

BIOLOGIE KALCITONINU

M. BAYER

Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK Praha

SOUHRN

Bayer M.: **Biologie kalcitoninu**

Objev kalcitoninu se datuje ke konci padesátých let minulého století. Kalcitonin je jediný hypokalcemizující faktor v organismu a spolu s parathormonem a kalcitriolem představuje nezbytnou součást regulace fosfokalciového metabolismu. Brzy se přišlo na to, že jeho zdrojem jsou zejména C-buňky štítné žlázy, a počátkem osmdesátých let byl podán důkaz jeho účinku na osteoklasty. Následoval zevrubný výzkum příslušného receptoru a mapování oblastí, nezbytných pro vazbu ligandu a zprostředkování účinku kalcitoninu pomocí cyklického adenosin-monofosfátu (cAMP) a kalcia. Tento přehledný článek shrnuje současné znalosti o struktuře a účincích známých typů kalcitoninu a také o proteinech jemu podobných: kalcitonin gene-related peptidu alfa a beta, adrenomedulinu, amylinu a nedávno objeveném kalcitonin receptor-stimulating peptidu.

Klíčová slova: kalcitonin, historie, účinky, deriváty

SUMMARY

Bayer M.: **Biology of calcitonin**

Calcitonin, the only hypocalcaemic factor in the organism, was discovered in the late 1950s. Soon after, its origin from the thyroid C cells was documented. The direct action of calcitonin on osteoclasts was evidenced in the early 1980s. These discoveries were followed by cloning and sequencing of calcitonin receptors. Specific regions of the receptor necessary for ligand binding and intracellular signalling through cyclic AMP and calcium have been identified. This review summarizes the current knowledge about the structure, cellular and molecular actions of fish, mammalian and human calcitonin as well as about its related peptides: alpha- and beta-calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and the recently isolated calcitonin receptor-stimulating peptide-1.

Keywords: calcitonin, history, effects, derivatives

Osteologický bulletin 2007; 12 (3):96–100

Adresa: prof. MUDr. Milan Bayer, CSc., Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. LF UK Praha, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2, e-mail: mbayer@lf1.cuni.cz

Došlo do redakce: 19. 6. 2007

Přijato k tisku: 23. 7. 2007

Nahlédnutí do historie

Kalcitonin byl popsán Coppem a jeho spolupracovníky počátkem šedesátých let minulého století. Jejich objevy umožnily metody in vivo perfuze psí štítné žlázy a příštítných tělísek krví s definovanou koncentrací vápníku. Docházelo při nich k výkyvům kalcémie, jež nešly vysvětlit pouze odchylkou v sekreci parathormonu. Bylo zřejmé, že existuje nějaká další látka, jež účinky parathormonu maří [1, 2]. Dosavadní představy o metabolismu kalcia tedy musely být revidovány. Na savcích tkáních bylo pak opakovaně pozorováno, že zdrojem nového hormonu, nazvaného kalcitonin (určoval „tone“ – chování kalcia v tělesných tekutinách) je tkáň štítné žlázy. Histochemické změny thyreoidálních parafolikulárních C buněk po perfuzi žlázy hyperkalcemickým sérem nálezy potvrdily [3,4]. Následovala extrakce hypokalcemizujícího peptidu z těchto buněk a průkaz jeho účinku in vivo i in vitro [5,6]. Přesné určení struktury prasečího a lososího kalcitoninu předcházelo extrakci, purifikaci a rozpoznání struktury lidského kalcitoninu [7,8,9,10]. Záhy na to se přišlo na fakt, že nový hormon snižuje kalcémii utlumením aktivity osteoklastů, nicméně přímý účinek kalcitoninu na tyto buňky byl prokázán až v roce 1982 [11].

Kalcitonin se vyskytuje i u nejjednodušších živočichů. Je jediným hypokalcemizujícím faktorem, který má organismus k dispozici. U savců ho produkují zejména parafoliku-

lární C buňky štítné žlázy (vývojově patřící k tzv. ultimobranchiálním tělískům). Spolu s parathormonem a kalcitriolem se řadí mezi základní regulátory fosfokalciového metabolismu. U nás vydal první monografii o kalcitoninu Blahoš [12].

Kalcitonin a „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP)

Kalcitonin je peptid o 32 aminokyselinách, s molekulární hmotností přes tři tisíce daltonů.

Kromě C buněk thyreoidey je tvořen též buňkami hypofýzy a v organismu hojně zastoupenými buňkami neuroendokrinními. Lokálně má pouze parakrinní účinky, pokud ovšem nedojde k maligní transformaci secernujících buněk [13].

Komplex genů pro kalcitonin tvoří geny alfa a beta. U člověka je umístěn na 11. chromozomu mezi geny pro katalázu a parathormon. Alfa gen kóduje vznik kalcitoninu a alfa-CGRP. Beta gen zodpovídá za tvorbu beta-CGRP [14,15]. Gen sestává ze šesti exonů oddělených introny. Při jeho počáteční transkripci se vytvářejí dvě různé mRNA. Jedna stojí u zrodu prekursoru kalcitoninu (tento děj výrazně převažuje) a pomocí druhé vzniká CGRP, převážně v nervovém systému.

CGRP alfa i beta se liší ve třech aminokyselinách. Také patří mezi fylogeneticky velmi staré působky – byly naleze-

ny i v sympatických gangliích žab a ptáků [16]. Biologické vlastnosti obou typů CGRP jsou zcela identické – vedou v organismu k vazodilataci, působí imunomodulačně a v centrálním nervovém systému mají roli neurotransmiteru. CGRP je uvolňován z buněk ganglií trigeminu a jeho transkripce je zvýšena v situaci napodobující neurogenní zánět prostřednictvím aktivované proteinkinázy. Mohou ji stimulovat endogenní zánětlivé substance jako tumor necrosis factor-alfa. Tvorba a uvolnění CGRP a mediátorů zánětu se může navzájem posilovat a trvat hodiny až dny pod obrazem migrenózní ataky [17]. CGRP je také velmi významným faktorem při vzniku, progresi a perzistenci hypertenze. Dochází k ní při poruše syntézy či uvolňování CGRP nebo při snížené senzitivě cév na jeho působení; jeho patologickou interakcí s prohypertenzivními systémy (renin-angiotensin-aldosteron, sympaticus, endothelin) nebo antiproliferačními systémy hladké svaloviny cév [18]. Případně uplatnění CGRP v kostní tkáni není dosud blíže prostudováno, ačkoli zde může být tvořen také [19].

Příslušná mRNA pro kalcitonin dává vzniknout prekurzorům o velké molekule, které jsou pak intracelulárně štěpeny na aktivní proteiny. Jedním z nich je preprokalcitonin o 141 aminokyselinách, dalším prekurzorem je prokalcitonin (116 aminokyselin), který byl testován jako poměrně spolehlivý laboratorní ukazatel neonatální sepse [20], endotoxémie a systémových zánětlivých reakcí [21]. Pomáhá odlišit bakteriální sepsi od virové, při níž jeho hladina v krvi nestoupá. Nicméně podle posledních zpráv prokalcitonin u kriticky nemocných dospělých zřejmě nemůže vždy spolehlivě odlišit sepsi od ostatních neinfekčních příčin syndromu systémové zánětlivé reakce. Specifita a senzitivita jeho výpočty v těchto případech dosahuje jen 71 % [22]. Společně s kalcitoninem je secernován ještě katekalcin, peptid o 21 aminokyselinách, využitelný jako nádorový marker.

V současné době je známo přesné složení více než dvanácti druhově specifických kalcitoninů včetně lidského. Jejich společným znakem je disulfidický můstek na 1–7 pozici N-terminálního úseku a amid prolinu na C-terminálním úseku. Všechny dosud prozkoumané živočišné druhy mají identických pět z devíti aminokyselin.

Počet modifikací primární struktury kalcitoninu snižuje jeho biologickou aktivitu. Může jít o delecii C-terminálního prolinamidu, zkrácení C-terminálního konce, rozštěpení disulfidického můstku nebo oxidaci methioninu v pozici 8. Modifikace ve smyslu oxidace methioninu -25 u prasečího, hovězího či ovčího kalcitoninu jeho aktivitu nemění. Všeobecně však platí, že jakékoli zvýšení shody se stavbou lososího kalcitoninu biologickou aktivitu hormonu zvyšuje [23]. Vazba k receptoru také vyžaduje určitou kvalitu sekundární i terciární struktury kalcitoninu. Pro léčebné účely se hojně užívá syntetický kalcitonin lososí, který má nejvyšší afinitu k vazebným receptorům, a proto je mnohem účinnější než lidský.

Aktivita kalcitoninu na buněčné a molekulární úrovni

Ovlivnění sekrece

Hladina kalcitoninu v plazmě klesá s věkem. Nejvyšší hodnoty mají novorozenci. Kromě C buněk štítné žlázy mohou kalcitonin v organismu tvořit také pituitární buňky

a neuroendokrinní buňky. Tyto zdroje mimo štítnou žlázu však nejsou pro koncentraci hormonu v plazmě důležité. Změny sekrece významně závisí na aktuální kalcémii, ale dlouhodobý vzestup koncentrace vápníku v séru produkci kalcitoninu zvýší jen dočasně, neboť dochází k vyčerpání sekreční rezervy C buněk thyroidey. Kromě aktuální hodnoty kalcémie a věku se sekrece kalcitoninu dlouhodobě mění i v závislosti na pohlaví (nižší hladiny jsou u žen). Může být také stimulována glukagonem (zprostředkovaně přes cAMP), gastrinem (inhibitory protonové pumpy, omeprazol), cholecystokininem, sekretinem, VIP, ethanollem, glukokortikoidy nebo acidózou. Zvýšením transkripce stoupá tvorba kalcitoninu i při septickém stavu [24, 25]. Sekreci kalcitoninu snižuje kalcitriol. Plazmatická hladina kalcitoninu též slouží jako laboratorní ukazatel pro medulární karcinom štítné žlázy a syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2 [26].

Kalcitonin je odbouráván především v ledvinách a játrech, v menší míře také v cirkulaci, kostní tkáni a ve vlastní štítné žláze. Jeho poločas lze počítat v minutách. Inaktivace v ledvinách je významnější než vlastní exkrece do moči.

Receptor

Specifický povrchový buněčný receptor [27] pro kalcitonin mají především osteoklasty. Odhaduje se, že každý z nich může mít těchto receptorů až milion [28]. Kromě toho mají kalcitoninový receptor i jiné buňky, např. v centrálním nervovém systému. Dosud byly receptory pro kalcitonin zjištěny asi ve třiceti tkáních (mimo jiné na chondrocytech, B-lymfocytech, nebo Leydigových buňkách testes). Dnes je již známo více izoform receptoru pro kalcitonin. Vždy jde o membránové receptory se sedmi transmembránovými doménami. Všechny mají vysokou afinitu ke kalcitoninu, ale s nízkou afinitou mohou vázat i CGRP, amylin nebo adrenomedulin. Koncentrace těchto alternativních ligandů však musí pro vazbu být až stonásobná [29,30]. Regulace exprese receptoru pro kalcitonin je předmětem intenzivního výzkumu. Kalcitonin expresi receptoru transkripčním mechanismem tlumí, glukokortikoidy ji stimuluje. Vliv na expresi receptoru má i makrofágový colony stimulující faktor a nukleární faktor kappaB [31]. Výsledky pozorování na pokusných zvířatech napovídají, že v savcích tkáních se indukce receptoru pro kalcitonin objevuje například během gravidity [32]. Zřejmě jde o ochranu organismu před hyperkalcémií. Molekulárně genetické metody v posledních letech umožnily detailní studium různých receptorů pro kalcitonin. Byly identifikovány specifické oblasti receptoru, nezbytné pro vazbu ligandu a aktivaci intracelulárních signálních systémů pomocí cAMP a kalcia.

Účinky

Různé typy kalcitoninů se liší intenzitou účinku. Nejúčinnější známý je kalcitonin lososí a úhoří, nejméně účinný je kalcitonin lidský. Po vyplavení kalcitonin koluje v oběhu jako aktivní monomer nebo dimer. V cílové tkáni působí prostřednictvím cAMP. Jeho hlavní úlohou je inhibice osteoklastické resorpce kosti s následným poklesem kalcémie. Pod vlivem kalcitoninu se u osteoklastů vyhlazuje původně zřasená buněčná membrána [33], zastavuje se cytoplasmická motilita a dochází k postupné retrakci jejich výběžků

[34]. Zmenšuje se tak plocha kontaktu buňky s hmotou kosti. Kalcitonin snižuje i sekretorickou aktivitu osteoklastů, zejména tvorbu a uvolňování kyselý fosfatázy [35] a sekreci vodíkových iontů snížením aktivity H⁺-ATPázy. Vývojová řada osteoklastů zpomaluje proliferaci a diferenciaci nových buněk. Zralé osteoklasty se přeměňují na plazmatické buňky. Výsledkem všech těchto dějů je potlačení osteoklastické resorpce kosti a snížení úbytku kostní hmoty. Současně jsou aktivovány osteoblasty. Dochází ke stimulaci tvorby a poté i mineralizace osteoidu [36]. Mechanismus stimulace osteoblastů není ještě zcela objasněn. Bylo prokázáno, že úhoří kalcitonin působí na kostní tkáň anabolicky cestou kostních morfogenních proteinů a zvyšuje koncentraci inzulinu podobných růstových faktorů v kulturách lidských osteoblastů podobných buněk [36,37]. Zřejmě se tedy kalcitonin uplatňuje v regulaci celého kostního obratu [38]. Zajímavé je zjištění, že v přítomnosti již jen femtomolárních koncentrací kalcitoninu nepodléhají osteoklasty inhibičnímu vlivu vysoké koncentrace extracelulárního kalcia. Tento zdánlivě paradoxní účinek vysvětluje deficit kostních ztrát při chybné cirkulujícího kalcitoninu, jako je tomu třeba po tyreoidektomii, nebo nepřítomnost osteopetrozy při hyperkalcitoninémii u medulárního karcinomu štítné žlázy [39]. Kalcitonin nemá u člověka popsáný vliv na hojení fraktur, u experimentálních zvířat je však někdy dokonce urychluje [40]. U samic pokusných zvířat dochází při ukončení laktace velmi rychle k významnému útlumu resorpce kosti, potlačení populace osteoklastů a k pětinašobnému vzestupu koncentrace kalcitoninu (již za 24 hodin po odstavení mláďat). Současně stoupá hladina kalcia a estrogenů, klesá prolaktin a parathormon. Je to obraz úpravy kostního obratu, urychleného laktací [41].

Častým a výhodným účinkem kalcitoninu je analgésie. Bylo jí dosaženo s různými dávkami lososího kalcitoninu. Spočívá v přímé interakci hormonu v centrálním nervovém systému, provázené vzestupem hladiny β -endorfinu, poklesem prostaglandinu E a změnami v průchodu kalcia neuronální membránou. Zřejmě dochází i k ovlivnění descendentních inhibičních serotoninergních drah [42].

V ledvinách kalcitonin snižuje reabsorpci kalcia, fosforu, magnesia, kalcia a natria tubuly a při zvýšeném kostním obratu může způsobit přechodnou hypokalcémii a hypofosfatémii. Reguluje také expresi genu pro renální 1-alfa-hydroxylázu, má tedy vliv na míru syntézy kalcitriolu [43]. U nemocných s absorpční hyperkalciurií byly popsány zvýšené plazmatické koncentrace kalcitoninu. C-buňky jejich štítné žlázy jsou zřejmě opatřeny Ca-sensing receptorem, senzitivnějším na stimuly z okolí, protože po podání perorálního kalcia reagují intenzivněji. Možná jde o kompenzační mechanismus při zvýšené absorpci kalcia střevní sliznicí [44].

V gastrointestinálním traktu kalcitonin snižuje sekreci žaludeční kyseliny a pankreatických enzymů, na oběhový systém má účinek hypotenzivní zvýšením periferní vazodilatace.

Jak už bylo zmíněno, kalcitonin je vhodným laboratorním ukazatelem při karcinomu štítné žlázy. Jeho zvýšené plazmatické koncentrace však bývají i při renálním selhání, jiných endokrinních tumorech a někdy též při zatím ne zcela objasněné hyperplazii C buněk thyroidey [45].

Vedlejší účinky kalcitoninu

Vedlejší účinky byly zaznamenány takřka pouze po parenterální aplikaci a jsou spíše nepříjemné než závažné. Jejich frekvence a tíže závisí na podávané dávce. Nejčastější je nauzea krátce po injekci, popisovaná až u 30 % nemocných. Z ostatních je třeba jmenovat návaly, zvracení, průjem či lokální bolest v místě injekce. Cévní projevy jsou častější u mladších jedinců. Kalcitonin se však všeobecně považuje za bezpečný lék, bez interakcí s jinými preparáty a bez toxických účinků [40]. Po nazálním nebo rektálním podání kalcitoninu se vedlejší účinky takřka nevyskytují.

Deriváty kalcitoninu

V praxi se nyní nejčastěji používá syntetický lososí kalcitonin ve formě nosního spreje. Současně však probíhá intenzivní příprava kalcitoninu pro orální podávání k širšímu klinickému použití. Jako ostatní peptidy, také kalcitonin podléhá v gastrointestinálním traktu proteolýze vlivem intestinálních enzymů a frakce, jež se vstřebává do oběhu, je rychle inaktivována akumulací ve tkáních a vyloučena glomerulární filtrací. Farmakokinetické i farmakodynamické vlastnosti zkoumané látky zlepšila metoda reverzibilní lipidizace [46]. Další úpravy vedou ke vzestupu odolnosti lososího kalcitoninu vůči peptidázám pankreatu a kartáčového lemu. Klesá i jeho akumulace v játrech a filtrace glomeruly, takže hypokalcemický účinek ve srovnání s běžným lososím kalcitoninem několikanásobně stoupá [47]. Vůči enzymům vysoce stabilní, vodě rozpustné lipidové konjugáty lososího kalcitoninu jsou již k dispozici [48].

K látkám podobným kalcitoninu či CGRP patří u savců ještě adrenomedulin a amylin [49]. Adrenomedulin byl poprvé izolován z lidského feochromocytomu. Obsahuje 52 aminokyselin a je strukturálně homologní s CGRP. Jeho syntéza byla prokázána v řadě savčích tkání, včetně nadledvin, hladké svaloviny cév, myokardu a centrálního nervového systému. Uplatňuje se jako mediátor při kardiovaskulárních chorobách, onemocnění ledvin, sepsi a diabetu. Podporuje neovaskularizaci a stimuluje růst buněk některých tumorů [50]. Amylin je tvořen beta buňkami pankreatu. Z jedné pětiny je homologní s kalcitoninem, ze dvou pětín s CGRP [51]. Amylin a také jeho fragmenty stimulují proliferaci osteoblastů a snižují osteoresorpci. V přítomnosti tzv. „receptor activity-modifying proteins, RAMPs“ může amylin reagovat s receptorem pro kalcitonin s následným poklesem resorpce kosti a stimulací proliferace osteoblastů [52]. Nedávno byl z prasečí mozkové tkáně izolován nový kalcitoninu příbuzný protein, „calcitonin receptor-stimulating peptide-1“, CRSP-1. Po aplikaci pokusným krysám přechodně snižuje kalcémii. V závislosti na dávce potlačuje vznik a také aktivitu vícebuněčných osteoklastů [53].

Závěr

Před érou bisfosfonátů byl kalcitonin prvním účinným lékem Pagetovy choroby, pro terapii postmenopauzální osteoporózy je registrován od r. 1984 [54]. Po farmakologické dávce kalcitoninu dochází během několika hodin k poklesu ukazatelů kostní resorpce. Reakce je výraznější při stavech s vysokým kostním obratem. Nicméně aktivita osteoklastů bývá potlačena na méně než 24 hodin. I po delší léčbě není ovlivněna kortikální kost, pouze kost trabekulární [55]. Ač-

koli je vzestup denzity kostního minerálu během terapie jen mírný, dochází k významnému poklesu rizika zlomenin, zřejmě v důsledku pozitivního vlivu hormonu na mikroarchitekturu kostní tkáně [56].

Narůstající poznatky o struktuře kalcitoninu, studium podmínek jeho afinity k receptoru a možnosti zvýšení jeho biologické účinnosti umožňují výzkum a vývoj kvalitních analog, využitelných v medicínské praxi. Další výzkumné snahy spočívají v pokusech o zvýšení senzitivity příslušného receptoru a/nebo sekrece endogenního kalcitoninu a vývoji nových kalcitoninů, schopných podávání perorálně, transdermálně nebo inhalačně. Genová terapie umožní přenos genu pro kalcitonin prekurzory osteoklastů na specifická místa, kde dochází k osteolýze [23,57]. Jsme tedy takřka půl století po objevení kalcitoninu a jeho účinků svědky nového oživení zájmu o tento hormon.

Literatura

- Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, et al. Evidence for calcitonin – A new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology* 1962;70: 638–649.
- Copp DH, Cheney BA. Calcitonin – A hormone from the parathyroid that lowers the calcium level of the blood. *Nature* 1962;193:381–382.
- Foster GV, Baghdiantz A, Kumar MA, et al. Thyroid origin of calcitonin. *Nature* 1964;202:1303–1305.
- Foster GV, MacIntyre I, Pearce AGE. Calcitonin production and the mitochondrion-rich cells of the dog thyroid. *Nature* 1964;203:1029–1030.
- Friedman J, Raisz LG. Thyrocalcitonin: Inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science* 1965;150:1465–1467.
- Copp DH, Cockcroft DW, Kueh Y. Calcitonin from ultimobranchial glands of dogfish and chickens. *Science* 1967;158:924–925.
- Potts JT, Niall HD, Keutmann HT, et al. The amino acid sequence of porcine thyrocalcitonin. *Proc Natl Acad Sci* 1968;59:1321–1328.
- Copp DH, Niall HD, Keutmann HT, Potts JT. Amino acid sequence of salmon ultimobranchial calcitonin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969;64:771–778.
- Neher R, Riniker B, Maier R, et al. Human calcitonin. *Nature* 1968;220:984–986.
- Rittel W, Brugger M, Kamber B, et al. Thyrocalcitonin. III. Die Synthesen des alpha-thyrocalcitonins. *Helv Chim Acta* 1968;51:924–928.
- Chambers TJ. Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin-induced quiescence. *J Cell Sci* 1982;57:247–253.
- Blahoš J. Kalcitonin a fosfokalciový metabolismus, jeho fyziologický a klinický význam. Thomayerova sbírka, 467, Praha, Avicenum 1974.
- Deftos LJ. Calcitonin. In: Favus, MJ (Ed.). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 6th ed. ASBMR, Washington, 2006, p. 115–117.
- Alevizaki M, Shiraishi A, Rasool FV, et al. The calcitonin-like sequence of the beta-CGRP gene. *Fed Eur Bone Soc Lett* 1986;206:47–52.
- Emson PC, Zaidi M. Further evidence for the origin of circulating calcitonin gene-related peptide in the rat. *J Physiol* 1989;412:297–308.
- Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related peptide. *NEJM* 2000; 342: 177–185.
- Durham PL. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine. *Headache* 2006;46 Suppl 1:S3–8.
- Deng PY, Li YJ. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides* 2005;26:1676–1685.
- Deftos LJ, Gagel R. Calcitonin and medullary thyroid carcinoma. In: Wyngarden JB, Bennett JC (Eds). *Cecil Textbook of Medicine*. 21 st ed. WB Saunders, Philadelphia, 2000, p.1406–1409.
- Gendrel D, Assicot M, Raymond J, et al. Procalcitonin as a marker for the early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996;128:570–573.
- Chiesa C, Panero A, Rossi A, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998;44(6): 1343–1344.
- Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:210–217.
- Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, et al. Forty years of calcitonin-where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre, FRS. *Bone* 2002;30:655–663.
- Zwerman O, Piepkorn B, Engelbach M, et al. Abnormal pentagastrin response in a patient with pseudohypoparathyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002;111:49–50.
- Štěpán J, Doležal T. Calcitonin. *Remedia* 2004;14:218–224.
- Deftos LJ. Syndromes involving multiple endocrine glands. In: Greenspan FS, Strewler GJ (Eds.). *Basic and clinical endocrinology*. 5th ed. Norwalk CT: Lange Medical Books, Appleton & Lange, 1997:753–769.
- Hay DB, Christopoulos G, Christopoulos A, et al. Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: Receptor activity modifying protein complexes. *Molec Pharmacol* 2005;67:1655–1665.
- Nicholson CG, Moseley JM, Sexton PM, et al. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. *Biochemical and autoradiographic characterization*. *J Clin Invest* 1986;78:355–360.
- Datta HK, Zaidi M, Wimalawansa SJ, et al. In vitro and in vivo effects of amylin and amylin-amide on calcium metabolism in the rat and rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:876–881.
- Zaidi M, Shankar VS, Huang CL-H, Pazianas M. Molecular mechanisms of calcitonin action. *Endocrine J* 1994;2:459–467.
- Samura A, Wada S, Suda S, et al. 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;141:3774–3782.
- Tverberg LA, Gustafson MF, Scott TL, et al. Induction of calcitonin and calcitonin receptor expression in rat mammary tissue during pregnancy. *Endocrinology* 2000;141:3696–3702.
- Holtrop NE, Raisz LJ, Simmons HA. The effects of parathyroid hormone, colchicines and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. *J Cell Biol* 1974;60:346–355.
- Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol* 1982;136:97–106.
- Yumita S, Nicholson GC, Rowe DJ, et al. Biphasic effect of calcitonin on tartrate-resistant acid phosphatase activity in isolated rat osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1991;6:591–591.
- Farley J, Dimai HP, Stilt-Coffing B, et al. P. Farley, T. Calcitonin increases the concentration of insulin-like growth factors in serum-free cultures of human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 2000;67:247–254.
- Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, et al. Effect of e-calcitonin on osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:317–321.
- Voss A, Liese S, Priemel M, et al. Uncovering the physiologic function of calcitonin using genetically modified mouse models. *J Bone Miner Res* 2005;20: S1–S41.
- Zaidi M, Shankar VS, Adebajo OA, et al. Regulation of extracellular calcium-sensing in rat osteoclasts by femtomolar calcitonin concentrations. *Am J Physiol* 1996;271:F637–F644.
- Kanis JA. The calcitonins. In: Kanis J.A ed. *Osteoporosis*. Blackwell Science Ltd; 1994:180–184.
- Miller SC, Bowman BM. Rapid inactivation and apoptosis of osteoclasts in the maternal skeleton during the bone remodeling reversal at the end of lactation. *Anat Rec (Hoboken)* 2007;290:65–73.
- Yoshimura M. Analgesic mechanism of calcitonin. *J Bone Miner Metab* 2000;18:230–233.
- Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1-alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:8253–8258.
- Bevilacqua M, Dominquez JJ, Righini V, et al. Increased gastrin and calcitonin secretion after oral calcium or peptones administration in patients with hypercalciuria: A clue to an alteration in calcium-sensing receptor activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1489–1494.
- Levy-Bohbot N, Patey M, Larbre H, et al. How to interpret hypercalcitoninemia? (ve francouzštině) *Rev Med Interne*. 2006;27:610–605.
- Wang J, Chow D, Heiati H, Shen WC. Reversible lipidization for the oral delivery of salmon calcitonin. *J Control Release* 2003;88:369–380.
- Youn YS, Jung JY, Oh SH, et al. Improved intestinal delivery of salmon calcitonin by Lys18-amine specific PEGylation: stability, permeability, pharmacokinetic behavior and in vivo hypocalcemic efficacy. *J Control Release* 2006;114:334–342.
- Cheng W, Satyanarayanajois S, Lim LY. Aqueous-soluble, non-reversible lipid conjugate of salmon calcitonin: synthesis, characterization and in vivo activity. *Pharm Res* 2007;24:99–110.
- Ogoshi M, Inoue K, Naruse K, Takei Y. Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. *Peptides* 2006;27:3154–3164.
- Nakamura M, Han B, Nunobiki O, Kakudo K. Adrenomedullin: a tumor progression factor via angiogenic control. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6:635–643.
- Bronský J, Průša R, Nevoral J. The role of amylin and related peptides in osteoporosis. *Clin Chim Acta* 2006;373:9–16.
- Foord SM, Topp SD, Abramo M, Holbrook JD. New methods for researching accessory proteins. *J Mol Neurosci* 2005;26:265–276.
- Notoya M, Arai R, Katafuchi T, et al. A novel member of the calcitonin gene-related peptide family, calcitonin receptor-stimulating peptide, inhibits the formation and activity of osteoclasts. *Eur J Pharmacol* 2007;560:234–239.
- Colman E, Hedin R, Swann J, Orloff D. A brief history of calcitonin. *Lancet* 2002; 359:885–886.
- Overgaard K, Lindsay R, Christiansen C. Patient responsiveness to calcitonin salmon nasal spray: A subanalysis of a 2-year study. *Clin Ther* 1995;17:680–685.
- Dempster DW. The contribution of trabecular architecture to cancellous bone quality. *J Bone Miner Res* 2000;15: 20–23.
- Miyao M, Hosoi T, Emi M, et al. Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin (CT) locus. *J Hum Genet* 2000; 45:346–350.