

Kalcitonin a regulace osteoklastické kostní resorpce

ZIKÁN V.

III. interní klinika I. LF UK a VFN Praha

SOUHRN

Zikán V.: **Kalcitonin a regulace osteoklastické kostní resorpce**

Gen pro kalcitonin (CT) kóduje dva polypeptidy, CT a α peptid odvozený od CT genu (α CGRP). CT je peptidový hormon o 32 aminokyselinách, který produkují C buňky štítné žlázy. CT přímo potlačuje aktivitu osteoklastů prostřednictvím vysokoafinitního CT receptoru. Vyšší koncentrace CT se zjišťují fyziologicky během růstu, těhotenství a laktace. S využitím experimentálních myší s delecí genu pro CT/ α CGRP bylo potvrzeno, že CT skutečně chrání skelet matky během laktace. Osoby nebo experimentální zvířata s deficitem CT jsou citlivější vůči expozici PTH nebo 1,25 dihydroxyvitaminu D₃. U myší s knock out genem pro CT/ α CGRP bylo pozorováno zvýšení kostní resorpce s věkem. U lidí zatím nebylo potvrzeno, že by se snížená sekrece CT s věkem podílela na zvýšení kostní resorpce. U myší s chybějícím genem pro CT/ α CGRP byl pozorován také nárůst kostní hmoty, pravděpodobně v důsledku centrální stimulace kostní novotvorby neuropeptidem α CGRP. Význam ale může mít i změna citlivosti osteoklastů vůči inhibičnímu vlivu Ca²⁺. In vitro bylo prokázáno, že CT snižuje senzitivitu osteoklastů vůči extracelulárním Ca²⁺. Při deficitu CT by naopak zvýšená citlivost osteoklastů k inhibičnímu vlivu Ca²⁺ mohla zajistit ochranu před úbytkem kostní hmoty.

Klíčová slova: kalcitonin, α peptid odvozený od kalcitoninového genu, osteoklasty, osteoresorpce

SUMMARY

Zikán V.: **Calcitonin and regulation of osteoclastic bone resorption**

The calcitonin (CT) gene encodes two polypeptides, CT and α -CT gene-related peptide (α CGRP). CT, a 32-amino-acid-long peptide produced by thyroid C cells, directly inhibits osteoclast function through a high-affinity CT receptor. It is well known that CT levels rise during periods of calcium stress, such as pregnancy, growth, and lactation. The CT/ α CGRP-null mouse confirmed that CT protects the maternal skeleton during lactation, at least in mice. Subjects with CT deficiency as well as CT/ α CGRP-null animals were more responsive to PTH- or vitamin D-induced stimulation. Moreover, the deficiency of CT in the CT/ α CGRP-null mouse does result in increased bone resorption with age. However, there is conflicting evidence whether reduced CT secretion with age may contribute to higher bone resorption in humans. In addition, the CT/ α CGRP-null mouse showed high bone mass, likely resulting from the central effect of α CGRP. An alternative possibility is that a subtle change in osteoclast function might contribute to preserved bone mass. Extracellular Ca²⁺ is a physiologically relevant, direct inhibitor of osteoclastic bone resorption. In vitro studies have shown that CT inhibits Ca²⁺ sensing. On the other hand, CT loss may enhance Ca²⁺ sensitivity and therefore preserve bone mass.

Key words: calcitonin, α -calcitonin gene-related peptide, osteoclasts, bone resorption

Osteologický bulletin 2007; 12 (3):107–111

Adresa: MUDr. Vít Zikán, PhD., III. interní klinika I. LF UK a VFN, U Nemocnice 1, 128 00 Praha 2, tel.: 224962913, fax: 224922370, e-mail: vitzikan@hotmail.com

Došlo do redakce: 29. 6. 2007

Přijato k tisku: 14. 8. 2007

Úvod

Kalcitonin (CT) je peptidový hormon o 32 aminokyselinách, který u člověka produkují převážně parafolikulární C buňky štítné žlázy. Genový komplex pro CT se skládá z genů α a β a je u lidí lokalizován na 11. chromozómu. Po transkripci genu α se v C buňkách štítné žlázy tvoří kombinací exonů 1–4 mRNA pro kalcitonin. V buňkách periferního a centrálního nervového systému se kombinují exony 1–3, 5, 6 a tvoří se mRNA kódující peptid odvozený od CT genu α (CGRP α). Přestože od objevu CT uplynulo již více než 45 let [1], přesná fyziologická úloha tohoto hormonu u člověka nebyla dosud objasněna. Syndrom nedostatku nebo nadbytku CT není znám. Dlouhodobý nedostatek CT u osob po totální thyreoidektomii nebo nadbytek CT u pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy má malý nebo žádný účinek na homeostázu vápníku a kostní metabolismus. Fyziologickou úlohu CT však podporují některé charakteristiky kalcitoninového systému [2]: 1) struktura

známých druhově specifických CT je vysoce konzervovaná a má některé společné charakteristiky, mj. CT má vždy 32 aminokyselin, 1–7 disulfidický můstek na N-terminálním úseku a amid prolinu na C-terminálním úseku; 2) cirkulující koncentrace CT v krvi jsou srovnatelné s koncentracemi jiných hormonů se známým fyziologickým účinkem; 3) byl identifikován kalcium senzitivní receptor na povrchu C buňek štítné žlázy, který reguluje sekreci CT v závislosti na změnách kalcémie; 4) byl rozpoznán receptor pro CT na osteoklastech, který je zodpovědný za anti-resorpční účinek hormonu. In vitro již nízké fyziologické koncentrace CT způsobují down – regulaci tohoto receptoru a také modulují odpověď osteoklastů na extracelulární Ca²⁺ [3, 4].

Regulace aktivity osteoklastů

Kalcitonin

Aktivita zralých osteoklastů je pod přímým vlivem jak samotných Ca²⁺, které se uvolňují do prostoru resorpčního

kavitu v průběhu osteoresorpce [5], tak řady dalších lokálních faktorů produkovaných osteoklasty nebo osteoblasty, např. IL-6 a RANKL [6,7]. Z peptidových hormonů působí přímo na povrchové receptory osteoklastů CT a pravděpodobně také TSH [8]. I když PTH může působit také přímo na osteoklasty prostřednictvím nízkoafinitního receptoru [9], předpokládá se, že *in vivo* je vliv PTH na osteoklasty zprostředkován převážně buňkami osteoblastické řady [7]. Následující přehled je zaměřen především na regulační význam CT a extracelulárních Ca^{2+} .

CT se váže s vysokou afinitou na specifické s G proteiny spřažené receptory na povrchu osteoklastů (CTR) [7]. Jejich strukturní charakteristikou je 7 alfa helixů pronikajících povrchovou membránou a dlouhá extracelulární doména [10]. CTR patří do stejné receptorové rodiny jako PTH, PTHrP, adrenomedulin a sekretin. Gen pro CTR se nalézá na 7. chromozómu. Bylo již popsáno alespoň 7 izoform mRNA lidského CTR [11]. Odhaduje se, že zralý osteoklast má na svém povrchu přibližně 1 000 000 těchto receptorů [12], a osteoklasty tak mohou velmi citlivě reagovat i na malé fyziologické změny koncentrace CT [13,4]. O regulaci CTR

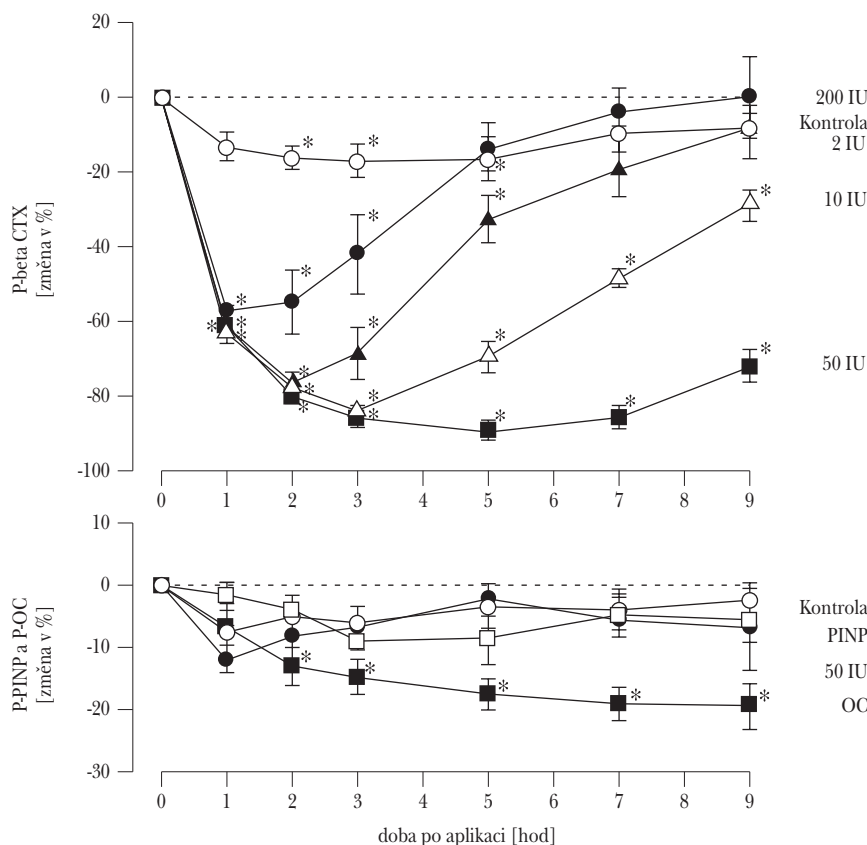
zatím není mnoho známo. Bylo zjištěno, že expresi genu pro CTR zvyšují glukokortikoidy [14], expresi naopak snižuje CT [14] a exprese CTR klesá také při acidóze [15]. V regulaci CTR se uplatňuje také M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) a NF κ B (nuclear factor κ B) [16]. S CT příbuzné peptidy CGRP α , amylin a adrenomedulin se také váží na CTR, ale s nízkou afinitou, a působí tak až ve vyšších koncentracích [17].

Je známo, že dlouhodobější podávání CT může navodit též ztrátu odpovědi osteoklastů na hormon, tzv. únikový fenomén [18–20]. Příčinou tohoto escape fenoménu může být down-regulace CTR na osteoklastech [18]. Bylo prokázáno, že i fyziologické koncentrace CT způsobují down-regulaci CTR [3]. Při dlouhodobé expozici CT se může uplatňovat snížená exprese genu pro CTR nebo vznik generace nových osteoklastů rezistentních na CT. U lidí by se rezistence na lososí CT mohla vyvinout také v souvislosti s tvorbou protilátek proti lososímu CT, i když jejich význam ve snížení účinnosti lososího CT zatím nebyl potvrzen [21].

CT inhibuje bazální i stimulovanou kostní resorpci [22]. Chambers a spol. zjistili *in vitro*, že již nízké (pikomolární) koncentrace CT rychle mění motilitu a uspořádání cytoskeletu osteoklastů [13]. Rozlišují se dvě fáze účinku CT: 1) rychlá ztráta motility osteoklastu, tzv. Q-fáze (quiescence) s poločasem ~ 15 min (účinek je zprostředkován přes Gs a cAMP), 2) pomalejší R-fáze (retraction) s poločasem ~ 27 min (účinek je zprostředkován přes Gq a aktivaci dějů závislých na Ca^{2+}) [23]. CT potlačuje také sekreční aktivitu osteoklastů a snižuje syntézu a sekreci tartarát rezistentní kyselé fosfatázy [24] a produkci H^+ [25]. Různé druhy specifické CT se ve svém antiresorpčním účinku liší. Lidský (a obecně savčí) CT je méně účinný v inhibici kostní resorpce než lososí CT.

In vivo je dobře dokumentován hypokalcemický a hypofosfatemický účinek suprafyziologických dávek CT [26,27]. I když hypokalcemický účinek CT koreluje s inhibicí kostní resorpce *in vivo* u experimentálních zvířat [28], jsou diskutovány i další mechanismy, kterými CT snižuje kalcemii a fosfatemii [2,26]. Přímé účinky CT na osteoklasty je možné nyní *in vivo* studovat také pomocí citlivých markerů kostní resorpce, např. měřením fragmentu C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (β CTX) v séru nebo plazmě. Sami jsme u lidí dokumentovali akutní antiresorpční účinek jak exogenního lososího CT, tak endogenního lidského CT. Akutní pokles koncentrace markeru kostní resorpce β CTX jsme

Graf 1
Průměrné změny koncentrací (a standardní chyba průměru) C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I v plazmě (P-beta CTX, v % proti bazální hodnotě) u 6 mladých žen po subkutánní aplikaci 2 IU ($\blacktriangle$), 10 IU ($\triangle$) nebo 50 IU ($\blacksquare$) lososího kalcitoninu (sCT), nebo po aplikaci 200 IU sCT nosním sprejem ($\bullet$) a průměrné změny koncentrací N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I v séru (S-PINP, v % proti bazální hodnotě) ($\blacksquare$) a osteokalcinu (OC) ($\square$) po subkutánní aplikaci 50 IU sCT. Kontrolní perioda nalačno (P-beta CTX ($\circ$), S-PINP ($\circ$) a P-OC ($\square$)). * $p < 0,05$; signifikantní rozdíl proti bazální hodnotě; RM ANOVA s korekcí pro mnohonásobné porovnávání; Tukey's test. Podle [29].



zjistili po jednorázové subkutánní aplikaci již pouhých 2 IU lososího CT (*graf 1*) [29]. Podáním vyšší dávky lososího CT se prodlužuje trvání účinku peptidu na kostní resorpci, a po aplikaci 50 IU lososího CT bylo možné maximální antiresorpční účinek prokazovat ještě po 9 hodinách (*graf 1*). Tato akutní inhibice kostní resorpce není doprovázena potlačením syntézy kolagenu (propeptidu prokolagenu typu I) na rozdíl od osteokalcinu, kde jsme zaznamenali mírné, ale významné snížení koncentrace po aplikaci CT (*graf 1*). I když pokles koncentrací osteokalcinu je pravděpodobně způsoben inhibicí kostní resorpce a sníženým uvolněním osteokalcinu z kostní matrix, nelze vyloučit také jiný mechanismus působení CT, který potlačuje aktivitu osteoblastů.

Také zvýšení koncentrace endogenního CT u zdravých mladých osob navozené krátkou, 30minutovou infuzí vápníku (v dávce 1,7 mg Ca/kg tělesné hmotnosti) významně korelovalo s poklesem koncentrace markeru osteoresorpce β CTX v séru, na rozdíl od pacientů po totální thyroidektomii, u kterých nebylo zaznamenáno zvýšení koncentrace CT v plazmě a odpověď markeru osteoresorpce β CTX po kalciové infúzi byla významně opožděná (*graf 2 a, b*) [30]. Přímé působení CT na povrchové receptory osteoklastů vysvětluje rychlý počáteční pokles markeru osteoresorpce β CTX, který byl signifikantní již za 30 minut po podání kalciové infúze, na rozdíl od thyroidektomovaných osob, kde byl zaznamenán signifikantní pokles β CTX až v 90. minutě. Za pozdější pokles osteoresorpce je pravděpodobně zodpovědný pokles koncentrace PTH, který na rozdíl od CT ovlivňuje aktivitu osteoklastů nepřímo působením na buňky osteoblastické řady. Tyto výsledky podporují hypotézu, že endogenní CT se uplatňuje v regulaci osteoresorpce také u lidí.

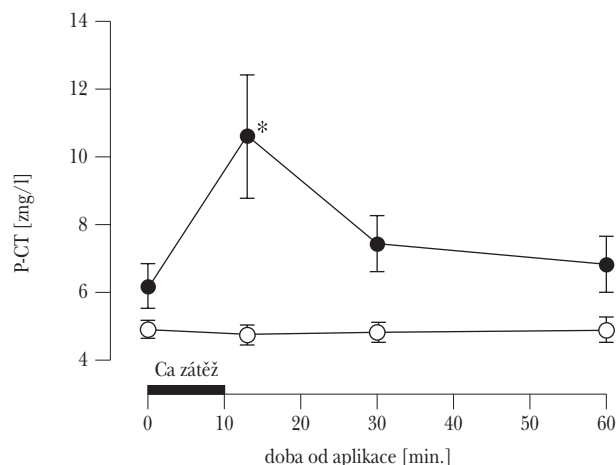
Bylo zjištěno, že nedostatek CT se může projevit za stavů se zvýšenou expozicí hyperkalcemizujícím podnětům, jako je působení PTH nebo vitamínu D. U zdravých zvířat byla dokumentována menší hyperkalcémie ve srovnání s thyroidektomovanými po kalciové injekci nebo po aplikaci PTH [31,32]. Blahoš a spol. [33] zjistili po 15minutové infúzi 10 % kalciumglukonátu (0,8 ml/kg tělesné hmotnosti) statisticky významné zpomalení poklesu kalcémie po ukončení infúze kalcia u pacientů po totální thyroidektomii. Bylo prokázáno, že funkční rezerva C buněk je omezena u starších osob [34] a může se také vyčerpat při trvalé tendenci k hyperkalcémii při zvýšené kostní resorpci u žen s osteoporózou nebo u pacientů s thyreotoxikózou [35]. U pacientů po totální thyroidektomii také snadněji vzniká hyperkalcémie při léčbě vitamínem D [33].

Význam endogenního CT v regulaci kostní remodelace a kalciové homeostázy potvrzují studie s transgenními zvířaty, u kterých byl odstraněn gen pro CT/ α CGRP. Hoffová a spol. zjistili po podání PTH transgenním myším s delecí celého CT/ α CGRP genu větší vzestup kalcémie a zároveň i vyšší koncentrace markeru osteoresorpce deoxypyridinolinu v moči než u zdravých myší [36]. Vzestup kalcémie bylo možné zablokovat aplikací CT těsně před podáním PTH. Bazální stupeň kostní resorpce ani počet osteoklastů se u 3měsíčních myší s delecí CT/CGRP α nelišil od zdravých zvířat. S věkem se ale kostní remodelace u těchto myší s delecí CT genu zvyšovala a po 12–18 měsících byl již prokazatelný přibližně 4x vyšší počet aktivních osteoklastů

Graf 2a

Průměrné změny koncentrací (a standardní chyba průměru) intaktního kalcitoninu v plazmě (CT, v ng/l) po podání intravenózní kalciové zátěže (1,7 mg/kg tělesné hmotnosti) u zdravých (●) a u thyroidektomovaných osob (○). * $p < 0,05$; signifikantní rozdíl proti bazálním hodnotám (RM ANOVA s korekcí pro mnohonásobné porovnávání, $p < 0,001$; Bonferroni t test, $p < 0,05$).

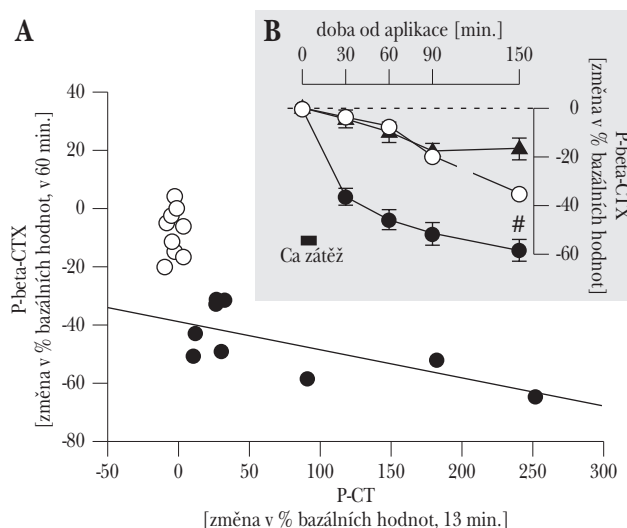
Podle [30]



Graf 2b

Korelace mezi maximální koncentrací CT (ve 13 minutě po začátku infúze kalcia) a individuálním snížením koncentrací beta CTX v plazmě v 60 minutě po začátku infúze kalcia ($r^2 = 0,48$; $p < 0,05$). Zdraví dobrovolníci (●) a pacienti po totální thyroidektomii (○). B) Průměrné změny koncentrací (a standardní chyba průměru, v % proti bazálnímu koncentracím) C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I v plazmě (P-beta CTX,) po podání intravenózní kalciové zátěže (1,7 mg/kg tělesné hmotnosti) u zdravých (●) a u thyroidektomovaných osob (○) a během kontrolní periody nalačno u zdravých osob (▲). # $p < 0,01$, AUC, t-test; signifikantní rozdíl mezi skupinou zdravých a thyroidektomovaných osob.

Podle [30].



a zvýšená kostní remodelace (kostní resorpce i novotvorba) [37]. Překvapivý byl nález zvýšené kostní novotvorby a vysoké kostní denzity, který byl zřejmý jak u 3 měsíčních, tak u starších 18 měsíčních myší s chybějícím CT genem. Předpokládá se, že toto zvýšení kostní novotvorby je důsledkem centrálního stimulačního působení CGRP α . Tuto hypotézu podporují další studie u myší se selektivním deficitem genu pro α CGRP, u kterých byla zjištěna snížená kostní novotvorba a také mírná osteopenie [38]. Na druhé straně nelze vyloučit inhibiční účinek samotného CT na kostní novotvorbu. Na osteoblastech však zatím nebyly potvrzeny receptory pro CT a mechanismus působení CT na osteoblasty zatím zůstává nevysvětlen. Je ale možné, že účinek CT na osteoblasty je nepřímý a je zprostředkován přes osteoklasty. Význam osteoklastů pro kostní novotvorbu podporuje zajímavé zjištění, že také delece jedné alely CTR vede k fenotypu se zvýšenou kostní novotvorbou a vysokou kostní denzitou [39].

Vyšší koncentrace CT se zjišťují fyziologicky během růstu, těhotenství a laktace [40]. Woodrow a spol. [41] nedávno přinesli přímý experimentální důkaz, že CT skutečně chrání skelet matky během laktace. Na modelu transgenní myši, u které byl gen pro CT/CGRP α odstraněn, prokázali větší ztráty kostní hmoty během těhotenství a laktace. Ztráta kosti u těchto transgenních myší bylo možné předejít podáváním exogenního CT, ale nikoli CGRP α .

Extracelulární Ca²⁺

Osteoklastickou kostní resorpci za fyziologických podmínek přímo moduluje kromě CT také extracelulární Ca²⁺, které se uvolňuje do prostoru resorpční kavity v průběhu resorpce kosti a dosahují zde vysokých milimolárních koncentrací (8–40 mM) [42]. Inhibiční vliv Ca²⁺ na aktivitu osteoklastů je známý [43], i když zatím není dobře objasněn mechanismus tohoto působení Ca²⁺ na osteoklasty. Předpokládá se, že Ca²⁺ působí na osteoklast prostřednictvím ryanodinového receptoru II. typu (RyR II), který je lokalizován na plazmatické membráně osteoklastů [43]. RyR receptory zajišťují také uvolnění Ca²⁺ z nitrobuněčných zásob a kontrolují vstup Ca²⁺ do buněčného jádra. RyR receptor je aktivován cADP ribosou, která vzniká působením intracelulárního enzymu ADP-ribosyl cyklázy, CD 38. Chybění tohoto enzymu u myši mělo za následek zvýšenou aktivitu osteoklastů (chybí inhibiční vliv Ca²⁺) a rozvoj osteoporózy [44]. Je pravděpodobné, že po inhibici osteoklastů Ca²⁺ musí existovat také mechanismy k obnovení resorpční aktivity osteoklastů. V tomto procesu se pravděpodobně uplatňuje interleukin 6 (IL-6). Zvýšení extracelulárního Ca²⁺ v průběhu resorpce kosti stimuluje jak syntézu, tak sekreci IL-6 a jeho receptoru, který následně zvyšuje aktivitu osteoklastů, pravděpodobně snížením jejich citlivosti vůči inhibičnímu vlivu Ca²⁺ [6,45]. Studie in vitro prokazují, že se na tomto procesu reaktivity osteoklastů podílí také CT. Zaidi a spol. prokázali in vitro, že CT ve velmi nízkých femtomolárních koncentracích významně snižuje citlivost osteoklastů vůči inhibičnímu vlivu Ca²⁺, pravděpodobně cestou aktivace protein kinázy A [4]. In vivo je známý tzv. rebound fenomén, kdy po počáteční inhibici kostní resorpce po aplikaci lososího CT následuje fáze opětovné aktivace kostní resorpce. CT tedy po iniciální inhibici kostní resorpce pravděpodob-

ně reguluje i senzitivitu kalciových senzorů a vede v souhrě s dalšími lokálními faktory a hormony k následné reaktivaci kostní resorpce. In vivo by se v této reaktivaci osteoklastické aktivity mohl uplatňovat PTH, jehož koncentrace se po aplikaci CT zvyšují v důsledku mírné hypokalcémie navozené předchozí aplikací CT [46]. CT se tak v souhrě s Ca²⁺ a dalšími působky (např. IL-6) a hormony (např. PTH) pravděpodobně podílí na regulaci cyklických změn resorpční aktivity a motility osteoklastů, které umožňují osteoklastům hloubit tunely uvnitř kortikální a na povrchu trabekulární kosti. Tento modulační vliv CT by také mohl vysvětlit paradoxní zjištění, že pacienti s deficitem CT nemají osteoporózu, protože senzitivita osteoklastů vůči inhibičnímu vlivu Ca²⁺ je při deficitu CT zvýšená a nedochází tedy k nadměrné osteoresorpci. U pacientů s nadbytkem CT, např. při medulárním karcinomu štítné žlázy, je naopak senzitivita osteoklastů vůči inhibičnímu vlivu Ca²⁺ snížena a nevzniká tedy osteosklerotický fenotyp [47].

Závěr

Antiresorpční účinky samotného CT jsou dobře známy, avšak objasnění fyziologického významu CT pro kostní metabolismus vyžaduje pochopení mechanismů působení CT ve vztazích k dalším regulačním faktorům – hormonům (např. PTH), neuropeptidům (CGRP α) a lokálně působícím faktorům (Ca²⁺, IL-6 ad.), jejichž účinky na kostní metabolismus se mohou vzájemně ovlivňovat. Pochopení těchto vztahů jistě přispěje i k vývoji nových léčebných postupů. V současné době se hledají nové cesty jak zvýšit biologickou dostupnost a účinnost CT. Antiresorpční účinnost CT je významně limitována, jak vznikem rezistence na CT, tak jeho biologickou dostupností. Ve stadiu klinického výzkumu jsou již orální analoga CT [49]. Další cestou je vývoj látek, které by zvýšily účinnost endogenního CT, např. zvýšením citlivosti CTR na osteoklastech, nebo modulací sekrece endogenního CT prostřednictvím kalcium senzitivního receptoru.

Literatura

1. Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, Davidson AG, Henze KG. Evidence for calcitonin – a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology*. 1962;70:638–649.
2. Hirsch PF, Lester GE, Talmage RV. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *J Musculoskel Neuron Interact*. 2001;1:299–305.
3. Wada S, Udagawa N, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Physiological levels of calcitonin regulate the mouse osteoclast calcitonin receptor by a protein kinase A-mediated mechanism. *Endocrinology*. 1996;137:312–320.
4. Zaidi M, Shankar VS, Adebajo OA, Lai FA, Pazianas M, Sunavala G, Spielman AI, Rifkin BR. Regulation of extracellular calcium sensing in rat osteoclasts by femtomolar calcitonin concentrations. *Am J Physiol*. 1996;271:F637–644.
5. Zaidi M, Moonga BS, Huang CL. Calcium sensing and cell signaling processes in the local regulation of osteoclastic bone resorption. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2004;79:79–100.
6. Adebajo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, Zaidi M. Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca²⁺ sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol*. 1998;142:1347–1356.
7. Blair HC, Robinson LJ, Zaidi M. Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:728–38.
8. Abe E, Mariani RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendren G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*. 2003;115:151–62.
9. Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, Neubert S, Lu SS, Iida-Klein A, Arnett T, Lindsay R. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2005;95:139–148.

10. Zaidi M, Shankar VS, Huang CLH, Pazianas M. Molecular mechanisms of calcitonin action. *Endocrine J.* 1994;2:459–467.
11. Beaudreuil J, Balasubramanian S, Chenais J, Taboulet J, Frenkian M, Orcel P, Julienne A, Horne WC, de Vernejoul MC, Cressent M. Molecular characterization of two novel isoforms of the human calcitonin receptor. *Gene.* 2004;343:143–151.
12. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986;178:355–360.
13. Chambers TJ and Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol.* 1982;136:27–39.
14. Wada S, Udagawa N, Akatsu T, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Regulation by calcitonin and glucocorticoids of calcitonin receptor gene expression in mouse osteoclasts. *Endocrinology.* 1997;138:521–529.
15. Biskobing DM, Fan D. Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclast. *Calcif Tissue Int.* 2000;67:178–183.
16. Samura A, Wada S, Suda S, Iitaka M, Katayama S. Calcitonin receptor regulation and responsiveness to calcitonin in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology.* 2000;141:3774–82.
17. Cornish J, Callon KE, Bava U, Kamona SA, Cooper GJ, Reid IR. Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone.* 2001;29:162–168.
18. Inoue D, Shih C, Galsbol DL, Goldring SR, Horne WC, Baron R. Calcitonin-independent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology.* 1999;140:1060–1068.
19. Wener JA, Gorton SJ, Raisz LG. Escape from inhibition or resorption in cultures of fetal bone treated with calcitonin and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1972;90:752–759.
20. Wada S, Martin TJ, Findlay DM. Homologous regulation of the calcitonin receptor in mouse osteoclast-like cells and human breast cancer T47D cells. *Endocrinology.* 1995;136:2611–2621.
21. Singer FR, Aldred JP, Neer RM, Krane SM, Potts JT Jr, Bloch KJ. An evaluation of antibodies and clinical resistance to salmon calcitonin. *J Clin Invest.* 1972;51:2331–2338.
22. Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, Bevis PJ, Huang CL. Forty years of calcitonin – where are we now? A tribute to the work of Iain MacIntyre, FRS. *Bone.* 2002;30:655–663.
23. Zaidi M, Alam AS, Shankar VS, Bax BE, Moonga BS, Bevis PJ, Pazianas M, Huang CL. A quantitative description of components of in vitro morphometric change in the rat osteoclast model: relationships with cellular function. *Eur Biophys J.* 1992;21:349–355.
24. Yumita S, Nicholson GC, Rowe DJ, Kent GN, Martin TJ. Biphasic effect of calcitonin on tartrate-ant acid phosphatase activity in isolated rat osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 1991;6:591–597.
25. Moonga BS, Moss DW, Patchell A, Zaidi M. Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. *J Physiol Lond.* 1990;429:29–45.
26. Hirsch PF, Voelkel EF, Munson PL. Thyrocalcitonin: hypocalcemic hypophosphatemic principle of the thyroid gland. *Science.* 1964;146:412–413.
27. Talmage RV, VanderWiel CJ, Matthews JL. Calcitonin and phosphate. *Mol Cell Endocrinol.* 1981;24:235–251.
28. Ikegame M, Ejiri S, Ozawa H. Calcitonin-induced change in serum calcium levels and its relationship to osteoclast morphology and number of calcitonin receptors. *Bone.* 2004;35:27–33.
29. Zikan V, Stepan JJ. Plasma type I collagen cross-linked C-telopeptide: a sensitive marker of acute effects of salmon calcitonin on bone resorption. *Clin Chim Acta.* 2002;316:63–69.
30. Zikan V, Stepan JJ. Diminished acute response of osteoclasts to calcium load in thyroidectomized patients. *Calcif Tissue Int.* 2004;74:377–381.
31. Talmage RV, Cooper CW, and Toverud SV. The physiological significance of calcitonin. In: W. Peck (ed) *Bone and mineral research annual*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1983;p 74–83.
32. Rodriguez M, Felsenfeld AJ, Torres A, Pederson L, Llach F. Calcitonin, an important factor in the calcemic response to parathyroid hormone in the rat. *Kidney Int.* 40:219–225.
33. Blahoš J. Calcitonin a fosfokalciový metabolismus, jeho fyziologický a klinický význam. Thomayerova sbírka, Avicenum, 1974; Praha.
34. Deftos LJ. Calcitonin. In: Favus MJ (ed.) *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Lippincott-Raven, New York, 1996;p 82–87.
35. Blahoš J, Adam M, Hulejova H, Spacek P. Kalciový toleranční test při tyreotoxikóze, Hashimotově tyroiditidě a po totální tyroidektomii. [The calcium tolerance test in thyrotoxicosis, Hashimoto's thyroiditis and after total thyroidectomy]. *Vnitř Lek.* 1996;42:597–601.
36. Hoff AO, Catala Lehnen P, Thomas PM, Priemel M, Rueger JM, Nasonkin I, Bradley A, Hughes MR, Ordonez N, Cote GJ, Amling M, Gagel RF. Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest.* 2002;110:1849–1857.
37. Huebner AK, Schinke T, Priemel M, Schilling S, Schilling AF, Emeson RB, Rueger JM, Amling M. Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1924–1934.
38. Schinke T, Liese S, Priemel M, Haberland M, Schilling AF, Catala-Lehnen P, Blicharski D, Rueger JM, Gagel RF, Emeson RB, Amling M. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res.* 2004;19:2049–2056.
39. Dacquin R, Davey RA, Laplace C, Levasseur R, Morris HA, Goldring SR, Gebre-Medhin S, Galsbol DL, Zajac JD, Karsenty G. Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J Cell Biol.* 2004;164:509–514.
40. Whitehead M, Lane G, Young O, Campbell S, Abeyasekera G, Hillyard CJ, MacIntyre I, Phang KG, Stevenson JC. Interrelations of calcium-regulating hormones during normal pregnancy. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981;283:10–12.
41. Woodrow JP, Sharpe CJ, Fudge NJ, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS. Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology.* 2006;147:4010–4021.
42. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid micro-environment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res.* 1988;175:266–276.
43. Zaidi M, Adebajo OA, Moonga BS, Sun L, Huang CL. Emerging insight into the role of calcium ions in osteoclast regulation. *J Bone Miner Res.* 1999;669–674.
44. Sun L, Iqbal J, Dolgilevich S, Yuen T, Wu XB, Moonga BS, Adebajo OA, Bevis PJ, Lund F, Huang CL, Blair HC, Abe E, Zaidi M. Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosylcyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption. *FASEB J.* 2003;17:369–375.
45. Moonga BS, Adebajo OA, Wang HJ, Li S, Wu XB, Troen B, Inzerillo A, Abe E, Minkin C, Huang CL, Zaidi M. Differential effects of interleukin-6 receptor activation on intracellular signaling and bone resorption by isolated rat osteoclasts. *J Endocrinol.* 2002;173:395–405.
46. Schlemmer A, Ravn P, Hassager C, Christiansen C. Morning or evening administration of nasal calcitonin? Effects on biochemical markers of bone turnover. *Bone.* 1997;20:63–67.
47. Zaidi M, Moonga BS, Abe E. Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. *J Clin Invest.* 2002;110:1769–1771.
48. Tanko LB, Bagger YZ, Alexandersen P, Devogelaer JP, Reginster JY, Chick R, Olson M, Benmamar H, Mindeholm L, Azria M, Christiansen C. Safety and efficacy of a novel salmon calcitonin (sCT) technology-based oral formulation in healthy postmenopausal women: acute and 3-month effects on biomarkers of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2004;19:1531–1538.