance in hypoparathyroidism. *Lancet* **1973**, 803—805
- Russel, R. G. G., Kislig, A. M., Casey, P. A., Fleisch, H., Thornton, J., Schenk, R., Williams, D. A.: Effect of diphosphonates and calcitonin on the chemistry and quantitative histology of rat bone. *Calcif. Tiss. Res.* **11**, 179—195 (1973)
- Sörensen, O. H., Hindberg, J., Madson, S. N.: Secondary hyperparathyroidism in young rats given prolonged treatment with calcitonin. *Acta endocr. (Kbh.)* **71**, 313—320 (1972)
- Talmage, R. V., Anderson, J. J. B., Cooper, C. W.: The influence of calcitonins on the disappearance of radiocalcium and radiophosphorous from plasma. *Endocrinology* **90**, 1185—1191 (1972)
- Talmage, R. V., Whitehurst, L. A., Anderson, J. J. B.: Effect of calcitonin and calcium infusion on plasmaphosphate. *Endocrinology* **92**, 792—798 (1973)
- Thompson, J. S., Urist, M. R.: Opposing actions of calcitonin and cortisone upon osteogenesis in a heterotopic site. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **90**, 201—208 (1973)
- Van Nguyen, V., Jowsey, J.: Bone metabolism. *Jt. Surg.* **52A**, 1041—1049 (1970)
- Weisbrode, S. E., Capen, C. C.: Ultrastructural evaluation of calcitonin on bone in thyro-parathyroidectomized rats administered vitamin D. *Amer. J. Path.* **77**, 455—460 (1974)
- Zichner, L.: Calcitonin-Wirkung auf die Osteocyten der heranwachsenden Ratte. *Klin. Wschr.* **48**, 1444—1448 (1970)
- Ziegler, R., Delling, G.: The effect of calcitonin on atrophy and new formation of bone. *Acta endocr. (Kbh.)*, Suppl. **138**, 183 (1969)
- Ziegler, R., Delling, G.: Effect of calcitonin on the regeneration of a circumscribed bone defect (bored hole in rat tibia). *Acta endocr. (Kbh.)* **69**, 497—506 (1972)

Dr. A. Schulz
 Priv. Doz. Dr. G. Delling
 Pathologisches Institut des UKE
 D-2000 Hamburg 20
 Martinistraße 52
 Bundesrepublik Deutschland