

**Prävention und Therapie der Osteoporose nach Herztransplantation  
mit Alfacalcidol**

Stephanie Englbrecht

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Prävention und Therapie der Osteoporose nach Herztransplantation  
mit Alfacalcidol**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Stephanie ENGLBRECHT, geb. FLORIAN  
aus München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Kreider-Stempfle

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Holger Böhm  
Priv. Doz. Dr. Ioannis Mylonas  
Priv. Doz. Dr. Ingo Kaczmarek

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Christiane Werner

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2010

Für meine Familie



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Hintergrund</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Grundlagen des Knochenstoffwechsels</b> .....	<b>6</b>
2.1.1	Zusammensetzung des Knochens .....	7
2.1.2	Regulation des Knochenstoffwechsels .....	9
<b>2.2</b>	<b>Osteoporose</b> .....	<b>15</b>
2.2.1	Definition der Osteoporose .....	15
2.2.2	Einteilung der Formen der Osteoporose .....	16
2.2.3	Diagnostik der Osteoporose .....	18
<b>2.3</b>	<b>Pathogenese der Posttransplantations-Osteoporose</b> .....	<b>24</b>
2.3.1	Wirkmechanismen der immunsuppressiven Medikamente .....	24
2.3.2	Prävention und Therapie der Osteoporose .....	34
2.3.3	Stimulation der Knochenformation .....	46
<b>3</b>	<b>Methodik</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Studienpatienten</b> .....	<b>49</b>
3.1.1	Alfacalcidolgruppe .....	49
3.1.2	Historische Placebogruppe .....	50
<b>3.2</b>	<b>Studiendesign</b> .....	<b>51</b>
3.2.1	Alfacalcidolgruppe .....	51
3.2.2	Placebogruppe .....	51
<b>3.3</b>	<b>Einschlusskriterien</b> .....	<b>52</b>
<b>3.4</b>	<b>Ausschlusskriterien</b> .....	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Untersuchungsmethoden</b> .....	<b>52</b>
3.5.1	Anamnese und körperliche Untersuchung .....	52
3.5.2	Knochendichtemessungen .....	53
3.5.3	Radiologische Untersuchungen .....	54
3.5.4	Biochemische Untersuchung des Knochenstoffwechsels .....	54
3.5.5	Untersuchung spezifischer Knochenmarker .....	55
<b>3.6</b>	<b>Statistische Analyse</b> .....	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Tacrolimus-basierende Immunsuppression</b> .....	<b>57</b>
4.1.1	Patientendaten .....	57

4.1.2	Biochemische Untersuchungen .....	57
4.1.3	Sexualhormonstatus .....	62
4.1.4	Untersuchung spezifischer Knochenmarker .....	62
4.1.5	Knochendichtemessungen .....	63
4.1.6	Radiologische Untersuchungen .....	69
<b>4.2</b>	<b>Cyclosporin A-basierende Immunsuppression .....</b>	<b>70</b>
4.2.1	Patientendaten.....	70
4.2.2	Biochemische Untersuchungen .....	70
4.2.3	Sexualhormonstatus .....	75
4.2.4	Untersuchung spezifischer Knochenmarker .....	75
4.2.5	Knochendichtemessungen .....	76
4.2.6	Radiologische Untersuchungen .....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Biochemische Untersuchungen des Knochenstoffwechsels.....</b>	<b>82</b>
5.1.1	Parathormon .....	82
5.1.2	Sexualhormonstatus .....	84
5.1.3	Untersuchung spezifischer Knochenmarker .....	85
<b>5.2</b>	<b>Knochendichtemessungen.....</b>	<b>86</b>
5.2.1	Quantitative Computertomographie .....	86
5.2.2	Digitale Radiographie .....	87
5.2.3	Radiologische Untersuchungen .....	89
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>104</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Zyklus des „bone remodeling“ <a href="http://www.umich.edu/news/Releases/2005/Feb05/img/bone.jpg">http://www.umich.edu/news/Releases/2005/Feb05/img/bone.jpg</a> , aufgerufen am 22.11.2009	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellen des Knochengewebes [3] <a href="http://www.roche.com/pages/facetten/11/schemaknochenz.jpg">http://www.roche.com/pages/facetten/11/schemaknochenz.jpg</a> , aufgerufen am 22.11.2009	7
Abbildung 3: Hormonelle Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels <a href="http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/Knochen.jpg">http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/Knochen.jpg</a> , aufgerufen am 22.11.2009	10
Abbildung 4: Vitamin-D-Stoffwechsel <a href="http://www.fet-ev.eu/Presse/images/XDEKBqlstu239/633721284746250000.png">http://www.fet-ev.eu/Presse/images/XDEKBqlstu239/633721284746250000.png</a> , aufgerufen am 22.11.2009	11
Abbildung 5: Wirkung der Zytokine auf den Knochenstoffwechsel <a href="http://journals.prous.com/journals/dnp/20041701/html/dn170019/images/Troen_f1.gif">http://journals.prous.com/journals/dnp/20041701/html/dn170019/images/Troen_f1.gif</a> , aufgerufen am 22.11.2009	13
Abbildung 6: Einteilung der Osteoporose nach Osteodensitometrie- und Röntgenbefunden [91] <a href="http://www.schmerz-therapie-deutschland.de/pages/zeitschrift/z4_99/images/tab_06.gif">http://www.schmerz-therapie-deutschland.de/pages/zeitschrift/z4_99/images/tab_06.gif</a> , aufgerufen am 22.11.2009	21
Abbildung 7: Molekularer Wirkmechanismus von Tacrolimus und Cyclosporin A [125]	25
Abbildung 8: Überblick über die wichtigsten Wirkungen von Glukokortikosteroiden auf den Knochen [125]	30
Abbildung 9: Wirkungen der Glukokortikosteroide auf Wachstumsfaktoren und Knochen [125]	31
Abbildung 10: Metabolismus und Wirkmechanismus von Mycophenolat Mofetil	33
Abbildung 11: Metabolismus von Vitamin D <sub>3</sub> und Alfacalcidol [13]	35
Abbildung 12: Regulation der Calciumhomöostase im Blut durch Vitamin D <a href="http://www.fet-ev.eu/Presse/images/XDEKBdyxop251/633731543551077591.png">http://www.fet-ev.eu/Presse/images/XDEKBdyxop251/633731543551077591.png</a> , aufgerufen am 22.11.2009	36
Abbildung 13: Schematische Darstellung des pharmakokinetischen Profils	39
Abbildung 14: Unterschiede bei der Versorgung des Knochens mit 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> nach oraler Verabreichung von 1α(OH)D <sub>3</sub> und 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> [13]	40

Abbildung 15: Molekulare Struktur der Bisphosphonate <a href="http://www.roche.de/pharma/indikation/onkologie/knochenmetastasen/images/struktur_bisphosphonat.jpg">http://www.roche.de/pharma/indikation/onkologie/knochenmetastasen/images/struktur_bisphosphonat.jpg</a> , aufgerufen am 06.12.2009 .....	44
Abbildung 16: Auflistung der in der Klinik verwendeten Bisphosphonate <a href="http://wpcontent.answers.com/wikipedia/en/thumb/b/b5/Bisphosphonate_side_chains.png/350px-Bisphosphonate_side_chains.png">http://wpcontent.answers.com/wikipedia/en/thumb/b/b5/Bisphosphonate_side_chains.png/350px-Bisphosphonate_side_chains.png</a> , aufgerufen am 06.12.09 .....	44
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der Patienten unter Tacrolimus bei Studieneinschluss mit normalen und erhöhtem iPTH .....	60
Abbildung 18: Prozentualer Anteil an Patienten unter Tacrolimus mit normalem und erhöhtem iPTH Basis vs. 12 Monate .....	61
Abbildung 19: Vertebrale Knochendichte herztransplantierter Patienten unter Tacrolimus im Vergleich zu einem Normalkollektiv .....	64
Abbildung 20: Prozentualer Anteil der Patienten unter Tacrolimus in der Alfacalcidolgruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate.....	65
Abbildung 21: Prozentualer Anteil der Patienten unter Tacrolimus in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate.....	66
Abbildung 22: Knochendichte der LWS von Patienten unter Tacrolimus bei Studienbeginn und 12 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo .....	67
Abbildung 23: Knochendichteänderung unter Tacrolimus 12 und 24 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo .....	68
Abbildung 24: Knochendichte der LWS, normogonade vs. hypogonade Patienten unter Tacrolimus .....	69
Abbildung 25: Prozentualer Anteil der Patienten unter Cyclosporin A bei Studieneinschluss mit normalem und erhöhtem iPTH .....	73
Abbildung 26: Prozentualer Anteil an Patienten unter Cyclosporin A mit normalem und erhöhtem iPTH, Basis vs. 12 Monate.....	74
Abbildung 27: Vertebrale Knochendichte herztransplantierter Patienten unter Cyclosporin A im Vergleich zu einem Normalkollektiv .....	77
Abbildung 28: Prozentualer Anteil der Patienten unter Cyclosporin A in der Alfacalcidolgruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie,	

---

Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate.....	78
Abbildung 29: Prozentualer Anteil der Patienten unter Cyclosporin A in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate.....	79
Abbildung 30: Knochendichte der LWS von Patienten unter Cyclosporin A bei Studienbeginn und 12 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo .....	80
Abbildung 31: Knochendichteänderung unter Cyclosporin A 12 und 24 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo .....	80
Abbildung 32: Knochendichte der LWS, normogonade vs. hypogonade Patienten unter Cyclosporin A unterteilt in die Alfacalcidol-und Placebogruppe	81

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Osteoporosen nach der Äthiologie (nach Bartl) [3] .....	17
Tabelle 2: Übersicht über die biochemische Parameter in Serum und Urin und den Analysezeitpunkt.....	55
Tabelle 3: Patientencharakteristika nach HTx unter Tacrolimus unterteilt nach Alfalcidol und Placebo.....	57
Tabelle 4: Basisdaten der biochemischen Untersuchungen nach HTx unter Tacrolimus unterteilt in Alfalcidol- und Placebogruppe.....	58
Tabelle 5: Biochemische Untersuchungen des Knochenstoffwechsels nach HTx unter Tacrolimus bei Einschluss und nach 12 Monaten unterteilt in Alfalcidol und Placebo.....	59
Tabelle 6: Basisdaten des Sexualhormonhaushaltes männlicher Patienten unter Tacrolimus nach Studieneinschluss unterteilt in Alfalcidol- und Placebogruppe.....	62
Tabelle 7: Spezifische Knochenmarker von Patienten unter Tacrolimus bei Einschluss, nach 3 und 12 Monaten unterteilt in Alfalcidol und Placebo .....	63
Tabelle 8: Patientencharakteristika nach HTx unter Cyclosporin A unterteilt nach Alfalcidol und Placebo.....	70
Tabelle 9: Basisdaten der biochemischen Untersuchungen nach HTx unter Cyclosporin A unterteilt in Alfalcidol- und Placebogruppe.....	71
Tabelle 10: Biochemische Untersuchungen des Knochenstoffwechsels unter Cyclosporin A bei Einschluss und nach 12 Monaten unterteilt in Alfalcidol und Placebo.....	72
Tabelle 11: Basisdaten des Sexualhormonhaushaltes männlicher Patienten unter Cyclosporin A nach Studieneinschluss unterteilt in Alfalcidol- und Placebogruppe.....	75
Tabelle 12: Spezifische Knochenmarker von Patienten unter Cyclosporin A bei Einschluss, nach 3 und 12 Monaten unterteilt in Alfalcidol und Placebo .....	76

**Abkürzungsverzeichnis**

1,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> (Calcitriol)
1α-OH-D <sub>3</sub>	1α-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub> (Alfacalcidol)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APH	Alkalische Phosphatase
BMD	Knochenmineralsalzdichte
BGP	Bone gla proteine
Ca	Serum Calcium
Cr	Serum Creatinin
CrCl	Creatininclearance
CSF-1	colony-stimulating factor-1
CyA	Cyclosporin A
dCMP	Dilatative Kardiomyopathie
DEXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometry
DNA	Desoxyribonuclein acid
DPD	Desoxypyridinolin
ELISA	Enzym linked immunosorbent Assay
FK 506	Tacrolimus
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FSHT	Follikelstimulierendes Hormon nach Stimulation
FT3	Freies Trijodthyronin
FT4	Freies Thyroxin
GH	Growth hormone
GM-CSF	Granocyte monocyte colony stimulation factor
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
HA	Hydroxylapatit
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HRT	Hormone Replacement Therapy
HTx	Herztransplantation
iCMP	Ischämische Kardiomyopathie
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IL	Interleukin
IFN-gamma	Interferon-gamma

---

iPTH	Intaktes Parathormon
ISHLT	International society of heart and lung transplantation
KAPH	Knochenspezifische alkalische Phosphatase
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Releasing Hormon für luteinisierende Hormone
LHT	Luteinisierendes Hormon nach Stimulation
LWK	Lendenwirbelkörper
LWS	Lendenwirbelsäule
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NTx	Amino-terminales Telopeptid des Typ-I-Kollagen
Oc	Osteocalcin
ODF	Osteoclast differation factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin ligand
P	Serum Phosphat
p	Statistische Signifikanz
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF	Prostaglandin F
PICP	Carboxyterminales Propeptid vom Typ I Prokollagen
PINP	N-terminales Propeptid des Typ-I-Kollagens
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
POP	Post OP
PYD	Pyridinolin
QCT	Quantitative Computertomographie
QDR	Quantitative digitale Radiographie
RANK	Receptor activator of nuklear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuklear factor kappa-B ligand
ROI	Region of interest
SD	Standardabweichung

SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulators
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
TRANCE	tumor necrosis factor-related activation induced cytokine
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
VBD	Vertebrale Knochendichte
vs.	versus

## 1 Einleitung

Die Osteoporose ist als systemische Skeletterkrankung definiert, die durch eine unzureichende Knochenfestigkeit charakterisiert ist, welche zu einem erhöhten Frakturrisiko prädisponiert. Die Knochenfestigkeit spiegelt dabei primär das Zusammenwirken von Knochendichte und Knochenqualität wieder [11]. Sie ist die häufigste metabolische Knochenerkrankung und damit relevant im Hinblick auf Mortalität, Morbidität und Kostenverursachung im Gesundheitswesen. Laut Weltgesundheitsbehörde (WHO) gehört diese Erkrankung zu den zehn häufigsten Krankheiten weltweit. Allein in Deutschland werden die Kosten im Zusammenhang mit dieser Erkrankung jährlich auf über 2 Mrd. Euro beziffert. Durch die demographischen Veränderungen mit zunehmendem Anteil älterer Menschen rückt die Osteoporosediagnostik und –prophylaxe immer mehr ins Zentrum des wissenschaftlichen und klinischen Interesses. [3, 57, 62]

Nach der Ätiologie wird zwischen primären und sekundären Osteoporosen unterschieden. Sekundäre Osteoporosen werden unter anderem durch zahlreiche Medikamente wie Glukokortikoide, Immunsuppressiva, Antikoagulanzen, Antikonvulsiva und Schilddrüsenhormone verursacht. Die häufigste sekundäre Osteoporose ist die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose [13]. Hierzu zählt auch die Posttransplantationsosteoporose.

Die Herztransplantation hat sich in den letzten drei Jahrzehnten immer mehr als ultima ratio in der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz etabliert. Durch die zunehmende Erfahrung mit den operativen Techniken und immer weiter fortschreitende Optimierung der immunsuppressiven Therapie und damit Minimierung von Abstoßungsreaktionen, liegt die mittlere Ein-Jahres-Überlebensrate der Herztransplantationspatienten derzeit bei 85 %, im weiteren Verlauf ist mit einer Mortalitätsrate von 3 % pro Jahr zu rechnen. [132]

Durch die wachsende Anzahl langzeitüberlebender Patienten ergeben sich spezifische Probleme dieser Patientengruppe, die hauptsächlich durch die unerwünschten Nebenwirkungen der lebenslang notwendigen immunsuppressiven Therapie entstehen. Eines dieser Probleme ist die oben erwähnte Störung des Knochenstoffwechsels mit nachfolgender Entwicklung einer Osteoporose.

Meist ist die Knochendichte bereits vor der Transplantation vermindert. Zu den multifaktoriellen Ursachen zählen die kardial bedingte Malnutrition und Kachexie aufgrund

des erniedrigten Herzauswurfvolumens bei Patienten vor Herztransplantation. Hinzu kommen krankheitsbedingte Inaktivität und Bettlägerigkeit, sowie Medikation mit Heparin oder Schleifendiuretika, die ebenfalls einen Knochenmasseverlust induzieren. [81]

Trotz vieler schwerwiegender Nebenwirkungen stellen Glukokortikosteroide einen wichtigen Bestandteil in der Immunsuppression zur Prophylaxe und Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation dar. Durch die Kombination mit anderen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Tacrolimus konnte die Steroiddosis um bis zu 50 % verringert werden. Trotzdem kommen relativ hohe Steroiddosierungen für die Prophylaxe (ca. 0.1 mg/kg) und Therapie (500-1000 mg/Tag über 3 Tage) akuter Abstoßungsreaktionen zur Anwendung. Die klinische Manifestation einer Osteoporose unter Glukokortikoid-Therapie zeigt eine große Schwankungsbreite, die durch die variable Ausgangsmasse an Knochensubstanz bedingt ist. Der Knochenmasseverlust resultiert unter anderem vor allem aus einer Störung der Calciumhomöostase sowie einer verringerten Sekretion von Sexualhormonen. [126]

Die Immunsuppression führt nach Herztransplantation bei 90 % der Patienten zu einem progredienten Verlust der Knochenmasse mit einer Betonung in den ersten sechs bis zwölf Monaten. Die Hauptursache für den massiven Knochenmasseverlust innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation ist zum einen die höhere Dosis der immunsuppressiven Kombinationstherapie, zum anderen das häufigere Auftreten von Abstoßungsreaktionen, die mit einer Bolus-Gabe von Glukokortikoiden behandelt werden. Der Knochenmasseverlust kann im ersten postoperativen Jahr bis zu 20 % betragen. Cross-sektionale Studien ergaben eine Prävalenz von Wirbelkörperfrakturen von 18 % - 50 % nach Herztransplantation. [24, 58, 71, 116, 123] Die äußerst schmerzhaften Frakturen führen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität und kostenintensiven Behandlungen. Daher sollte bereits zu Beginn der immunsuppressiven Therapie eine Osteoporosedagnostik und gegebenenfalls eine Osteoporoseprophylaxe eingeleitet werden. Bei einer über drei oder mehr Monate geplanten oder bereits laufenden Glukokortikoidtherapie ist bereits bei einer Dosis von 2,5 mg Prednisolonäquivalent ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko nachgewiesen [10]. Zur Prävention und Therapie der Posttransplantationsosteoporose stehen verschiedene Präparate zur Verfügung, die die Knochenformation stimulieren oder die Knochensresorption hemmen.

Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) gehört zu der Gruppe der Knochenresorption hemmenden Medikamente. Es wird durch Photolyse in der Haut bei UV-Bestrahlung aus 7-Dehydrocholesterin synthetisiert. Eine andere Quelle ist Ergosterin aus der Nahrung. Vitamin D selbst ist biologisch inaktiv, erst durch die Hydroxylierung in der Leber durch die 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol und die weitere Hydroxylierung in der Niere führen zu 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, der biologisch aktiven Form von Vitamin D. Dieser Schritt ist abhängig vom Blut-Calcium-Spiegel. Calcitriol ist damit neben Parathormon und Calcitonin das dritte steuernde Hormon des Calcium-Phosphatstoffwechsels.

Stempfle et al. konnten in ihrer Studie keinen zusätzlichen Effekt von Calcitriol im Bezug auf die Knochendichte und die Frakturrate bei Patienten nach Herztransplantation nachweisen. Erhöhte Knochenresorptionsmarker normalisierten sich jedoch signifikant innerhalb eines Jahres unter der Therapie mit Calcitriol und bei den Patienten der Calcitriolgruppe, die innerhalb eines Jahres nach Herztransplantation in die Studie aufgenommen worden waren, konnte eine Zunahme der Knochendichte nachgewiesen werden [127]. In einer weiteren Arbeit dieser Arbeitsgruppe konnte bei Patienten, die frühzeitig nach Herztransplantation mit Calcitriol behandelt wurden, eine statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte an der LWS und eine Stabilisierung der Knochendichte am Femur nachgewiesen werden [128].

Das in der vorliegenden Studie verwendete Alfacalcidol ist ein synthetisch hergestellter Vitamin D-Metabolit. Die Substanz wird nach enteraler Resorption in der Leber, durch Hydroxylierung an Position 25, in die hormonell aktive Verbindung Calcitriol umgewandelt. Alfacalcidol selbst besitzt eine niedrige biologische Aktivität und kann somit als Prodrug angesehen werden. Alfacalcidol und Calcitriol sind hinsichtlich ihres Wirkmechanismus identisch, es bestehen aber Unterschiede in der Pharmakokinetik [13]. Im Tierversuch wurde die 25-Hydroxylase auch im Knochen nachgewiesen, so dass es nach Alfacalcidolgabe auch im Knochen zur Metabolisierung von Alfacalcidol zu Calcitriol kommt. Diese duale Aktivierung in Leber und Knochen führt zu einer höheren Konzentration von Calcitriol im Knochen nach Alfacalcidolgabe als nach Calcitriolgabe. [47]

In zahlreichen Studien, sowohl tierexperimentell, als auch klinisch, erwies sich Alfacalcidol als effektiv in der Behandlung der Osteoporose.

Geusens et al. [15, 33] konnten in ihrer tierexperimentellen Studie bei einer Behandlung ovariectomierter Ratten mit Alfacalcidol eine statistisch signifikant höhere Zunahme der Knochendichte nachweisen als bei der Behandlung mit Östrogenen.

Vanschoubroek et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Alfacalcidol in der Behandlung der Posttransplantationsosteoporose den Knochenmasseverlust effektiver verringert als Editronate. [16]

In der Studie von Cooper et al. wurde durch die Gabe von Alfacalcidol für 28 Tage bei zehn Patienten nach Herztransplantation eine Reduktion des Serum-PTH-Spiegels um 42 %, sowie eine Reduktion von NTx im Urin, einem Knochenresorptionsmarker, um 40 % erreicht [100].

Reginster et al. [86] zeigten in der ersten doppelt-blinden placebokontrollierten Studie bei kortikoidinduzierter Osteoporose bei unterschiedlichsten Grunderkrankungen eine statistisch signifikant geringere Abnahme der Knochendichte unter der Behandlung mit Alfacalcidol im Vergleich zu Placebo.

Die vorliegende prospektive longitudinale Studie wurde mit dem Ziel konzipiert, den Effekt einer Behandlung mit Alfacalcidol gegenüber einer Placebogabe zusätzlich zur Basistherapie mit Calcium und Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus im Hinblick auf Zunahme der Knochendichte, Parameter des Knochenmetabolismus und neu aufgetretenen Frakturen in der Osteoporoseprophylaxe und -therapie von Patienten nach Herztransplantation aufzuzeigen.

Mit der nachfolgenden Untersuchung sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie häufig tritt eine Osteopathie nach orthotoper Herztransplantation auf?
2. Wie häufig tritt nach orthotoper Herztransplantation eine Parathormonerhöhung auf?
3. Wie hoch ist der Anteil männlicher Patienten mit Hypogonadismus nach orthotoper Herztransplantation ?  
Ergibt sich daraus bereits ein Effekt auf die Knochendichte?

4. Wie entwickeln sich die biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels ein Jahr nach Studieneinschluss in der Placebogruppe im Vergleich zur Alfacalcidolgruppe ?
5. Wie entwickelt sich die Knochendichte ein Jahr nach Studieneinschluss in der Placebogruppe im Vergleich zur Alfacalcidolgruppe ?  
Wie hoch ist die Frakturrate ein Jahr nach Studieneinschluss in der Placebogruppe im Vergleich zur Alfacalcidolgruppe ?
6. Ist eine Calcium - und Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus ausreichend für die Prävention und Therapie der Posttransplantationsosteoporose oder hat die Gabe von Alfacalcidol zusätzlich einen positiven Effekt auf den Knochenstoffwechsel?
7. Wie ist das Nebenwirkungsprofil von Alfacalcidol in der Prävention und Therapie der Posttransplantationsosteoporose?

## 2 Hintergrund

### 2.1 Grundlagen des Knochenstoffwechsels

Das Knochengewebe besteht zu 80 % aus einer außenliegenden Kortikalis oder Compacta (Substantia corticalis) und zu 20 % aus einem innen liegenden spongiösen oder trabekulären Gewebe (Substantia spongiosa). Es ist auch nach dem Wachstum einer ständigen Umgestaltung, dem sogenannten „bone remodeling“, unterworfen. Der Zyklus des „bone remodeling“ dauert 120 Tage. Der Zyklus startet mit einer Aktivierungsphase, die eine erhöhte Differenzierung von Osteoklasten bewirkt. In der zweiten Phase findet die Resorption von Knochengewebe durch die Osteoklasten statt. Sie dauert ungefähr 15 Tage. (Abbildung 1)

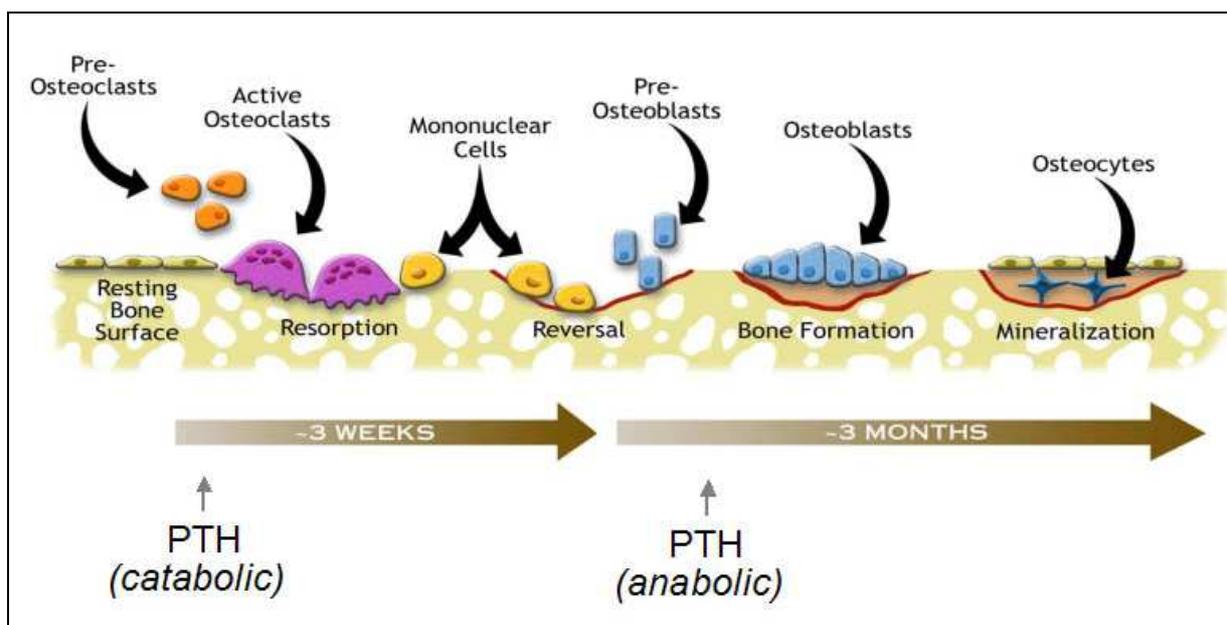


Abbildung 1: Der Zyklus des „bone remodeling“

Osteoklasten heften sich an das Knochengewebe an und bauen es durch proteolytische Verdauung ab. Nachdem die Osteoklasten die Resorptionslakune verlassen haben, wandern Osteoblasten in dieses Gebiet ein, und synthetisieren Osteoid, eine Matrix aus Kollagen und nichtkollagenen Proteinen, welches anschließend mineralisiert wird. Durch diese beiden eng aneinander gekoppelten Prozesse werden jährlich 25 % Spongiosa und 3 % Kortikalis erneuert. Dies erklärt, weshalb osteoporotische Veränderungen, die das Ergebnis eines abnormen Knochenstoffwechsels darstellen, vor allem am trabekulären Knochen auftreten.

Das Gleichgewicht von Knochenresorption und Knochenformation wird durch lokale Faktoren, die von Osteoklasten und Osteoblasten gebildet werden, reguliert. [3, 78, 79]

### 2.1.1 Zusammensetzung des Knochens

Knochen ist aus Zellen, organischer Matrix (35 %), Mineralphase (65 %) und Wasser zusammengesetzt.

Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Zellen des Knochengewebes: Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und endostale Belegzellen (lining cells).

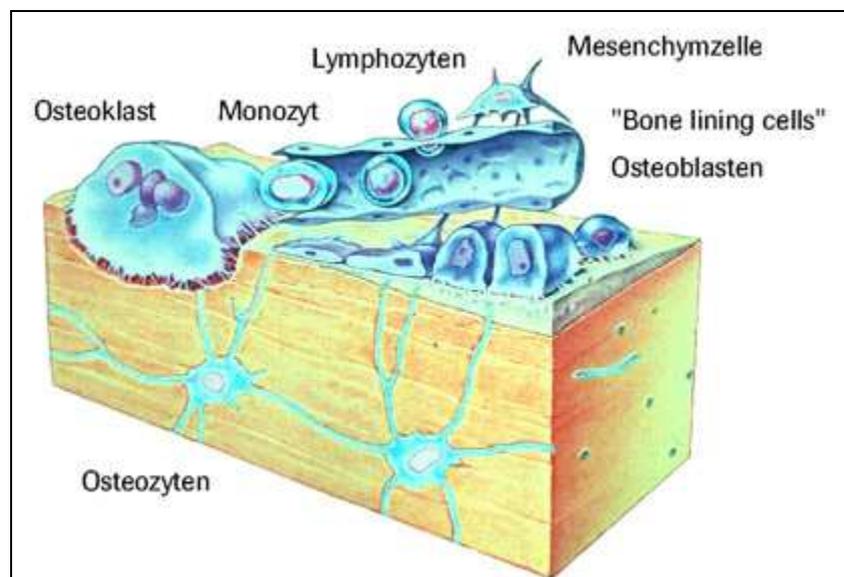


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellen des Knochengewebes [3]

#### 2.1.1.1 Zellen

##### 2.1.1.1.1 Osteoblasten

Osteoblasten entstehen beim Embryo aus der osteongenetischen Stammzelle, die ihrerseits aus Mesenchymzellen hervorgehen. Die pluripotente Stammzelle entwickelt sich über osteogene Progenitorzellen zu Präosteoblasten und schließlich zu Osteoblasten. Die Hauptfunktion der Osteoblasten ist die Produktion von Knochenmatrix und deren anschließende Mineralisierung. Sie liegen epithelartig in einer Reihe an der Oberfläche des Knochens und sezernieren die aus glykoproteidhaltiger Grundsubstanz und kollagenen Fibrillen bestehende Interzellulärsubstanz, das Osteoid. In einem nächsten Schritt wird diese Matrix extrazellulär calcifiziert. Die Proliferation, Rekrutierung und Änderung der Aktivität von Osteoblasten ist zur Knochenformation erforderlich und wird durch Hormone und Zytokine reguliert. [3]

#### 2.1.1.1.2 Osteozyten

Etwa jeder zehnte an der Knochenoberfläche liegende Osteoblast wird in das neu gebildete Knochengewebe eingebaut und entwickelt sich zu Osteozyten.

Osteozyten sind nicht mehr teilungsfähige Knochenzellen. Die Funktion der Osteozyten ist noch wenig erforscht. Sie sind in Lakunen angesiedelt und stehen untereinander und mit den Osteoblasten über langstreckige, zytoplasmatische Fortsätze in Verbindung. Sie ermöglichen eine direkte Kommunikation zwischen den Zellen und spielen eine wichtige Rolle beim Transport von organischen und anorganischen Stoffen im Knocheninneren. [3, 21, 77]

#### 2.1.1.1.3 Endostale Belegzellen

Endostale Belegzellen (lining cells) sind flache Zellen und bedecken 80-95 % der Knochenoberfläche. Man nimmt eine Abstammung von inaktiven Osteoblasten an. Sie bilden eine Schutzschicht und eine Überwachungseinheit zusammen mit dem Kanalsystem der Osteozyten. Es wird ihnen eine neue Funktion in der Aktivierungsphase der Osteoklasten zugeschrieben. Auf der Oberfläche der lining cells und der Osteoblasten-Vorstufen werden verschiedene Oberflächenmoleküle exprimiert, die mit dem Rezeptormolekül RANK (receptor activator of nuklear factor kappa-B) auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläufer agieren und so den Umbauzyklus anstoßen. Als wichtige Faktoren sind bisher analysiert worden: ODF (osteoclast differentiation factor), OPGL (osteoprotegerin ligand), TRANCE (tumor necrosis factor-related activation induced cytokine) und RANK. [3, 26, 80]

#### 2.1.1.1.4 Osteoklasten

Osteoklasten entstehen durch Fusion von Zellen des mononukleären Phagozytensystems aus dem Knochenmark, die entweder über den Blutkreislauf oder durch direkte Migration aus dem Knochenmark in den Knochen gelangen. Sie haben charakteristischer Weise mehrere Zellkerne. Osteoklasten besitzen die Fähigkeit, den Knochen mittels lytischer Enzyme zu resorbieren. Es entstehen Erosionsbuchten, die sogenannten Howshipschen Lakunen, die durch ihre lakunäre Resorption entstanden sind. Die Knochenresorption wird durch die Rekrutierung neuer Osteoklasten und die Veränderung der Aktivität reifer Osteoklasten gesteuert. Diese Vorgänge werden ebenfalls durch Hormone und Zytokine beeinflusst. [3, 83, 84]

Unter physiologischen Bedingungen entspricht die Abbauleistung eines Osteoklasten etwa der Aufbauleistung von zehn Osteoblasten.

### 2.1.1.2 Organische Matrix

Die organische Matrix des Knochengewebes besteht zu 90 % aus Kollagen-Typ I. Der restliche Anteil der organischen Matrix ist aus verschiedenen nichtkollagenen Proteinen, wie Osteocalcin, aufgebaut.

### 2.1.1.3 Mineralphase

Die Mineralphase setzt sich aus kleinen Kristallen in Form von Nadeln, Plättchen und Stäbchen zusammen, die innerhalb oder zwischen den Kollagen-Fibrillen angeordnet sind. Die Hauptbestandteile dieser anorganischen Matrix stellen Calcium und Phosphat dar, die das chemische Gerüst Calcium-Hydroxylapatit bilden. Es enthält unter anderem Carbonate, Magnesium, Natrium, Fluor und Strontium. Diese sind entweder in das Kristallgitter eingebunden oder an die Oberfläche der Kristallstruktur adsorbiert. [97]

## 2.1.2 Regulation des Knochenstoffwechsels

### 2.1.2.1 Calciumhomöostase

Calcium liegt im Blut proteingebunden, komplexgebunden oder frei vor. Die Konzentration von Calcium im Blut wird über verschiedene Regelmechanismen in sehr engen Grenzen gehalten. Die Höhe des Serum-Calciums ist abhängig vom Fluss zwischen Blut und den Zielorganen Intestinum, Knochen und Niere. Die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase wird durch die Hormone Parathormon, Calcitonin und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> gewährleistet.

Der Hauptregulator ist dabei das in der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon. Ein Abfall des ionisierten Calciums im Blut bewirkt eine Freisetzung von Parathormon. Dies erhöht über lokale Zellsignale der Osteoblasten an die Osteoklasten die Knochenresorption und die tubuläre Reabsorption von Calcium, dadurch wird auch die intestinale Absorption von Calcium gesteigert. Diese Mechanismen werden über eine negative Feedback-Hemmung geregelt, das heißt, steigt die Konzentration von Calcium im Serum an, wird weniger Parathormon freigesetzt.

Calcitonin ist ein Hormon, das in den C-Zellen der Nebenschilddrüse gebildet wird. Es senkt die Calcium- und Phosphatkonzentration im Blut, indem es den Einbau in den Knochen fördert und die osteoklastische Knochenresorption hemmt. Calcitonin ist damit der Antagonist zu Parathormon. Der Regelkreis unterliegt einer positiven Feedback-Hemmung, das heißt, eine erhöhte Calciumkonzentration im Blut setzt verstärkt Calcitonin frei. Das bewirkt, dass es über eine Beeinflussung der Oste-

oblasten und Osteoklasten, sowie der renalen Calciumrückresorption, zu einer Senkung des Calciumblutspiegels kommt.  $1,25\text{-(OH)}^2\text{-Vitamin D}_3$  steigert die intestinale Calcium-Absorption und verringert die Knochenresorption. (Abbildung 3)

Dieser Regelkreis unterliegt wie beim Parathormon einem negativen Feedback-Mechanismus. [7, 42, 87]

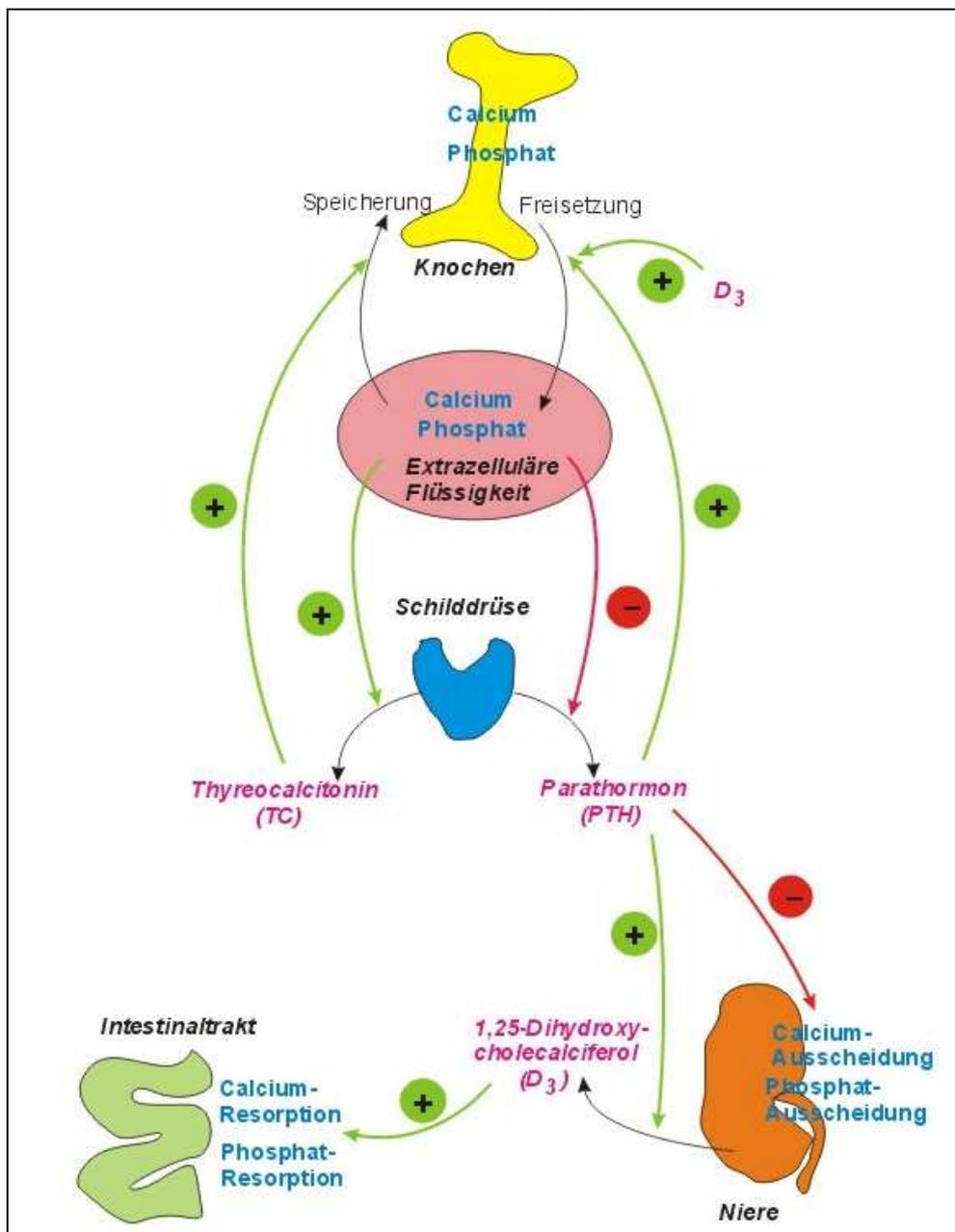


Abbildung 3: Hormonelle Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels

#### 2.1.2.2 Vitamin D-Stoffwechsel

Prävitamin D<sub>3</sub> wird in der Haut durch UV-Bestrahlung aus 7-Dehydrocholesterin synthetisiert. Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) wird dann spontan durch Körperwärme isome-

risiert. Eine weitere Quelle für Vitamin D stellt das in der Nahrung enthaltene Ergosterin dar, welches als Lieferant für Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>) dient. Cholecalciferol und Ergocalciferol unterscheiden sich nur in einer Seitenkette. Abgesehen von diesem Unterschied werden Vitamin D<sub>2</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> auf identische Weise metabolisiert und haben die selben biologischen Effekte.

Vitamin D ist im Blut an das Vitamin D-binding Protein gekoppelt und wird so zur Leber transportiert. Dort wird es durch die mitochondriale 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol (25-(OH)-D<sub>3</sub>) verstoffwechselt. 25-Hydroxycholecalciferol stellt die Transport- und Speicherform von Vitamin D dar. Diese Verstoffwechslung wird durch Produkthemmung gesteuert, indem das gebildete 25-(OH)-D<sub>3</sub> eine weitere Synthese durch die Hemmung der 25-Hydroxylase drosselt.

Liegt ein ausgeglichener Calcium-Haushalt vor, so wird aus dem in der Niere anfallenden 25-(OH)-D<sub>3</sub> durch die 24-Hydroxylase 24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, ein nahezu inaktiver Metabolit, gebildet. [42,87] (Abbildung 4)

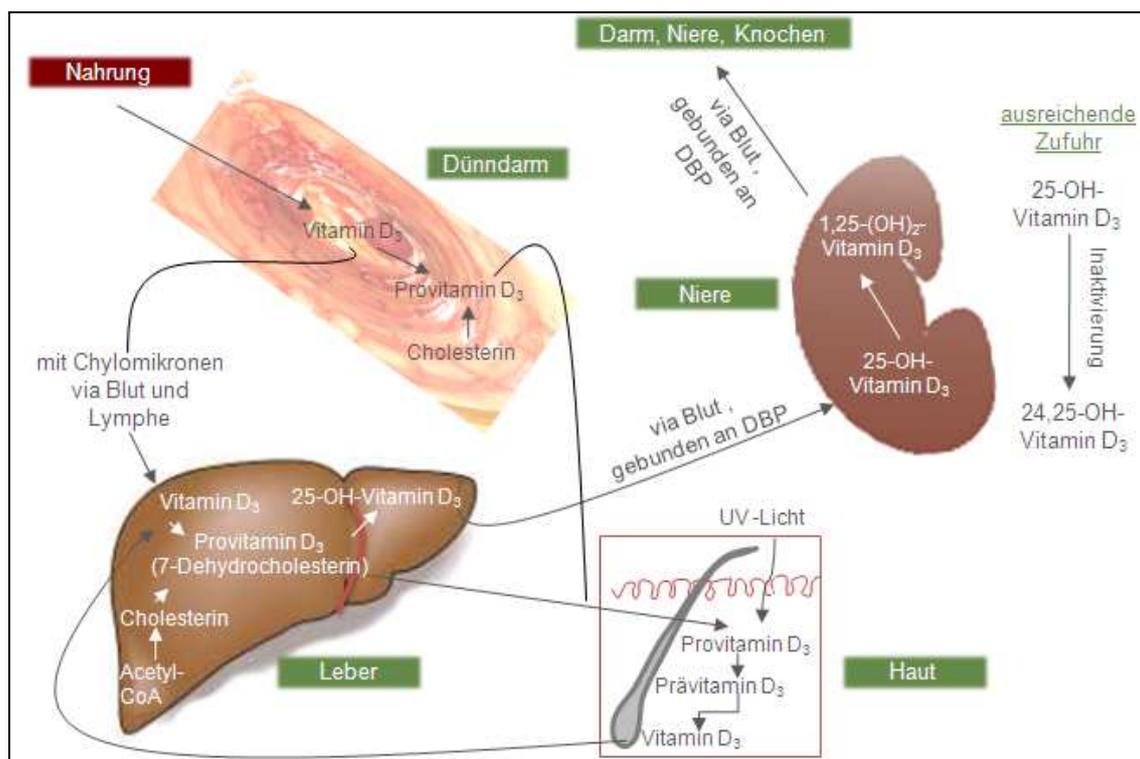


Abbildung 4: Vitamin-D-Stoffwechsel

### 2.1.2.3 Zytokine

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen isoliert werden. Neben einer übergeordneten systemischen Regulation des Kno-

chenstoffwechsels, dürfte die lokale Regulation von Knochenresorption und -Formation durch diese ortständigen Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung sein und sowohl autokrin als auch parakrin auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten und deren Vorstufen wirken. Zytokine die die Knochenresorption fördern sind Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), Granocyte monocyte colony stimulation factor (GM-CSF) und RANKL. Knochenresorptionshemmend wirken hingegen vor allem Interferon-gamma (IFN-gamma), Osteoprotegerin (OPG) und Interleukin-4 (IL-4). Darüber hinaus ist das Verhältnis von RANKL (receptor activator of nuklear factor kappa-B ligand) zu Osteoprotegerin für das Ausmaß der Knochenresorption bestimmend.

IL-1 war das erste Zytokin, bei dem Effekte auf die Knochenresorption durch Osteoklasten herausgefunden wurden. Es stimuliert die Knochenresorption durch direkte Wirkung auf die Osteoklasten und indirekte Steigerung der Knochenresorption über eine gesteigerte Prostaglandinsynthese. In vitro stimuliert IL-1 die Proliferation der Osteoblasten-ähnlichen Zellen, hemmt aber ihre Differenzierung.

Interleukin-6 (IL-6) wird in großen Mengen von Osteoblasten gebildet, scheint aber keinen Einfluss auf deren Funktion zu haben. Mundy et al. [72] erwähnten, dass es früher kontroverse Daten bezüglich des Einflusses auf die Knochenresorption durch IL-6 gab. Jetzt geht man davon aus, dass IL-6 die Proliferation von Osteoklasten-Vorläuferzellen stimulieren kann, auf reife Osteoklasten jedoch keinen Einfluss hat. Es wird aber vermutet, dass IL-6 einer der Hauptfaktoren in der Regulation der Osteoklastendifferenzierung ist. IL-6 stimuliert in Kombination mit IL-1 die Knochenresorption. Die humanen Osteoklasten haben IL-6 Rezeptoren, über die die resorptive Aktivität der Zelle gesteuert werden kann. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-6 durch Östradiolgabe gehemmt wird. Durch IL-6-Antikörpergabe konnte die nach Ovariectomie steigende Osteoklasten-Zahl in der Spongiosa eingedämmt werden. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch an menschlichen Zellen nicht reproduzieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass IL-6 unter Stimulation von Parathormon vermehrt von Osteoblasten gebildet wird und somit die resorptive Aktivität von Parathormon vermittelt. [18, 59, 72, 108]

TNF-alpha stimuliert die Bildung von colony-stimulating factor-1 (CSF-1), einen für die Osteoklastenbildung wichtigen Faktor. TNF-alpha und IL-1 induzieren in osteoblastenähnlichen Zellen die Bildung des Osteoklastendifferenzierungsfaktors Oste-

oprotegerin ligand (ODF). Weiterhin hemmt TNF-alpha die Kollagensynthese, die alkalische Phosphatase und die Osteocalcinsynthese in Osteoblasten. [108]

RANKL ist ein weiteres wichtiges Zytokin für die Aktivierung von Osteoklasten. Es wird als transmembranes Protein auf der Oberfläche von Zellen, insbesondere von Osteoblasten, exprimiert, liegt aber auch in einer proteolytisch freigesetzten, löslichen Form vor. Die Bindung von RANKL an RANK ist für die Reifung der Präosteoklasten sowie für die Aktivierung und das Überleben von reifen Osteoklasten verantwortlich. Antagonist von RANKL ist Osteoprotegerin (OPG), ein lösliches Protein, das ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird. OPG hemmt die Bindung von RANKL an RANK und damit die Knochenresorption. [73, 83] (Abbildung 5)

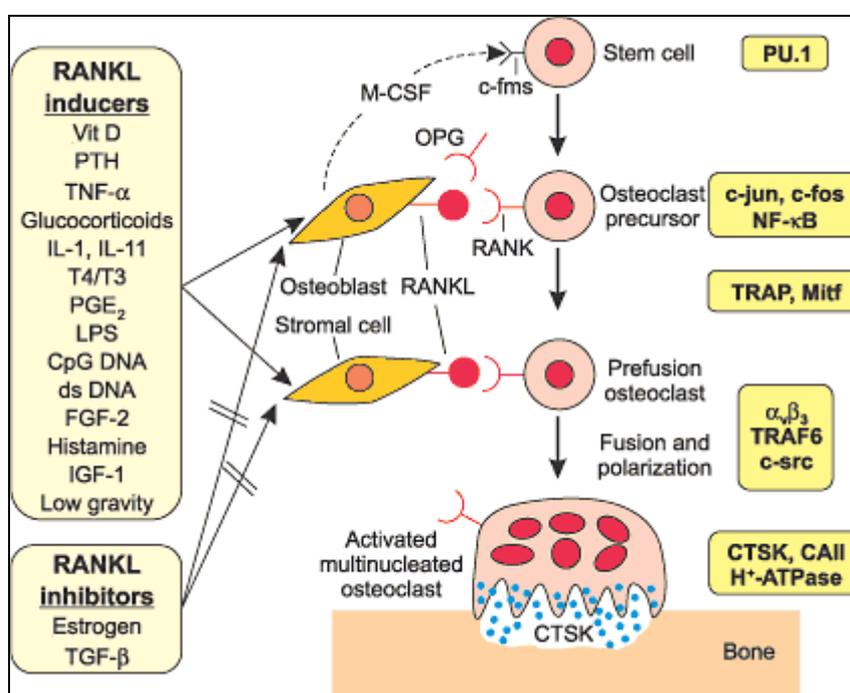


Abbildung 5: Wirkung der Zytokine auf den Knochenstoffwechsel

#### 2.1.2.4 Prostaglandine

Prostaglandine werden von den Zellen des Knochengewebes aus der Arachidonsäure gebildet. Ihre bekanntesten Vertreter sind Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und F (PGF), Prostacyclin und Thromboxane. Sie sind multifunktionale Regulatoren des Knochenmetabolismus. In in-vivo-Studien konnte gezeigt werden, dass Prostaglandine die Knochenresorption stimulieren.

Prostaglandine beeinflussen die Effekte der Zytokine, wie IL-1, in ihrer Wirkung auf die Knochenresorption durch Osteoklasten. Es wird vermutet, dass Prostaglandine nur lokale Mediatoren sind, da sie nicht in signifikanten Mengen im Blutkreislauf zirkulieren.

An Zellkulturen zeigten Raisz et al. [84], dass Prostaglandine dosisabhängig gegensätzliche Effekte auf den Knochen haben. Eine niedrige Dosis PGE<sub>2</sub> bewirkt eine vermehrte Produktion von DNA, Kollagen und nichtkollagenen Proteinen, in höheren Konzentrationen wird die Kollagensynthese jedoch gehemmt. [72]

#### 2.1.2.5 Wachstumsfaktoren

Die Knochenmatrix enthält große Mengen an Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und Insulin-like growth factor 2 (IGF-2), die vermutlich von Osteoblasten gebildet und in der Matrix gelagert werden. Es sind Mitogene, die die Teilungsrate der Osteoblastenlinie erhöhen. Abgesehen davon stimulieren IGF-1 und IGF-2 die Kollagen Typ-I-Synthese. Die Aktivität der Wachstumsfaktoren wird über die sechs Bindungsproteine (IGFBP), die von Osteoblasten exprimiert werden, reguliert. Ein Großteil (99 %) dieser Wachstumsfaktoren zirkuliert nicht frei im Serum, sondern ist an IGFBP gebunden. Die genaue Funktion dieser Bindungsproteine in Knochenzellen ist nicht bekannt. Allerdings scheint durch diese Proteinbindung die Halbwertszeit der IGFs erhöht und die Insulin-ähnliche Wirkung verhindert zu werden. Außerdem werden nur proteingebundene IGFs ins Gewebe transportiert. IGFBP-3 ist im Serum am stärksten vertreten und transportiert IGF-1 zum Knochengewebe. IGFBP-4 hemmt, IGFBP-5 stimuliert das Wachstum von Knochenzellen.

Der Transforming-growth-factor  $\beta$  wird von Osteoblasten gebildet. In vitro verringert TGF- $\beta$  die Proliferation von Osteoklasten-Vorläuferzellen, die exakte Rolle von TGF- $\beta$  im Hinblick auf die Knochenresorption ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde gezeigt, dass Östradiol die Synthese von TGF- $\beta$  durch Osteoblasten steigert, und dass nach Ovariectomie die Konzentration von TGF- $\beta$  im Knochen sinkt. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die erhöhte Knochenresorption ovariectomierter Ratten reduziert. Die Reduktion von TGF- $\beta$  könnte somit zu einer erhöhten Knochenresorption in der Menopause führen. [18, 50, 69]

## 2.2 Osteoporose

### 2.2.1 Definition der Osteoporose

#### 2.2.1.1 Definition der Osteoporose nach pathophysiologischen Kriterien

Die Osteoporose ist als systemische Skeletterkrankung definiert, die durch eine unzureichende Knochenfestigkeit charakterisiert ist, welche zu einem erhöhten Frakturrisiko prädisponiert. Die Knochenfestigkeit spiegelt dabei primär das Zusammenwirken von Knochendichte und Knochenqualität wieder (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis 2001) [11].

Nach dieser Definition umfasst die Osteoporose sowohl Erkrankungen, bei denen die Knochenmasse verringert ist, als auch Erkrankungen, bei denen strukturelle Komponenten des Knochengewebes beeinträchtigt sind. In der Regel geht eine Verminderung der Knochenmasse auch mit einer Verschlechterung der Mikroarchitektur einher. Das Ausmaß der Beeinträchtigung der Mikroarchitektur kann aber sehr unterschiedlich ausfallen. [11]

Unter der Störung der Mikroarchitektur versteht man die Umwandlung der Spongiosaplaten in stabartige Trabekel, Verdünnung und Reduktion der Trabekel, Unterbrechung des Trabekelnetzes durch Abbau der horizontalen Trabekel und die Zunahme von Mikrokallusbildungen. [29]

#### 2.2.1.2 Definition der Osteoporose über die Knochendichtemessung

Nach einer operationalen Definition der WHO aus dem Jahre 1994 liegt eine Osteoporose dann vor, wenn der Knochenmineralgehalt in einer DEXA-Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule und/oder am proximalen Femur um mehr als -2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert gesunder junger gleichgeschlechtlicher Personen abweicht. Die in Standardabweichungen angegebene Abweichung der Knochendichte von der gesunder junger gleichgeschlechtlicher Personen wird als T-Wert bezeichnet. [8, 11]

Laut den DVO-Leitlinien zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen 2009 haben Therapiestudien der letzten Jahre auch für T-Werte zwischen -2,0 und -2,5 eine ähnlich effektive Fraktursenkung gezeigt wie für niedrigere T-Werte, während dies für Werte größer als -2,0 noch nicht sicher belegt ist. Daher sollte Leitlinien gemäß für die Beurteilung des Frakturrisikos und die Indikation für eine medikamentöse Therapie als Grenze ein T-Wert von -2,0 verwendet werden, obwohl dies formal nicht den Kriterien der WHO-Definition entspricht. [12]

### 2.2.1.3 Definition der Osteoporose als unabhängiger Risikofaktor für Gebrechlichkeit im klinischen Gesamtkontext

Eine Erniedrigung der Knochendichte ist ein relativer Risikofaktor für Knochenbrüche. Maßgeblich für die relative Höhe des Frakturrisikos ist der T-Wert. Maßgeblich für das absolute Risiko für Knochenbrüche ist der Gesamtkontext aus klinischen Risikofaktoren (z.B. Alter, Geschlecht, Medikamente) und der Knochendichte. Eine Risikoabschätzung und eine Therapieempfehlung muss sich somit am klinischen Gesamtkontext und nicht isoliert am Messergebnis orientieren. [11]

### 2.2.2 Einteilung der Formen der Osteoporose

Die Einteilung der Osteoporose kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen [3]:

- nach dem Ausdehnungsgrad (lokalisiert/generalisiert)
- nach Alter und Geschlecht
- nach der Ätiologie
- nach dem Schweregrad
- nach der Knochenhistologie

Es wird zwischen lokalisierten und generalisierten Osteoporosen unterschieden. Die generalisierten Osteoporosen werden unterteilt in primäre und sekundäre Osteoporosen. Sekundäre Osteoporosen umfassen nur 5 % aller Osteoporose-Fälle, verursachen aber 20 % aller Frakturen. [3, 35, 62]

Innerhalb der Gruppe der idiopathischen Osteoporosen wird zwischen der juvenilen, der Typ-I-Osteoporose, die durch den östrogenabhängigen trabekulären Knochenmasseverlust in der Menopause charakterisiert ist, und der Typ-II-Osteoporose, die durch einen altersbedingten trabekulären und kortikalen Knochenmasseverlust charakterisiert ist, unterschieden.

Tabelle 1 zeigt die Einteilung der Osteoporosen nach der Ätiologie.

Tabelle 1: Einteilung der Osteoporosen nach der Ätiologie (nach Bartl) [3]

Primäre Osteoporosen	Idiopathisch, juvenil	
	Postmenopausal (Typ I)	
	Senil (Typ II)	
Sekundäre Osteoporosen	Endokrine Ursachen	Hypogonadismus
		Hypercortisolismus
		Hyperthyreose
		Hyperparathyreoidismus
		Diabetes melitus
	Hepatisch /gastrointestinal / alimentär	Malabsorption und Malnutrition
		Primäre biliäre Zirrhose
		Laktose-Intoleranz
	Nephrologisch	Chronische Niereninsuffizienz
	Onkologisch	Metastasierung
		paraneoplastisch
	Hämatologisch/myelogen	Multiples Myelom
		Polyzytämia vera
		Chronisch-myeloische Leukämie
		Angeborene Hämolyse
		Speicherkrankheiten
		Systemische Mastozytose
	Rheumatologische und Bindegewebserkrankungen	Rheumatoide Arthritis
		Osteogenesis imperfecta
		Ehler-Danlos-Syndrom
		Marfan-Syndrom
		Homocysteinurie
	Kardiologisch/pulmonologisch	Immobilität
		Marcumartherapie nach Herzklappenersatz
		Immobilität bei Herzinsuffizienz
	Medikamentös/toxisch	Langjährige Behandlung mit Steroiden bei chronischem Asthma bronchiale
		Glukokortikoide
		Antikoaganzien
		Antiepileptika
		Metalle
	Kohlenwasserstoffe	

### 2.2.3 Diagnostik der Osteoporose

Die Diagnostik der Osteoporose basiert auf Anamnese, körperlicher Untersuchung, Laboruntersuchungen einschließlich der Bestimmung von Knochenmarkern in Serum und Urin, bildgebenden Verfahren wie konventionelle Röntgendiagnostik, Computertomographie, Kernspintomographie, Ultraschall, Osteodensitometrie, sowie Knochenbiopsien. Dabei liefern Computertomographie, Kernspintomographie, Ultraschall und konventionelle Röntgendiagnostik Daten zur Knochenstruktur und Knochengeometrie, mit Hilfe der quantitativen digitalen Radiographie können Aussagen bezüglich der statischen Knochenmasse getroffen werden.

Der Einsatz neuer, nicht-invasiver Methoden wie Knochendichtemessungen und der Bestimmung von Knochenmarkern in Serum und Urin gewinnt dabei zunehmend an Bedeutung in der Diagnose und Verlaufskontrolle metabolischer Knochenerkrankungen. [29, 126]

Im folgenden soll näher auf die in der vorliegenden Studie verwendeten Methoden zur Diagnostik der Osteoporose eingegangen werden.

#### 2.2.3.1 Anamnese und körperliche Untersuchung

Bei jedem Verdacht auf eine Osteoporose ist eine ausführliche Erhebung der Anamnese, sowie eine eingehende körperliche Untersuchung erforderlich. In der Anamnese ist unter anderem die Erfassung von Risikofaktoren möglich. Hierbei stellen familiäre Belastungen, schlanke Konstitution und geringe körperliche Aktivität ein Risiko für die Entstehung einer Osteoporose dar. Weitere Faktoren, die bei der Erfassung von Risikopatienten nicht außer Acht gelassen werden dürfen, sind eine frühzeitige Menopause, calciumarme Ernährung, die Einnahme osteoporosefördernder Medikamente sowie der Abusus von Alkohol und Nikotin.

In der körperlichen Untersuchung ist besonders zu achten auf [30]:

- Vermehrte Brustkyphose, vermehrte Lendenlordose, Hyperlordose der HWS
- Klopfeschmerz der Dornfortsätze
- Direkter und indirekter Wirbelsäulenstauchungsschmerz
- Prüfung der Wirbelsäulenbeweglichkeit
- Exakte Körpergrößenmessung, Vergleich der Armspannweite
- Prominentes Abdomen durch Rumpfverkürzung
- Hängende dorsale Hautfalten

### 2.2.3.2 Konventionelle Röntgendiagnostik

Erst eine Abnahme des Knochenmineralsalzgehaltes von 30 % ist im konventionellen Röntgenbild zu erkennen. Durch das Röntgenbild ist der Schweregrad der Erkrankung (Frakturen) festzustellen, eine Verlaufskontrolle ist möglich. Empfohlen wird eine Aufnahme der Brust- und Lendenwirbelsäule in zwei Ebenen. Bei der Befundung des Röntgenbildes wird auf Anzeichen für verminderte Knochendichte, erkennbar an vermehrter Strahlentransparenz und Atrophie der Knochenzeichnung, auf Reduktion der Trabekelstruktur, Verdünnung der Kortikalis, sowie Wirbelkörperdeformierungen geachtet.

Von einer frischen Fraktur ist auszugehen, wenn die Wirbelkörperhöhe im Vergleich zur Voraufnahme um mindestens 20-25 % abgenommen hat. Der Nachweis einer atraumatischen Wirbelkörperfraktur gilt als einziger sicherer Nachweis einer Osteoporose in der konventionellen Röntgendiagnostik. Die Reproduzierbarkeit ist ganz wesentlich von der Erfahrung des befundenden Radiologen abhängig. [29]

### 2.2.3.3 Methoden der Osteodensitometrie

Die Osteodensitometrie eignet sich zur Beurteilung des Frakturrisikos sowie zur Therapiekontrolle der Osteoporose. Zwischen Patienten mit und ohne Frakturen kann jedoch nicht unterschieden werden. Es wird der Knochenmineralsalzgehalt in verschiedenen Skelettabschnitten durch die Schwächung ionisierender Strahlung beim Durchtritt durch den Körper bestimmt. [8, 53, 65, 74]

Die aktuelle Knochenmasse entspricht dabei einem Netto-Effekt aus Knochenformation und -resorption und ist damit das Ergebnis komplementärer Stoffwechselprozesse im Knochen [29].

Die Aussagekraft von Knochendichtemessungen wird durch ihre Genauigkeit, Abweichungen von einem vorgegebenen Standard (z.B. Normalwert) zu erfassen, sowie durch ihre Reproduzierbarkeit, d.h. die Zuverlässigkeit der Methode, Änderungen definierter Parameter bei wiederholten Untersuchungen zu erfassen, festgelegt. Je niedriger der Wert ist, desto besser ist die Genauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit. In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine inverse Beziehung zwischen dem Frakturrisiko und der Knochenmasse besteht. [30, 44; 45]

#### 2.2.3.3.1 Quantitative Computertomographie

Die quantitative Computertomographie (QCT) ist ein volumetrisches Verfahren, das eine isolierte Messung von Spongiosa und Compacta der Wirbelsäule ermöglicht, es erfolgt eine Massebestimmung in mg Hydroxylapatit pro  $\text{cm}^3$  [6, 76].

Die Strahlenbelastung im Rahmen einer Untersuchung einschließlich digitaler, lateraler Übersicht liegt bei 60 mSv. Die Genauigkeit der Methode liegt bei 5-10 %, die Varianz der Reproduzierbarkeit bei 1-3 %. Der Fettfehler kann bei der QCT bis 10 % betragen. [29]

#### 2.2.3.3.2 Quantitative digitale Radiographie

Die quantitative digitale Radiographie (QDR) ermöglicht eine integrale Messung von Kortikalis und Spongiosa an Messorten wie Wirbelsäule, Hüfte und Radius; es erfolgt eine Massebestimmung in g Hydroxylapatit pro  $\text{cm}^2$ . Die Strahlenbelastung einer Untersuchung liegt bei 1 mSv. Die Genauigkeit dieser Methode liegt bei 3-6 %, die Varianz der Reproduzierbarkeit bei 0,6-1,5 % (Wirbelsäule) bzw. 1,2-2,0 % (Hüfte). Die quantitative digitale Radiographie ist aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit im Vergleich zum QCT, der höheren Messgeschwindigkeit und geringeren Strahlenexposition derzeit die Methode der Wahl zur Verlaufskontrolle von Knochendichteänderungen. [29, 32, 75, 125]

Seit Anfang der 90er Jahre hat sich die Messung des Knochenmineralsalzgehaltes durch die Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie (DEXA)-Technik, ein planares, zweidimensionales Verfahren, bei dem von jedem Messpunkt Datensätze von einer niedrigen und einer hohen Energie gewonnen werden, so dass aus der Höhe und der Differenz der Messwerte der Mineralsalzgehalt entlang der Messstrecke gemessen werden kann, etabliert. Durch dieses Vorgehen wird der Einfluss des umgebenden Weichteilgewebes minimiert.

Durch den Vergleich der Knochendichte bezogen auf die maximale Knochendichte im jungen Erwachsenenalter (T-Wert) wurden von der WHO-Kriterien definiert, die das Ausmaß der Osteopathie charakterisieren, und die letztendlich wesentlich für die Festlegung einer Therapie und zur Kontrolle des Therapieerfolges sind.

Nach den Kriterien der WHO (Hongkong 1994) liegt eine Osteoporose vor, wenn die Knochendichte weniger als 2,5 Standardabweichungen unterhalb des Mittelwertes gesunder, junger, gleichgeschlechtlicher Personen (T-Score) liegt.

Für die Diagnose der klinisch manifesten Osteoporose wird zusätzlich gefordert, dass eine Fraktur ohne adäquates Trauma aufgetreten sein muss. Liegt die Knochendichte zwischen 1 und 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert gesunder, junger, gleichgeschlechtlicher Personen, kann eine Osteopenie diagnostiziert werden. [96]

Der in zahlreichen Studien verwendete Z-Wert bezieht sich auf ein altersentsprechendes Normalkollektiv. Abbildung 6 zeigt Einteilung der Osteoporose nach Osteodensitometrie- und Röntgenbefunden.

Klinisches Stadium	Kriterien
0 Osteopenie (Präklinische Osteoporose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Knochenmineralgehalt vermindert (T-Score: -1,0 bis -2,5 SD)</li> <li>- Keine Frakturen</li> </ul>
1 Osteoporose (ohne Frakturen)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Knochenmineralgehalt vermindert (T-Score: <math>\leq</math> 2,5 SD)</li> <li>- Keine Frakturen</li> </ul>
2 Manifeste Osteoporose (mit Frakturen)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Knochenmineralgehalt vermindert</li> <li>- 1 bis 3 Wirbelfrakturen ohne adäquates Trauma</li> </ul>
3 Fortgeschrittene Osteoporose	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Knochenmineralgehalt vermindert</li> <li>- multiple Wirbelfrakturen</li> <li>- oft auch extraspinale Frakturen</li> </ul>

Abbildung 6: Einteilung der Osteoporose nach Osteodensitometrie- und Röntgenbefunden [91]

#### 2.2.3.4 Spezifische Marker des Knochenstoffwechsels

Ergänzend zur Analyse der statischen Knochenmasse ist es mit Hilfe der Bestimmung von Knochenmarkern möglich, den dynamischen Umbauprozess des Knochens zu beurteilen [29].

In den letzten Jahren wurde eine Reihe neuer Marker des Knochenstoffwechsels entwickelt, die einen deutlichen Fortschritt in der nichtinvasiven Diagnostik und Verlaufskontrolle dynamischer Knochenstoffwechselprozesse darstellen [14, 29, 125].

Die biochemischen Marker zur Analyse der Knochenformation und -resorption können in zwei Gruppen unterteilt werden: Es werden zum einen Parameter der zellulären-enzymatischen Aktivität und zum anderen Matrixbestandteile, die beim Knochenstoffwechsel freigesetzt werden, bestimmt [110].

Im folgenden wird auf die einzelnen Marker, nach Formation und Resorption unterteilt, eingegangen.

##### 2.2.3.4.1 Marker der Knochenformation

###### 2.2.3.4.1.1 Knochenspezifische und Gesamt-Alkalische Phosphatase

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase (APH) setzt sich bei gesunden Erwachsenen im Serum etwa zu gleichen Teilen aus dem Leber- und Knochenisoenzym zusammen. Da es bei zahlreichen Erkrankungen zu einer Enzymerhöhung

kommen kann, ist eine Aussage bezüglich des Knochenstoffwechsels nur eingeschränkt möglich. Daher wird bei osteologischen Fragestellungen die Bestimmung des knochenspezifischen Isoenzym mit Hilfe eines Immunassays, der auf zwei monoklonalen Antikörpern gegen menschliche Skelett-APH basiert, bevorzugt.

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase ist ein membrangebundenes Enzym der Osteoblasten, das über zahlreiche Mechanismen in den Kreislauf abgegeben wird. Erste Ergebnisse zeigen, dass dieser Marker mit einer hohen Sensitivität sowohl zur Diagnose, als auch zu Verlaufsbeobachtung von knochenformenden Prozessen geeignet ist. [31, 110, 125]

#### 2.2.3.4.1.2 Osteocalcin

Osteocalcin (Synonym: Gla-Protein, BGP) ist ein Vitamin K abhängiges, nicht-kollagenes Protein, das spezifisch für Knochengewebe und Dentin ist. Osteocalcin wird vorwiegend von Osteoblasten während der Matrixmineralisationsphase produziert, in die extrazelluläre Matrix eingebaut und gilt daher als spezifischer Marker der Osteoblastenfunktion bzw. Osteoidmineralisation. Die Synthese wird durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> reguliert. Die exakte Funktion von Osteocalcin ist bisher noch nicht geklärt, eine Rolle bei Calcifikationsprozessen im Osteoid wird diskutiert. Ein Teil des neu synthetisierten Osteocalcins gelangt in den Kreislauf und kann immunologisch nachgewiesen werden. Osteocalcin unterliegt einer raschen Biodegradation und wird renal eliminiert. Dies hat zur Folge, dass in jeder Blutprobe sowohl intakte Peptide als auch größenvariable Fragmente in Abhängigkeit der verschiedenen Immunoassays und Kreuzreaktionen erfasst werden. Bei der Beurteilung von Osteocalcin ist der kontrollierte Entnahmezeitpunkt wichtig, da eine tageszeitliche Schwankung der Serumkonzentration mit einem Maximum zwischen Mitternacht und 4.00 Uhr und einem Minimum am Nachmittag vorhanden ist. [36, 110, 125]

#### 2.2.3.4.1.3 Propeptide des Typ I Kollagen

Die von Osteoblasten gebildete Knochenmatrix besteht zu 90 % aus Typ I-Kollagen, das als Prokollagen sezerniert wird. Extrazellulär erfolgt die Abspaltung von einem aminoterminalen (PINP) und einem carboxyterminalen (PICP) Extensionspeptid im Verhältnis 1:1 durch Endopeptidasen. Die messbaren Propeptide im Serum reflektieren die Osteoblastenaktivität und können mit Hilfe kürzlich entwickelter Immunoassays bestimmt werden [95].

Es besteht ein tageszeitlicher Rhythmus mit höheren Werten während der Nacht und niedrigen Serumspiegeln am Nachmittag. Bisher liegen noch wenige klinische Daten

zu PINP und PICP als Marker der Knochenformation vor [125]. Dieser Marker wurde in der vorgelegten Studie nicht bestimmt.

#### 2.2.3.4.2 Marker der Knochenresorption

##### 2.2.3.4.2.1 Hydroxyprolin

Hydroxyprolin entsteht durch posttranslationale Hydroxylierung von Prolin. Beim Abbau von Knochenkollagen wird es in den Kreislauf freigesetzt und im Urin ausgeschieden. Um die Knochenresorptionsrate zu beurteilen, ist eine Bestimmung von Hydroxyprolin im Urin mittels kalorimetrischer oder HPLC-Methode (High-performance liquid chromatography) möglich. Der Kollagenabbau des Knochens wird durch die Urinausscheidung von 4-Hydroxyprolin, einer posttranslationalen, modifizierten Aminosäure im Kollagenprotein bestimmt. Obwohl sich Hydroxyprolin nützlich in der Erkennung von ausgeprägten Anstiegen der Knochenresorption erwies, zeigt dieser Knochenresorptionsparameter eine niedrige Sensitivität durch folgende Einschränkungen: Da die C1q-Fraktion des Komplementsystems der unspezifischen Immunabwehr ebenfalls eine signifikante Menge Hydroxyprolin enthält, die bis zu 40 % der täglichen Hydroxyprolinausscheidung ausmachen kann, und Hydroxyprolin aus dem Knochen nicht nur bei der Knochenresorption, sondern auch während der Knochenformation, z.B. beim Abbau von PINP, freigesetzt wird, ist eine genaue Analyse der Knochenresorption mittels Hydroxyprolin nur eingeschränkt möglich. Da Hydroxyprolin intestinal absorbiert wird, ist eine 24-stündige Kollagen-arme Diät ohne Fisch, Fleisch und Gelatine-haltige Speisen vor der Urinsammlung erforderlich. Im Urin gemessenes Hydroxyprolin stellt außerdem nur etwa 10 % des gesamten Kollagenkatabolismus dar und ist deutlichen Schwankungen unterlegen. Die Bestimmung der Hydroxyprolinausscheidung ist damit insgesamt eher als unspezifische Methode zur Evaluation der Knochenresorptionsrate anzusehen und wird zunehmend in der klinischen Praxis durch spezifischere Verfahren ersetzt [110, 125]. Dieser Parameter wurde in der vorgelegten Studie nicht bestimmt.

##### 2.2.3.4.2.2 Hydroxypyridinium-Crosslinks

Pyridinolin und Desoxypyridinolin sind 3-Hydroxypyridinium-Derivate. Sie sind als Quervernetzungsprodukte von Kollagenketten wichtig für die Stabilität des extrazellulären Kollagens. Beim Knochenabbau werden diese Quervernetzungsbestandteile freigesetzt und im Urin ausgeschieden.

Im Gegensatz zu Hydroxyprolin kommt Pyridinolin nur im Knochen, im Knorpel und in geringen Mengen in anderen Bindegewebsstrukturen vor. Desoxypyridinolin wird nur

im Knochen und im Dentin gefunden. Pyridinium-Crosslinks gelten derzeit als Parameter mit der größten Sensitivität und Spezifität für die Knochenresorption. Da Pyridinium-Crosslinks nicht mit der Nahrung aufgenommen werden können, kann eine Bestimmung im Urin ohne vorherige Diät erfolgen. [110, 111, 125]

Die Methode der Wahl bei der Bestimmung stellt die HPLC-Analyse (High-performance liquid chromatography) dar. Diese Art der Bestimmung wurde auch in der vorgelegten Studie verwendet. Daneben wurde kürzlich ein vielversprechender Immunoassay entwickelt, der Antikörper gegen freies Pyridinium verwendet [113].

### **2.3 Pathogenese der Posttransplantations-Osteoporose**

Im Rahmen chronischer Erkrankungen, die eine Organtransplantation notwendig machen, ist meist bereits vor der Transplantation eine verminderte Knochenmasse festzustellen.

Zu den multifaktoriellen Ursachen zählen die kardial bedingte Malnutrition und Kachexie aufgrund des erniedrigten Herzauswurfvolumens bei Patienten vor Herztransplantation. Hinzu kommen krankheitsbedingte Inaktivität und Bettlägerigkeit, sowie Medikation mit Heparin oder Schleifendiuretika, die ebenfalls einen Knochenmassenverlust induzieren.

Nach der Organtransplantation kommt es zu einer weiteren Abnahme der Knochenmasse. Als Hauptursache ist dabei die immunsuppressive Medikation zu nennen. Da Patienten nach Transplantation größtenteils mit einer Kombination aus mehreren Immunsuppressiva behandelt werden, können Einzeleffekte des jeweiligen Medikamentes auf den Knochenstoffwechsel in klinischen Studien nur schwer analysiert werden.

Im folgenden wird auf die Wirkmechanismen der Immunsuppressiva eingegangen, mit denen die Studienpatienten behandelt worden sind. [22, 23, 121, 122]

#### **2.3.1 Wirkmechanismen der immunsuppressiven Medikamente**

##### **2.3.1.1 Calmodulin-Calcineurin-Phosphatase-Inhibitoren**

###### **2.3.1.1.1 Cyclosporin A**

Cyclosporin A (CyA), neben Tacrolimus eines der wichtigsten immunsuppressiven Medikamente, ist ein aus *Tolypocladium inflatum* Gams gewonnenes zyklisches Endekapeptid. Es bildet in CD4-Helferzellen einen Komplex mit Cyclophilin, einem zytoplasmatischen Bindungsprotein. Dieser Komplex bindet Calcineurin. Diese Kom-

plexbildung führt zur Hemmung der Proteinphosphatase-Aktivität und damit zu einer verminderte Expression von Interleukin-2, Protoonkogenen H-ras und c-myc. Die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen wird dadurch vermindert. CyA beeinflusst damit die Immunantwort des Organismus (Abbildung 1). [54]

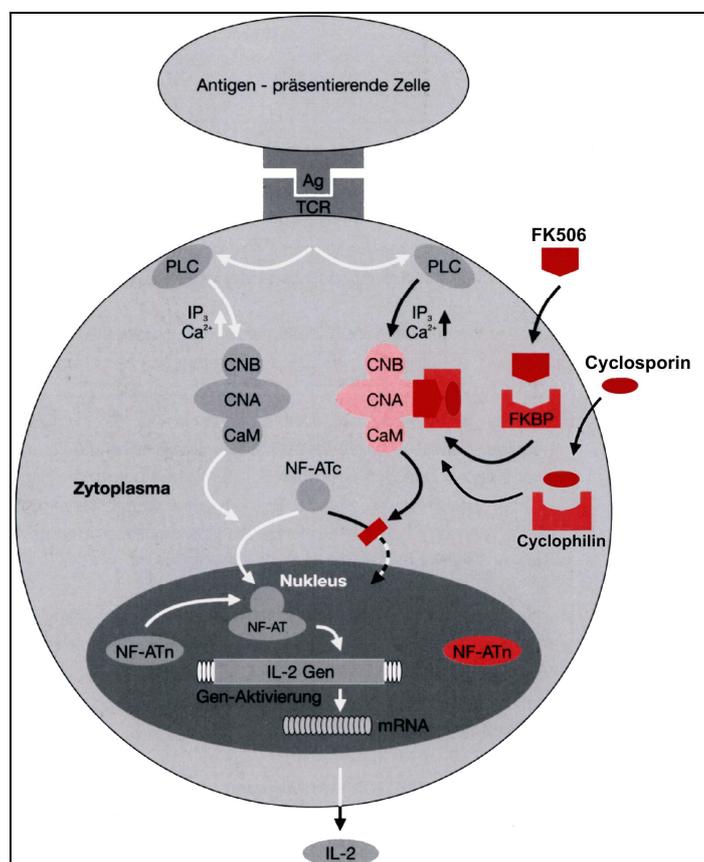


Abbildung 7: Molekularer Wirkmechanismus von Tacrolimus und Cyclosporin A [125]

Die Arbeitsgruppe um Movsowitz et al. [70] konnte zeigen, dass Ratten, die eine im Verhältnis zu Transplantierten vergleichbare Dosis CyA erhalten, innerhalb von 7 Tagen eine schwere Osteopenie entwickeln.

Der Knochenmasseverlust findet vor allem im trabekulären Knochen statt. Es ist ein sogenannter „high turnover“-Knochenstoffwechsel mit erhöhter Knochenresorption und gesteigerter, aber ineffektiver Knochenformation nachweisbar [51, 54, 70].

Im Gegensatz zu einer Behandlung mit Glukokortikoiden sind unter einer Cyclosporinbehandlung die Osteocalcinwerte erhöht. Dies kann einerseits ein Zeichen des „high turnover“-Knochenstoffwechsels sein, andererseits aber auch durch eine verminderte Osteocalcinausscheidung aufgrund von Niereninsuffizienz verursacht werden.

Direkte Effekte von CyA auf den Knochen bestehen in der Veränderung lokaler autokriner Faktoren. CyA steigert die mRNA-Expression von IL-1 und RANKL und hemmt die mRNA-Expression von OPG, wodurch es zur Osteoklastenstimulation kommt. Ebenso wurden auch direkte antiproliferative Wirkungen auf Osteoblasten beobachtet [41, 64].

In einer weiteren tierexperimentelle Studie konnte gezeigt werden, dass Cyclosporin A die Proliferationsrate und Mitogenese, sowie den alkalischen Phosphatasespiegel der osteoblastischen Osteosarkom-Zelllinie ROS 17/2,8 vermindert, ohne die Parathormon-Rezeptor-Bindung und die PTH stimulierte Adenylatcyclaseaktivität zu verändern [66].

Der exakte Wirkmechanismus von Cyclosporin A auf den Knochen ist noch nicht vollständig geklärt, da selten eine Monotherapie durchgeführt wird und somit nicht festzustellen ist, welche Wirkung speziell auf Cyclosporin A zurückzuführen ist [23, 24, 115].

Weiterhin wurde beobachtet, dass CyA die  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D-Produktion durch erhöhte Aktivität der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase steigert. Neben direkten Wirkungen beeinflusst Cyclosporin A den Knochenstoffwechsel über eine Veränderung des Sexualhormonhaushaltes und der Nierenfunktion zusätzlich indirekt.

Sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten unter Cyclosporin A-Therapie lassen sich erniedrigte Testosteronspiegel im Blut feststellen. An Leydig-Zell-Präparaten von der Ratte konnte gezeigt werden, dass Cyclosporin in vitro durch dosisabhängige Hemmung der Steroidenzyme einen Abfall der Testosteronsynthese bewirkt [126].

Die toxische Wirkung von CyA auf die Nierenfunktion wird kontrovers diskutiert. Während in der Studie von Greenberg et al. [35] insbesondere in den ersten 18 Monaten eine rapide Verschlechterung der Nierenfunktion unter CyA-Therapie aufgezeigt wurde, berichteten Gonwa et al. [34] von einer stabilen Nierenfunktion unter CyA.

In einem Großteil der tierexperimentellen Studien waren weder Harnstoffwerte, noch Creatininwerte erhöht. Auch weitere Zeichen für eine Niereninsuffizienz wie sekundärer Hyperparathyreoidismus oder erniedrigte  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$ -Spiegel konnten nicht festgestellt werden. [34, 35]

Die dosisabhängige Verschlechterung der Nierenfunktion kommt durch funktionelle und strukturelle Schädigung des tubulären und vaskulären Systems zustande.

Bei ausgeprägter Beeinträchtigung der Nierenfunktion kann dies durch einen  $1\alpha$ -Hydroxylase-Mangel zu einem Vitamin D-Mangel und damit zu einem sekundären

Hyperparathyreoidismus führen. In der Folge kann dann eine renale Osteopathie daraus resultieren.

#### 2.3.1.1.2 Tacrolimus (FK 506)

Das neu entwickelte Immunsuppressivum Tacrolimus (FK 506) ist ein Macrolid-Lacton, das 1987 erstmals aus *Streptomyces tsukubaensis* isoliert wurde.

FK 506 bindet intrazellulär an ein spezifisches Immunophilin (FK-Bindungsprotein-12). Dieser Komplex inhibiert ebenso wie der Cyclosporin A-Cyclophilin-Komplex den Calcineurin-Calmodulin-Komplex, wodurch es zu einer verminderten Aktivität dieser calciumabhängigen Protein-Phosphatase kommt. Dies bewirkt, dass die Gentranskription von Zytokinen, hierunter Interleukin-2, Interleukin-3 und Interferon- $\gamma$ , und damit die Proliferation zytotoxischer T-Zellen gehemmt wird (Abbildung 1).

Obwohl angenommen wird, dass die Therapie mit FK 506 eine bis zu 100fach potentere Immunsuppression bei insgesamt weniger Nebenwirkungen als die Therapie mit Cyclosporin A, wird die Wirkung auf den Knochenstoffwechsel kontrovers diskutiert. [23, 122, 131]

Cvetkovic et al. [9] zeigten in ihrer tierexperimentellen Studie, dass die Therapie mit FK 506 sogar einen stärkeren Knochenmasseverlust (64 % des trabekulären Areals) im Vergleich zur Therapie mit Cyclosporin A (44 % des trabekulären Areals) verursacht. Die Arbeitsgruppe um Inoue [48] konnte jedoch keinen signifikant erhöhten Knochenmasseverlust unter der Therapie mit FK 506 feststellen. Die Knochendichte in der FK 506 Gruppe betrug hier zwischen 81 % und 90 %, während sie in der CyA-Gruppe zwischen 52 % und 61 % lag. Diese starke Diskrepanz zwischen den beiden Studienergebnissen liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Dosierung von FK 506. In der Studie von Cvetkovic et al. [9] wurden 5mg/kgKG, in der Studie von Inoue et al. 1,0 bzw. 3,2 mg/kgKG verwendet. In der Literatur gilt die Dosierung von 1,0 bzw. 3,2 mg/kgKG für die Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation bei Ratten als ausreichend. Somit könnte der massive Knochenmasseverlust unter FK 506 in der Studie von Cvetkovic et al. [9] durch eine Überdosierung von FK 506 zustande gekommen sein.

Auch bei Patienten nach Herztransplantation, die mit FK 506 behandelt wurden, wurde vor allem im ersten Jahr nach Transplantation ein rascher Knochenmasseverlust vergleichbar zu dem unter einer CyA-Therapie festgestellt [124, 125].

In klinischen Studien mit Transplantationspatienten, die meistens mit einer immunsuppressiven Mehrfachkombinationstherapie behandelt werden, ist der Einzeleffekt eines Medikamentes allerdings nur schwer auszumachen.

Im Gegensatz zu Cyclosporin A kommt es nach Gabe von FK 506 nicht zu einem Anstieg von 1,25 Dihydroxy-Vitamin D und Osteocalcin [24].

Obwohl im Tiermodell kein negativer Effekt auf den Sexualhormonstatus festgestellt wurde, fanden Stempfle et al. [124] in ihrer klinischen Studie bei 80 % der Studienpopulation einen Abfall des Testosteronspiegels unter FK 506. Dieser Sachverhalt könnte zusätzlich den trabekulären Knochenmasseverlust steigern.

Die exakte Wirkung auf den Knochenstoffwechsel ist bisher noch nicht geklärt. Als Hauptwirkmechanismus werden direkte Effekte auf Knochenzellen über Modulation von Zytokinen angenommen. Außerdem wird vermutet, dass FK 506 direkt die Fähigkeit der Knochenzellen, lokale autokrine Faktoren zu sezernieren oder auf systemische Hormonausschüttung zu reagieren, verändert. Ebenso wie CyA steigert auch FK 506 die mRNA-Expression von IL-1 und RANKL und hemmt die mRNA-Expression von OPG, wodurch es zur Osteoklastenstimulation kommt [41].

Indirekte Effekte auf das Immunsystem durch Verminderung der Zytokin- und Lymphokinproduktion spielen sicherlich auch eine Rolle. [9, 125]

#### 2.3.1.2 Glukokortikosteroide

Trotz vieler schwerwiegender Nebenwirkungen stellen Glukokortikosteroide einen wichtigen Bestandteil in der Immunsuppression zur Prophylaxe und Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation dar. Durch die Kombination mit anderen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und Tacrolimus, konnte die Steroiddosis um bis zu 50 % verringert werden. Dennoch werden zur Prophylaxe ca. 0,1 mg/kgKG täglich und zur Therapie akuter Abstoßungsreaktionen bis zu 1 g/d über drei Tage verabreicht.

Bei einer über drei oder mehr Monate geplanten oder bereits laufenden Glukokortikoidtherapie ist bereits bei einer Dosis von 2,5 mg Prednisolonäquivalent ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko nachgewiesen [10]. Der genaue Wirkmechanismus der Glukokortikoide auf den Knochen ist noch nicht vollständig geklärt, eine multifaktorielle Genese wird angenommen.

Glukokortikoide steigern die Knochenresorption und vermindern die Knochenformation, so dass das Gleichgewicht von Knochenaufbau und -abbau aufgehoben ist. Dies kann schließlich zur Osteoporose führen. Die gesteigerte Knochenresorption basiert

hauptsächlich auf indirekten Effekten der Glukokortikoidwirkung wie Störung der Calciumhomöostase und Veränderungen im Sexualhormonhaushalt (Abbildung 8).

Die Störung der Calciumhomöostase ist einerseits bedingt durch die Hemmung der Calciumabsorption im Gastrointestinaltrakt. Der exakte Mechanismus hierfür ist noch nicht geklärt. Andererseits kommt es zum renalen Calciumverlust über eine Hemmung der tubulären Rückresorption. Dies hat kompensatorisch eine Parathormonerhöhung (PTH) und damit eine erhöhte Calciummobilisation aus dem Knochen und eine verminderte renale Ausscheidung mit nachfolgender Hypercalcämie zur Folge. [5, 37, 115]

Der erhöhte PTH-Serumspiegel bewirkt eine vermehrte Expression von PTH-Rezeptoren auf Osteoblasten, wodurch die Empfindlichkeit dieser gesteigert wird [7]. Die Knochenresorption der Osteoklasten findet nur in Gegenwart von Osteoblasten statt. Dadurch wird insbesondere der trabekuläre Knochen vermehrt abgebaut [43]. Unter Therapie mit Glukokortikoiden wird auch der Sexualhormonhaushalt beeinflusst:

Zum einen wird die hypophysäre Sekretion von Gonadotropin gehemmt, zum anderen kommt es aber auch zu direkten negativen Effekten auf die Steroidproduktion von Ovar und Testes. Bei einer Stimulation mit Releasing Hormon für luteinisierendes Hormon (LHRH) ist die Sekretion von luteinisierendem Hormon geschlechtsunabhängig verringert. Tierexperimentell wurde festgestellt, dass unter Glukortikoiden die vom Follikel-stimulierenden-Hormon (FSH)-abhängige Produktion von Östrogen sowie die Testosteronproduktion des Testes gehemmt werden. Außerdem kann es auch durch die Suppression von Adreno-Corticotropem-Hormon (ACTH) mit nachfolgender Nierenrindenatrophie zu verringerter Sekretion von Sexualhormonen kommen. Sexualhormonmangel verursacht hauptsächlich trabekulären Knochenmassenverlust. [20, 61]

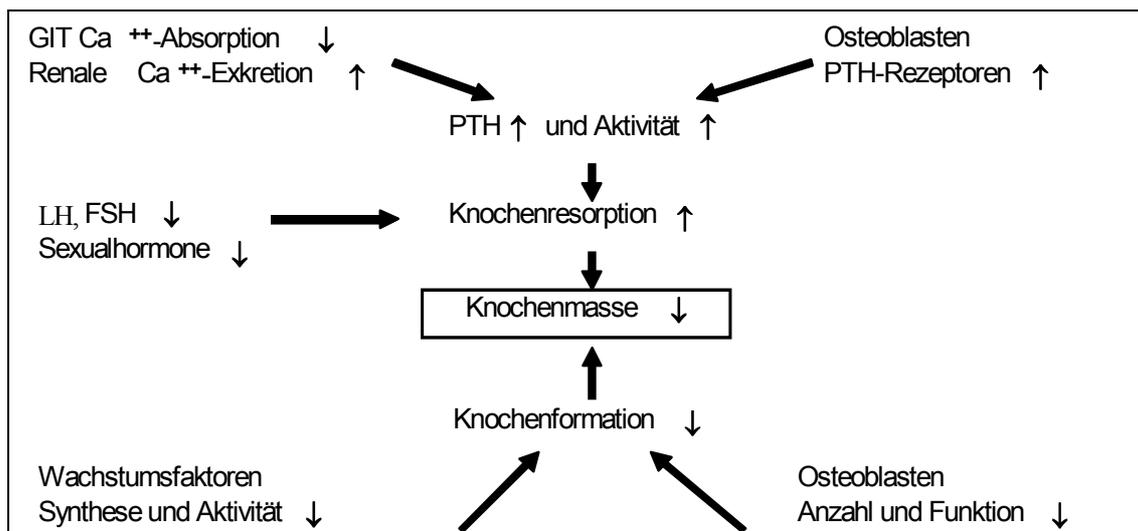


Abbildung 8: Überblick über die wichtigsten Wirkungen von Glukokortikosteroiden auf den Knochen [125]

Neben den obengenannten Effekten verringern Glukokortikoide die Synthese von skelettalen Wachstumsfaktoren:

Im Serum von Patienten mit einer Glukokortikoid-induzierten Osteoporose kann man eine Erhöhung des IGFBP-4-Spiegels bzw. eine Erniedrigung des IGFBP-5-Spiegels feststellen. IGFBP-6 hat eine höhere Affinität zu IGF-2. Es inhibiert die Effekte von IGF-2 auf die DNA und die Glykogensynthese in Osteoblasten (Abbildung 9).

Glukokortikoide vermindern die IGF-1-Synthese durch direkte Hemmung der Transkription.

Über eine verminderte Synthese und einen gesteigerten Abbau von IGFBP-5 kommt es zu einer geringeren Aktivität von IGF-1. Glukokortikoide steigern die Transkription und Synthese von IGFBP-6 und bewirken so einen Abfall von IGF-2. Zusätzlich wird der Effekt des Transforming Growth factors  $\beta$  (TGF $\beta$ ), der unter anderem ebenfalls in einer Stimulation der Kollagensynthese besteht, durch Glukokortikoide aufgehoben. Direkte Effekte auf den Knochenstoffwechsel bestehen in der Hemmung der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten über spezifische Rezeptoren mit hoher Glukokortikoidaffinität. Die Osteoblastenfunktion wird außerdem durch eine Hemmung des IGF-1 auf diese Zellen und eine verminderte Osteocalcinsynthese supprimiert. (Abbildung 9) [5]

So wird die Zellteilung vermindert und damit die Kollagen-Typ-I-Genexpression der Osteoblasten über Verminderung der Transkriptionsrate und Destabilisierung der Kollagen-Typ-I-mRNA gehemmt. [4, 42, 51, 58, 78]

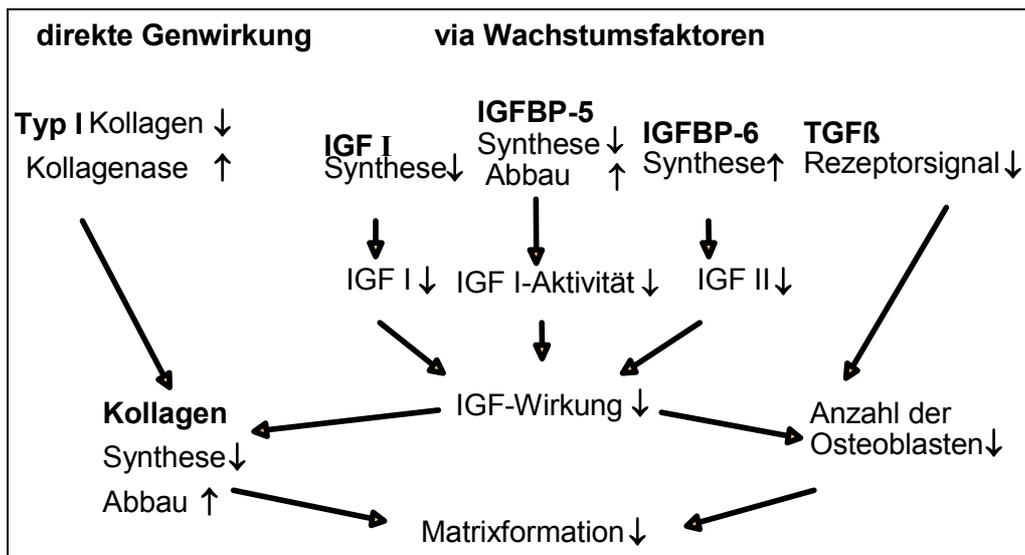


Abbildung 9: Wirkungen der Glukokortikosteroide auf Wachstumsfaktoren und Knochen [125]

Darüber hinaus beeinflussen Glukokortikoide die Wirkung der Zytokine auf den Knochenstoffwechsel.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide in humanen Osteoblasten die OPG-mRNA-Expression und -Proteinsekretion hemmen und die RANKL-mRNA-Expression steigern und damit das Gleichgewicht zwischen RANKL und OPG zu Gunsten der Knochenresorption verschieben. Unter systemischer Glukokortikoidbehandlung wurden erniedrigte OPG-Serumkonzentrationen gemessen. [41, 102]

### 2.3.1.2.1 Mycophenolat Mofetil (MMF)

Mycophenolat Mofetil ist ein Morpholinoäthylester der Mycophenolsäure (MPA). MPA wurde das erste Mal 1898 aus einer *Penicillium*-Kultur isoliert. Bereits damals wurde die antibakterielle Wirkweise erkannt, man konnte aber nicht ausreichend Substanz gewinnen, um weitere Untersuchungen anzustellen. 1913 gelang es Alsberg und Blach erneut MPA zu isolieren. Man fand heraus, dass MPA durch die nicht-kompetitive, reversible Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase und Guanolat-Synthetase fungizid, antiviral und immunsuppressiv wirkt. Das Interesse an MPA wurde erneuert, als Allison et al. 1970 feststellten, dass Lymphozyten von der de-novo-Purinsynthese abhängig sind, wogegen die meisten anderen Zellreihen vor allem den salvage-pathway zur Purinsynthese nutzen. Somit schien MPA relativ Lymphozyten-spezifisch zu wirken (Abbildung 10).

In in-vitro-Untersuchungen wurde festgestellt, dass insbesondere die DNA-Synthese von der Proteinase-Hemmung betroffen ist. Man fand heraus, dass MPA die Proliferation der menschlichen T-Lymphozyten sowohl nach Stimulation mit Calcium-abhängigen als auch mit Calcium-unabhängigen Mitogenen hemmt. Außerdem inhibiert MPA die polyklonale Antikörperproduktion von B-Zellen, die mit verschiedenen Mitogenen stimuliert wurden. [22, 70]

Die immunsuppressive Therapie nach Organtransplantation stellt immer noch ein Problem dar. Akute und chronische Abstoßungsreaktionen limitieren weiterhin die Transplantatüberlebenszeit, da die bisher verwendeten Immunsuppressiva zwar im Hinblick auf die T-lymphozytär getriggerte Abstoßungsreaktion wirksam sind, auf Antikörper-induzierte Abstoßungsreaktionen jedoch keinen Einfluss haben. [22, 130]

Sowohl tierexperimentell, als auch in ersten klinischen Studien zeigte MMF eine mindestens ebenso gute Wirksamkeit wie Azathioprin. Kirklin et al. [56] beobachteten in ihrer Studie sogar eine signifikante Episodenabnahme von Abstoßungsreaktionen von 0,67 Episoden pro Monat und Patient unter der Therapie mit Azathioprin auf 0,27 Episoden pro Monat und Patient unter der Therapie mit MMF. Das Nebenwirkungsprofil beider Medikamente ist ähnlich. Die Nebenwirkungen einer Therapie mit MMF bestehen in transienten, insbesondere gastrointestinalen Symptomen wie Schwindel, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. In den bis jetzt vorliegenden Studien ergab sich kein Anhalt für toxische Wirkungen auf das Knochenmark, Nephrotoxizität oder Hepatotoxizität. [121, 130, 131]

Im Gegensatz zu Azathioprin wirkt MMF weniger karzinogen und mutagen, da es keine Veränderungen in der chromosomalen DNA hervorruft.

Erste tierexperimentelle Studien zeigten, dass MMF über einen kurzen Zeitraum von 28 Tagen zu keinem Knochenmasseverlust führt. Da aber eine Abnahme der Osteoblastenaktivität in Form von erniedrigten Osteocalcin-Serumspiegeln beobachtet wurde, sind Langzeitnebenwirkungen auf den Knochenmineralstoffwechsel nicht auszuschließen und müssen durch weitere Studien geprüft werden. [19]

Sollinger et al. [121] haben in ihrer Studie gezeigt, dass MMF nicht nur zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation geeignet ist, sondern sogar als Therapeutikum bei Abstoßungsreaktionen wirksamer ist, als die Bolusgabe von Glukokortikosteroiden.

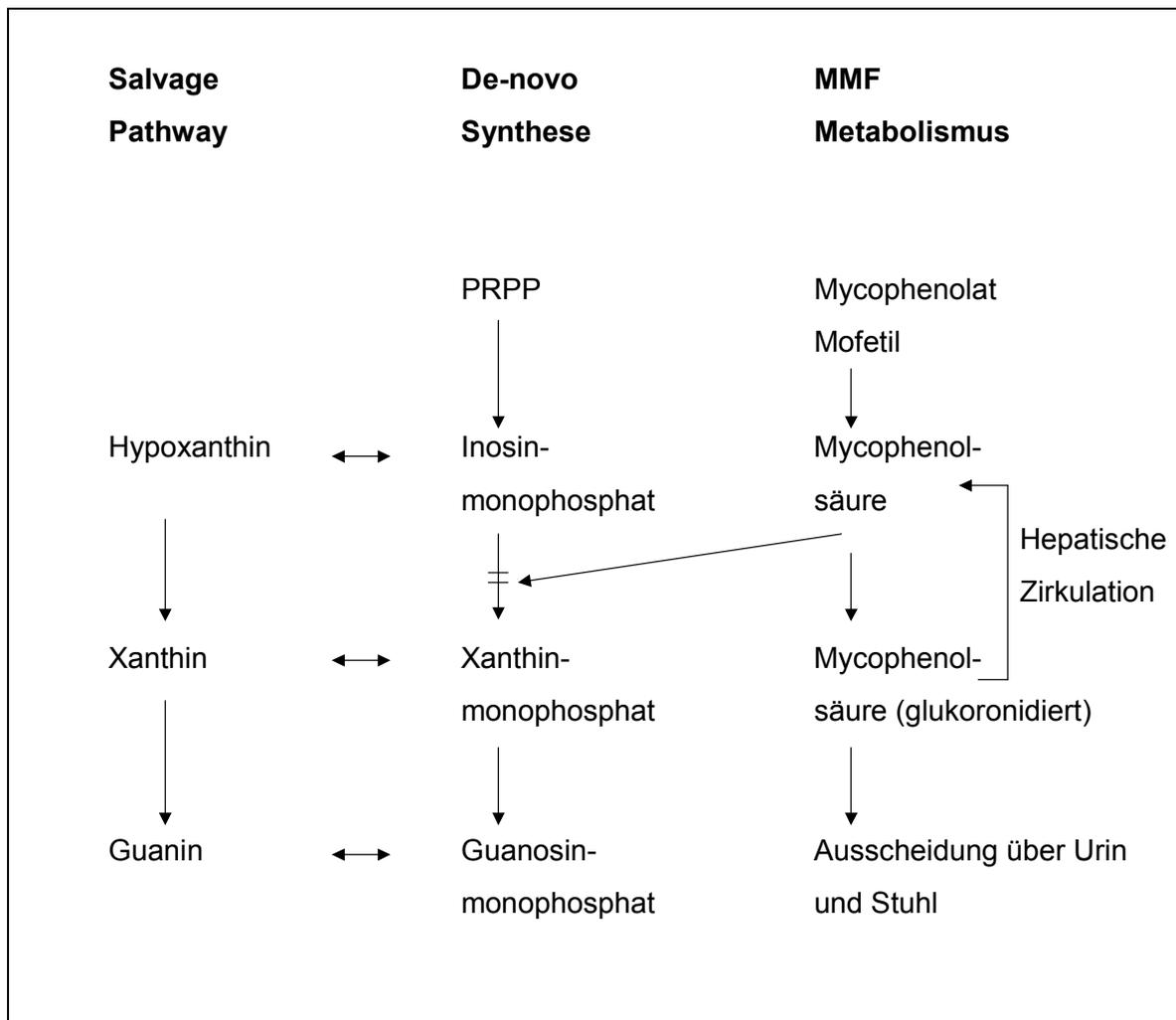


Abbildung 10: Metabolismus und Wirkmechanismus von Mycophenolat Mofetil

## 2.3.2 Prävention und Therapie der Osteoporose

### 2.3.2.1 Hemmung der Knochenresorption

Die Verordnung von Calcium und Vitamin D entspricht heute dem weltweiten Standard der Osteoporosebehandlung [3]. In den Leitlinien der DVO wird eine Osteoporoseprophylaxe bei Patienten mit einer systemischen Glukokortikoidtherapie von mindestens drei Monaten mit Vitamin D (400-600 IU/d) und Calcium (1000-1500mg/d) empfohlen [10].

#### 2.3.2.1.1 Calciumsubstitution

Calcium ist ein wichtiger Bestandteil der Osteoporoseprävention und Basistherapie.

Der tägliche Bedarf liegt bei ca. 500 mg Calciumionen, der bei normaler Ernährung mit ausreichender Zufuhr von Milchprodukten gedeckt ist.

Die derzeitigen Empfehlungen insbesondere für Osteoporoserisikogruppen liegen bei einer täglichen Aufnahme von mindestens 1500 mg Calciumionen pro Tag, um eine neutrale Calciumbilanz zu erreichen. Deshalb liegt die verwendete Calciumsubstitutionsdosis bei 1000 mg pro Tag. Diese Therapie hat sich vor allem in der Prävention der steroidinduzierten Osteoporose als wirksam erwiesen. Da die Calciumtherapie zu Hypercalcämie und Hypercalciurie führen kann, sind regelmäßige Kontrollen dieser Laborparameter nötig.

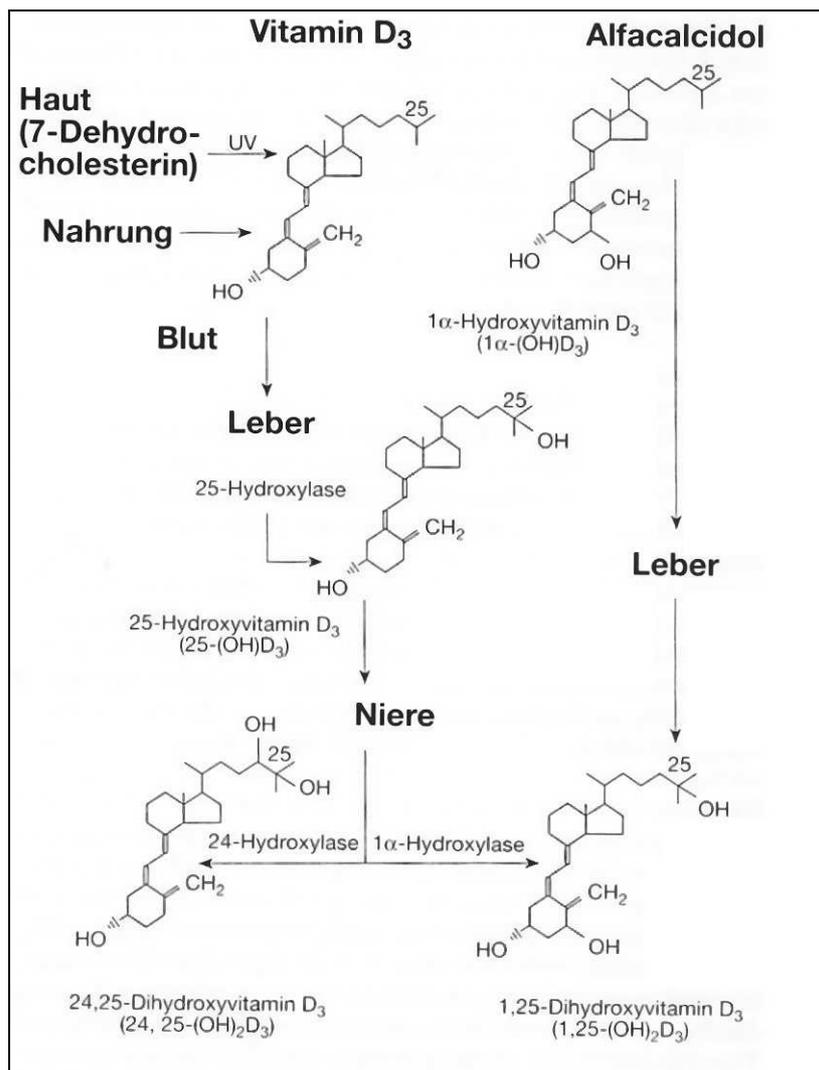
Effektiver als die Calcium-Monotherapie ist eine Kombinationstherapie mit anderen Osteoporosetherapeutika. [13, 17, 125]

### 2.3.2.2 Vitamin D

#### 2.3.2.2.1 Cholecalciferol

Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) wird durch Photolyse in der Haut bei UV-Bestrahlung aus 7-Dehydrocholesterin synthetisiert. Eine andere Quelle ist Ergosterin aus der Nahrung.

Vitamin D selbst ist biologisch inaktiv, erst durch die Hydroxylierung in der Leber durch die 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol und die weitere Hydroxylierung in der Niere führen zu 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, der biologisch aktiven Form von Vitamin D (Abbildung 11).

Abbildung 11: Metabolismus von Vitamin D<sub>3</sub> und Alfacalcidol [13]

Eine Schwierigkeit in Therapie mit Cholecalciferol besteht in der schlechten Steuerbarkeit, da es zu einer erhöhten Speicherung von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> im Fett- und Muskelgewebe kommt, und damit jederzeit eine plötzliche und prolongierte Freisetzung möglich ist. Hieraus ergibt sich ein anhaltendes Hypercalcämierisiko.

#### 2.3.2.2.2 Calcitriol (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)

25-Hydroxycholecalciferol wird in der Niere durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>), der biologisch aktiven Form von Vitamin D, metabolisiert. Dieser Schritt ist abhängig vom Blut-Calcium-Spiegel. Ein erniedrigter Calciumspiegel führt zu einer Parathormonerhöhung. Das Parathormon fördert nun die Bildung und Sekretion von 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>. Bei hohem Calcium-Spiegel hingegen wird die Synthese von Calcitriol gehemmt. Calcitriol hemmt einerseits via Feedback-Hemmung die 1 $\alpha$ -Hydroxylase in der Niere und andererseits die Parathormonsekre-

tion in den Epithelkörperchen. Calcitriol ist damit neben Parathormon und Calcitonin das dritte steuernde Hormon des Calcium-Phosphatstoffwechsels (Abbildung 12).

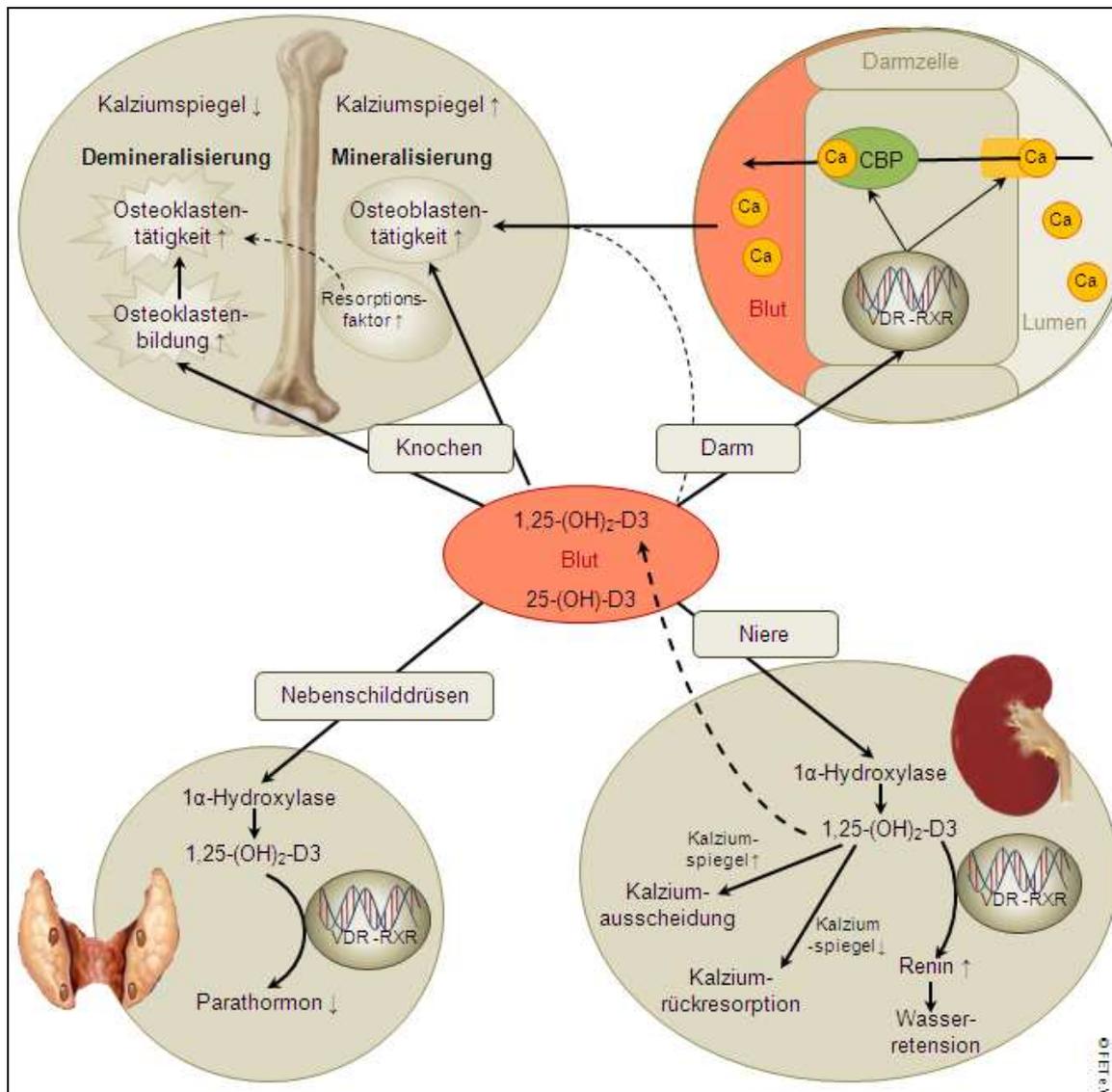


Abbildung 12: Regulation der Calciumhomöostase im Blut durch Vitamin D

Der Hauptwirkort von Calcitriol ist das Dünndarmepithel. Hier bewirkt Calcitriol eine Syntheseinduktion des calciumbindenden Proteins Calcindin-D und damit eine Steigerung der enteralen Calcium- und Phosphatreabsorption.

In der Nebenschilddrüse hemmt Calcitriol die Parathormonsekretion indirekt über eine erhöhte Calciumabsorption und direkt über eine Hemmung der Nebenschilddrüsenproliferation, sowie der Parathormonsynthese und -freisetzung über einen Eingriff in die Transkription des PTH-Gens durch Verminderung der Syntheserate der PTH-mRNA. [42, 55, 87, 92, 106, 107]

Calcitriol spielt aber ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung des Knochens. Der Hauptangriffspunkt ist dabei der Osteoblast. Dieser besitzt eine größere Menge an  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ -Rezeptoren. In vitro erhöht Calcitriol die Synthese von Transforming-growth-factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Insuline-like-growth-factor-Rezeptoren. Durch Steigerung der Transkriptionsrate wird die Synthese von Matrixproteinen wie Osteocalcin und Osteopontin gesteigert, die eine entscheidende Rolle bei der Mineralisierung des Knochengewebes spielen.

Neben der Knochenformation erhöht Calcitriol auch die Knochenresorption über eine Stimulation der Osteoklasten und erhält somit einen ausgeglichenen Knochenstoffwechsel aufrecht. [13, 55, 88, 92]

Hauptindikationen für die Verwendung aktiver Vitamin-D-Metaboliten sind vor allem die chronische Niereninsuffizienz, die Behandlung von dialysepflichtigen Patienten, chronische Lebererkrankungen, Transplantationspatienten sowie juvenile und prämenopausale Osteoporosen. In Deutschland ist Calcitriol nur zur Behandlung der renalen Osteopathie zugelassen [3]. Richy et al. demonstrierten in ihrer Metaanalyse von 17 Studien die Effektivität von Calcitriol in der Behandlung der primären und Glukokortikoid-induzierten Osteoporose [89].

Sambrook und Mitarbeiter zeigten in ihrer Studie, dass Calcitriol in Kombination mit Calcium einen Glukokortikoid-induzierten Knochenmasseverlust verringern kann [100].

In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe, in der die Wirksamkeit von Alendronate, Calcitriol und nativem Vitamin D in der Prophylaxe und Behandlung der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose verglichen wurde, konnte kein Unterschied zwischen nativem Vitamin D und Calcitriol gefunden werden. Alendronate erwies sich in dieser Studie am effektivsten in der Behandlung der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose [98].

Stempfle et al. [127] konnten in ihrer Studie nach Calciumsupplementation und Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus keinen additiven positiven Effekt im Hinblick auf die Knochendichte und Frakturrate durch Gabe von  $0,25\ \mu\text{g}$  Calcitriol im Vergleich zu Placebo nachweisen, erhöhte Knochenresorptionsmarker normalisierten sich jedoch signifikant innerhalb eines Jahres unter der Therapie mit Calcitriol und bei den Patienten der Calcitriolgruppe, die innerhalb eines Jahres nach Herztransplantation in die Studie aufgenommen worden waren, konnte eine Zunahme der Knochendichte nachgewiesen werden [127]. In einer weiteren Arbeit

dieser Arbeitsgruppe konnte bei Patienten, die frühzeitig nach Herztransplantation mit Calcitriol behandelt wurden, eine statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte an der LWS und eine Stabilisierung der Knochendichte am Femur nachgewiesen werden [128].

#### 2.3.2.2.3 Alfacalcidol ( $1\alpha$ -OH- $D_3$ )

Alfacalcidol ist ein synthetisch hergestellter Vitamin D-Metabolit. Im Vergleich zu Calcitriol fehlt hier die Hydroxylgruppe an der Position 25. Die Substanz wird nach enteraler Resorption in der Leber durch Hydroxylierung an Position 25 in die hormonell aktive Verbindung Calcitriol umgewandelt. Alfacalcidol besitzt eine niedrige biologische Aktivität und kann somit als Prodrug angesehen werden. Im Gegensatz zu Calcitriol ist Alfacalcidol zur Behandlung von Osteoporosen zugelassen [3, 10].

Alfacalcidol und Calcitriol sind hinsichtlich ihres Wirkmechanismus identisch, es bestehen aber pharmakokinetische und pharmakodynamische Unterschiede.

Die vollständige Umwandlung von Alfacalcidol in Calcitriol macht eine gezielte, gut steuerbare und damit sichere Therapie möglich. Alfacalcidol hat eine Halbwertszeit von wenigen Tagen, so dass bei drohender Hypercalcämie diese durch Dosisreduktion vermieden werden kann. Seino et al. [112] zeigten in ihrer Studie, dass nach Calcitriolgabe rasch ein Plasmaspitzenpiegel erreicht ist, und damit ein hohes Risiko einer Hypercalcämie besteht. Nach Alfacalcidolgabe dagegen bildet sich ein breiter flacher Plasmapeak aus. Dabei bleibt der Plasmaspiegel weitgehend im Normbereich, so dass nur ein geringeres Hypercalcämierisiko gegeben ist [85, 104].

Abbildung 13 zeigt das pharmakokinetische Profil von Alfacalcidol und Calcitriol.

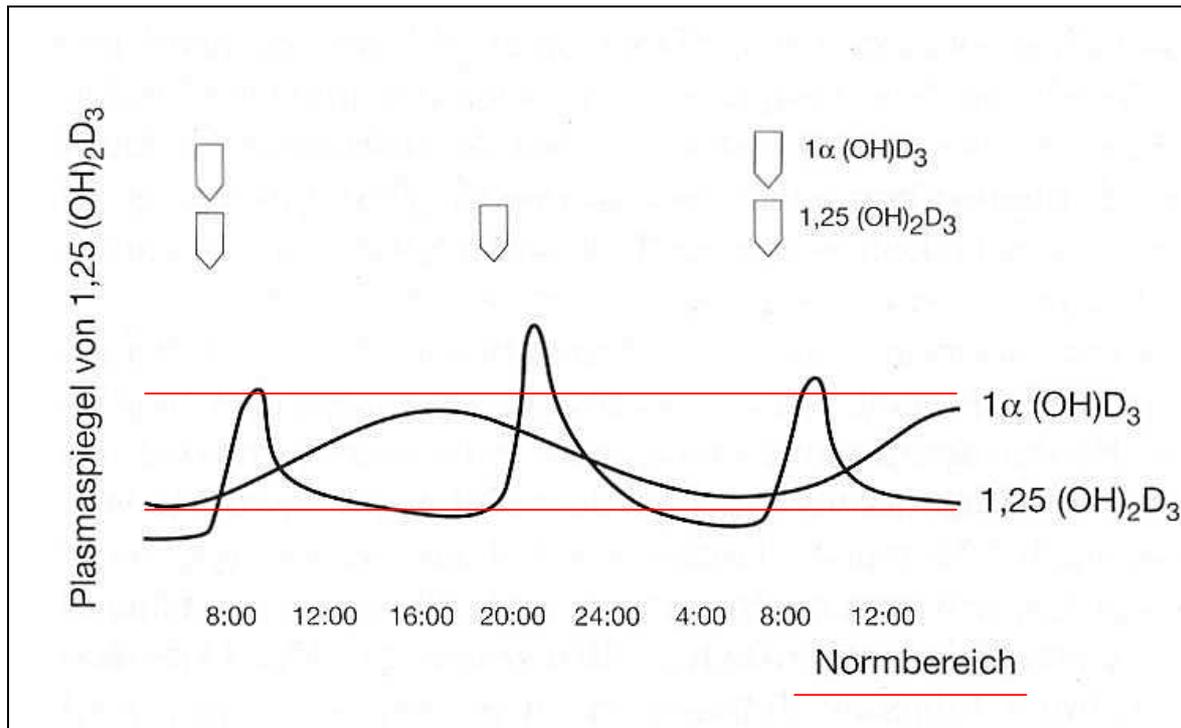


Abbildung 13: Schematische Darstellung des pharmakokinetischen Profils von Alfacalcidol und Calcitriol [13]

Mittels radioaktiv markierter Metaboliten konnte der Verteilungskoeffizient von Alfacalcidol und Calcitriol zwischen Knochen und Plasma ermittelt werden. Es zeigt sich über die Zeit eine stärkere Anreicherung von Alfacalcidol als von Calcitriol [16].

Im Tierversuch wurde 25-Hydroxylase auch im Knochen nachgewiesen. Nach Alfacalcidolgabe kommt es im Knochen zur Metabolisierung von Alfacalcidol zu Calcitriol [47].

Diese duale Aktivierung in Leber und Knochen führt zu einer höheren Konzentration von Calcitriol im Knochen nach Alfacalcidolgabe als nach Calcitriolgabe (Abbildung 14).

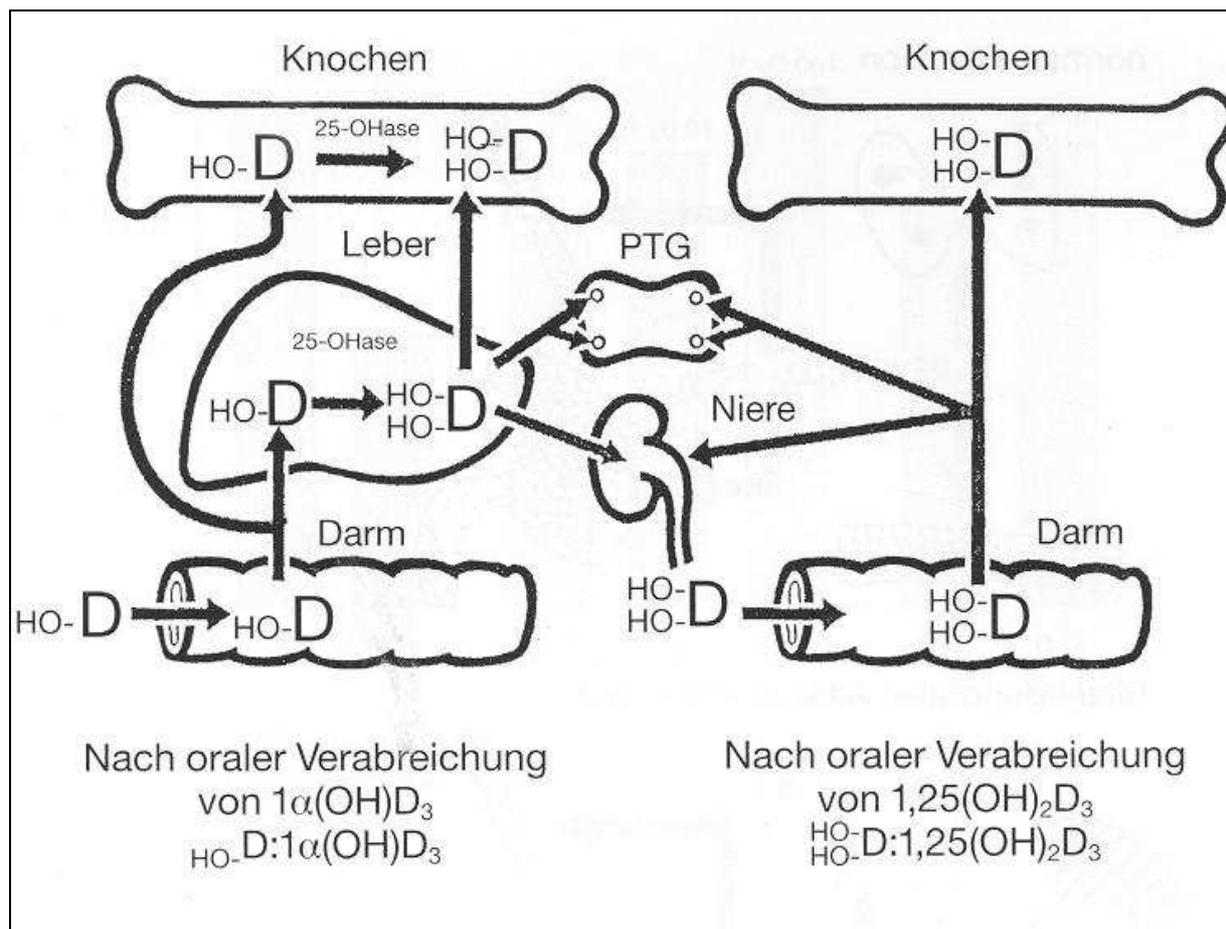


Abbildung 14: Unterschiede bei der Versorgung des Knochens mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nach oraler Verabreichung von  $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$  und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [13]

Geusens et al. [15, 33] konnten in ihrer tierexperimentellen Studie bei einer Behandlung ovariectomierter Ratten mit Alfacalcidol eine statistisch signifikant höhere Zunahme der Knochendichte nachweisen als bei der Behandlung mit Östrogenen. In der Studie von Aerssens et al. [1] wurden zwei Monate alte Ratten über sechs Monate mit Alfacalcidol und mit oder ohne Prednisolon ( $0,5 \mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{täglich}$ ) behandelt. In beiden Gruppen wurde die mechanische Stabilität des Knochens verbessert.

Richy et al. demonstrierten in ihrer Metaanalyse von 17 Studien die Effektivität von Alfacalcidol in der Behandlung der primären und Glukokortikoid-induzierten Osteoporose [89].

Pouilles und Mitarbeiter [82] berichten in ihrer Studie von stabilen Knochendichtewerten unter einer Behandlung mit  $1 \mu\text{g}$  Alfacalcidol und  $500 \text{ mg}$  Calcium in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose, wohingegen in der unbehandelten Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Abnahme der Knochendichte zu verzeichnen war.

Ebenso zeigten Reginster et al. [86] in der ersten doppelt-blinden placebokontrollierten Therapiestudie mit Alfacalcidol bei Glukokortikoid-induzierter Osteoporose bei unterschiedlichsten Grunderkrankungen eine statistisch signifikante geringe Abnahme Knochendichte unter der Behandlung mit Alfacalcidol im Vergleich zu Placebo.

In einer Studie von Ringe und Mitarbeitern [94] konnte gezeigt werden, dass unter einer Kombinationstherapie mit 1 µg Alfacalcidol und 500 mg Calcium (Gruppe A) pro Tag in der Behandlung der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose im Vergleich zu einer Kombinationsbehandlung mit 1000 IU Vitamin D<sub>3</sub> und 500 mg Calcium (Gruppe B) die Frakturrate niedriger ist, und ein signifikanter Anstieg der Knochendichte zu verzeichnen ist. In der Gruppe B war während der Behandlung keine signifikante Veränderung der Knochendichte festzustellen. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe um Shirashi [119] in ihrer tierexperimentellen Studie, in der gezeigt wurde, dass Alfacalcidol in der Behandlung der Osteoporose bei ovariectomierten Ratten der Behandlung mit Vitamin D überlegen ist.

Alfacalcidol erhöht in vivo und in vitro die Synthese von TGFβ und IGF-II, die die Osteoblastendifferenzierung und -proliferation stimulieren, sowie die Zahl der IGF-I-Rezeptoren und die Bindung an diese. Dadurch kommt es einerseits zu vermehrter Osteoblastenaktivität und Knochenmatrixsynthese, sowie vermehrter Bildung von Kollagen Typ1 und der Matrixproteine Osteocalcin und Osteopontin über gesteigerte Promotion und Transkription entsprechender Gene. Andererseits wird durch den Einfluss von Alfacalcidol auf das IGF-I-System die Muskelkraft verbessert, da IGF-I der stärkste körpereigene Muskelaktivator ist. [16, 105, 106, 107]

Im Gegensatz dazu schilderten Aerssens und Mitarbeiter [2] in ihrer tierexperimentellen Studie eine Zunahme der mechanischen Beanspruchbarkeit des Knochens unter Alfacalcidol durch Verminderung von IGF-I in der Knochenmatrix.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Alfacalcidol im Tiermodell die Knochenresorption durch Osteoklasten unterdrückt, die Knochenformation aber stimuliert [120]. Ebenso wurde die 1α-Hydroxylase in B-Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen, so dass die Behandlung mit Alfacalcidol auch einen immunmodulatorischen Effekt hat.

Es findet eine Zytokinmodulation statt, wobei die proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12 und TNFα, reduziert und die antiinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-4, IL-10 und TGFβ, vermehrt freigesetzt werden.

Alfacalcidol verhindert auf zellulärer Ebene die Expression von TH1-Helferzellen direkt und indirekt über IL-12 Hemmung aus Monozyten. Die durch die Alfacalcidolbehandlung vermehrt gebildeten TH2-Zellen produzieren antiinflammatorische und damit indirekt knochenprotektive Zytokine. [88, 105]

In weiteren Studien muss geklärt werden, ob dieser immunmodulatorische Effekt ausreicht, um künftig die Dosierung der Immunsuppressiva von Transplantationspatienten, die gleichzeitig mit Alfacalcidol behandelt werden, zu reduzieren, ohne vermehrt Abstoßungsreaktionen zu riskieren. [15, 85]

### 2.3.2.3 Sexualhormonsubstitution

Eine Hormonsubstitution durch Östrogene stellt eine anerkannte antiresorptive Therapie der postmenopausalen Osteoporose dar. Patientinnen in der Menopause weisen einen signifikanten Anstieg der Knochenmasse unter Östrogensubstitution auf.

Wirkmechanismus der Östrogene nach Bartl [3]:

- Hemmung der Osteoklastenaktivität
- Stimulierung der Kollagensynthese in den Osteoblasten
- Förderung der gastrointestinalen Calciumresorption
- Stimulierung der Calcitoninausschüttung
- Beeinflussung der Parathormon-Sekretion
- Verbesserung zentralnervöser Funktionen, dadurch Verringerung der Fallneigung
- Verbesserung der Durchblutung des Knochens

Bei langfristiger Anwendung von Östrogenen kann die Inzidenz für Hüftfrakturen, Wirbel- und Unterarmbrüchen um etwa 50 % gesenkt werden. Die Womens's health initiative study 2003 hat gezeigt, dass die Hormon-Ersatztherapie (HRT) das Risiko vertebraler, nichtvertebraler und Oberschenkelhalsfrakturen signifikant senkt. Gleichzeitig hat die Studie aber erwiesen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen und Brustkrebs unter HRT zunehmen [3]. Daher ist die HRT nur bei klimakterischen Beschwerden indiziert und sollte auf wenige Jahre unmittelbar nach der Menopause beschränkt bleiben. Von einer langfristigen Hormongabe zur Prophylaxe der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose muss nach Abwägen von Nutzen und Risiko abgeraten werden. Zur Wirkung einer Hormontherapie auf Knochendichte oder Frakturraten bei prämenopausalen Frauen liegen keine Daten vor. Bei Patientinnen mit sekundärer Amenorrhoe vor dem 45. Lebensjahr, die oft durch Glukokortikoide bedingt ist, ist eine Hormonsubstitution anzuraten. [10]

In den letzten Jahren werden immer mehr östrogenartige Substanzen eingesetzt, die zwar keine Hormone sind, aber noch einige Wirkungen des Östrogens haben ohne dessen Nebenwirkungen zu verursachen. Sie werden als Selective Estrogen rezeptor Modulators (SERMs) bezeichnet. Ein Vertreter dieser Gruppe ist Raloxifen. In einer weltweiten Studie konnte gezeigt werden, dass Raloxifen das Risiko für das Erstauftreten von Wirbelkörperfrakturen im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu halbiert. Derzeit ist das Präparat zugelassen zur Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose. [3]

Der Hypogonadismus bei Männern stellt ebenfalls einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose dar. Unter adäquater Testosteronsubstitution ist eine signifikante Zunahme der Knochenmasse festzustellen. Inwieweit ein männlicher Hypogonadismus nach Organtransplantation das Osteoporoserisiko erhöht, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. [25, 125]

Randomisierte Therapiestudien mit Androgenen nach Organtransplantation wurden bisher noch nicht durchgeführt.

#### 2.3.2.4 Calcitonin

Calcitonin ist ein Hormon, das in den C-Zellen der Nebenschilddrüse gebildet wird. Es senkt die Calcium- und Phosphatkonzentration im Blut, indem es den Einbau in den Knochen fördert und die osteoklastische Knochenresorption hemmt. Calcitonin ist damit der Antagonist zu Parathormon.

Zusätzlich hat Calcitonin durch Hemmung der Freisetzung und Rezeptorblockade der Schmerzmediatoren eine analgetische Wirkung, so dass es für die Therapie der schmerzhaften Osteoporose besonders geeignet zu sein scheint.

Allerdings bestehen noch viele Unklarheiten bezüglich der Frakturinzidenzsenkung, der genauen Dosierung und optimalen Applikationsweise. Aus diesen Gründen hat sich Calcitonin noch nicht als Langzeittherapeutikum für Osteoporosepatienten bewährt. [7]

#### 2.3.2.5 Bisphosphonate

Bisphosphonate sind Analoga des Pyrophosphats, bei denen der Sauerstoff der P-O-P-Bindung durch Kohlenstoff ersetzt wird (P-C-P-Bindung) (Abbildung 15). Dies macht sie resistent gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse.

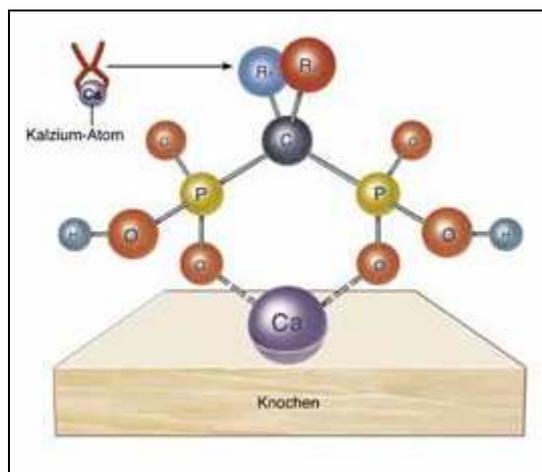


Abbildung 15: Molekulare Struktur der Bisphosphonate

Durch Substitution der beiden Hydrogen-Atome auf dem C-Atom ist es möglich, verschiedene Bisphosphonate zu synthetisieren. Diese unterscheiden sich nach biologischen Eigenschaften, Aktivität, Pharmakokinetik und Toxizität (Abbildung 16).

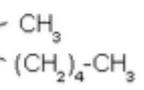
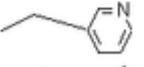
Agent	R <sub>1</sub> side chain	R <sub>2</sub> side chain
Etidronate	-OH	-CH <sub>3</sub>
Clodronate	-Cl	-Cl
Tiludronate	-H	-S- 
Pamidronate	-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
Neridronate	-OH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH <sub>2</sub>
Olpadronate	-OH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Alendronate	-OH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
Ibandronate	-OH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> N 
Risedronate	-OH	
Zoledronate	-OH	

Abbildung 16: Auflistung der in der Klinik verwendeten Bisphosphonate

Bisher wurden Bisphosphonate insbesondere in der Therapie des Morbus Paget und von Knochenmetastasen verwendet.

Bisphosphonate haben eine hohe Affinität zu Strukturen der Knochenoberfläche. Der Großteil der resorbierten Menge wird auf der Oberfläche des Knochens abgelagert, vor allem im Bereich der Resorptionslakunen, also auf der erodierten Knochenober-

fläche unter den Osteoklasten. Dies führt zu einer Hemmung der Osteoklasten mit Verminderung der Knochenresorption. Das abgelagerte Bisphosphonat wird Wochen bis Monate später in den Knochen eingebaut und bleibt dort über viele Jahre bis Jahrzehnte nachweisbar. Es ist jedoch solange inaktiv, bis es im Rahmen des Remodeling des alternden Knochens wieder an die Knochenoberfläche kommt. [3]

Die genauen Wirkmechanismen sind noch nicht vollständig geklärt, aber folgende sind experimentell nachgewiesen (modifiziert nach Bartl) [3]:

- Verminderte Auflösbarkeit der Knochensubstanz und Veränderungen des Mineralisationsprozesses durch Einbau der Bisphosphonate in die Hydroxylapatit-Kristalle und Knochenmatrix
- verminderte Rekrutierung und Fusionierung der Osteoklastenvorläufer
- Hemmung der Osteoklastenaktivität durch Hemmung der Protonen-ATPase
- Hemmung der Enzyme des Mevalonsäure-Stoffwechsels durch die stickstoffhaltigen Bisphosphonate
- Verkürzung der osteoklastären Lebensdauer durch Induktion der Apoptose, wahrscheinlich in Verbindung mit einer Verlängerung der osteoblastären Lebensdauer
- Indirekte Wirkung über die Osteoblasten, die über Hemmfaktoren die osteoklastäre Knochenresorption inhibieren
- Steigerung der osteoblastären Synthese von Kollagen Typ I
- Hemmung der Produktion von PGE<sub>2</sub>, von proteolytischen Enzymen, IL-1 und IL-6, sowie zahlreicher anderer Zytokine

Sowohl in tierexperimentellen, als auch in klinischen Studien wurde eine Zunahme der Knochendichte unter einer Osteoporosetherapie mit Bisphosphonaten der 3. Generation nachgewiesen. [13, 103]

Ippoliti und Mitarbeiter [49] zeigten in ihrer placebokontrollierten Studie, dass Clodronate in der Behandlung der Osteoporose nach Herztransplantation einen signifikanten Anstieg der Knochendichte, sowie eine signifikante Abnahme der Frakturrate innerhalb eines Behandlungsjahres bewirkt.

Sambrook und Mitarbeiter [100] zeigten in ihrer offenen Studie mit 48 herztransplantierten Männern, die über zwei Jahre entweder mit Editronate oder mit Alfacalcidol behandelt wurden, dass nach sechs Monaten der Knochenmasseverlust in der Alfacalcidolgruppe mit 4,6 % im Vergleich zur Editronategruppe mit 7,7 % deutlich niedri-

ger lag. Auch die Frakturrate war in der Alfacalcidolgruppe signifikant niedriger als in der Editronategruppe.

Im Gegensatz dazu berichteten Henderson et al. [100] in ihrer Studie, in der sie den Behandlungseffekt von Editronate mit dem von Calcitriol an herztransplantierten Patienten untersuchten, von vergleichbaren Ergebnissen in beiden Gruppen.

Ähnlich Ergebnisse erzielten Shane und Mitarbeiter in ihrer Studie. 149 herztransplantierte Patienten wurden innerhalb eines Monats in die Studie aufgenommen und ein Jahr lang entweder mit 10 mg Alendronate oder 0,5 µg Calcitriol pro Tag behandelt. Sowohl der Knochenmasseverlust als auch die Frakturrate waren in beiden Gruppen vergleichbar. [37, 117]

### 2.3.3 Stimulation der Knochenformation

#### 2.3.3.1 Fluoride

Die normale tägliche Fluoridaufnahme beträgt 0,2-0,5 mg. Erst ab Fluoridmengen von 8 mg/Tag nimmt die Knochendichte radiologisch nachweisbar zu. Experimentell konnte in Osteoblastenzellreihen ein biphasischer Effekt von Fluoriden nachgewiesen werden: In hohen Dosen supprimieren sie die Zellproliferation und führen zu einer verminderten Knochenmasse und -Stärke. Hingegen fanden sich unter niedrigeren Dosen eine verstärkte Osteoblastenreplikation mit nachfolgend erhöhtem trabekulären Knochenvolumen und Wanddicke. Hydroxylapatit wird dabei durch Fluorapatit ersetzt. Dies bewirkt eine heilende Wirkung auf Mikrofrakturen, sowie eine Verstärkung vorhandener Strukturen, es kommt aber nicht zu einer Erniedrigung der Fragilität; der Knochen ist durch den Einbau von Fluorid zwar resistenter gegen Abbau, aber rigider infolge Veränderungen der Größe und Struktur der Kristalle, die kortikale Dichte ist im Vergleich zur Spongiosa nicht erhöht; Masse und Qualität werden nicht in gleichem Maße beeinflusst. Bei der Fluoridtherapie besteht ein enges therapeutisches Fenster. In den vorliegenden Studien liegt die Dosierung bei durchschnittlich 50 mg Fluorid/Tag. Durch ein Calcium- und Calcitrioldefizit unter Fluoridtherapie kann eine Mineralisationsstörung resultieren, so dass die Behandlung um diese Präparate ergänzt werden sollte. [11,13, 63, 90, 93, 109]

#### 2.3.3.2 Parathormon

Parathormon ist ein Polypeptid, das aus 84 Aminosäuren besteht. Tierexperimentelle Studien mit niedrigdosiertem Parathormon sowie klinische Beobachtungen bei Patienten mit einem mittelgradigen Hyperparathyreoidismus ergaben Hinweise für einen

anabolen Effekt auf trabekulären Knochen, möglicherweise durch eine Erhöhung der Lebensdauer reifer Osteoblasten. Daraus ergibt sich nicht nur eine Erhöhung der Knochendichte, sondern auch eine Verbesserung der Mikroarchitektur mit festeren und stärker vernetzten Trabekeln. Dieser Effekt kann bereits durch subkutane Injektion von PTH-Fragmenten erreicht werden.

Obwohl es in niedriger Dosierung anabol auf den Knochen wirkt, steigert es in hoher Dosierung die Knochenresorption. [11, 38, 39, 118]

Parathormon ist derzeit in Deutschland zur Behandlung der manifesten Osteoporose bei postmenopausalen Frauen zugelassen. Für die Behandlung der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose liegen noch keine ausreichenden Therapieergebnisse vor, die eine generelle Empfehlung rechtfertigen würde. [11]

#### 2.3.3.3 Wachstumshormon und Insulin-like growth factor

Brixen et al. [4] behandelten junge Männer mit Wachstumshormon, um die Effekte auf den menschlichen Knochen zu untersuchen. Dabei wurden die Marker der Knochenformation und -resorption analysiert. Da im Verlauf der Behandlung alle Marker anstiegen, ist davon auszugehen, dass GH sowohl Osteoklasten als auch Osteoblasten beeinflusst.

Johannsen et al. [52] behandelten in ihrer Studie einen Patienten mit idiopathischer Osteoporose und vermindertem IGF- Serumspiegel mit IGF-1. Im Verlauf war ein Anstieg der Knochenformationsmarker und der Knochenresorptionsmarker zu verzeichnen.

GH und IGF scheinen ähnliche Effekte auf das bone-remodeling zu haben. Es sind jedoch noch weitere Studien erforderlich, um herauszufinden, ob GH und IGF künftig in der Osteoporosebehandlung eingesetzt werden können.

#### 2.3.3.4 Anabole Steroide

Anabole Steroide sind synthetische Derivate natürlich vorkommender Androgene. Ihr Wirkmechanismus besteht in einer Erhöhung der Muskelmasse und damit in einer Steigerung des muskulären Zugs am Knochen. Dieser physiologische Reiz führt zu einem Aufbau des Knochens.

Bei der Anwendung anaboler Steroide kommt es häufig zu schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen, wie Leberenzymerrhöhung, Natriumretention, Veränderungen im Fettstoffwechsel, sowie einer Maskulinisierung. [7]

Aufgrund dieser Nebenwirkungen sollte die Behandlung mit anabolen Steroiden nur in ausgewählten Fällen erfolgen. Es sind weitere Studien erforderlich, um das Verhältnis von Nutzen und Risiko künftig genauer abschätzen zu können.

#### 2.3.3.5 Nichtmedikamentöse und physikalische Maßnahmen

Es sollte auf eine ausgewogene Ernährung geachtet werden, um Vitaminmangelzustände zu vermeiden. Insbesondere sollte der Anteil an calciumreichen Lebensmitteln erhöht, der Anteil an phosphatreicher Kost gesenkt werden [81].

Da Immobilisation und Bewegungsarmut eine weitere Abnahme der Knochenmasse verursachen, stellt die physikalische Therapie einen wichtigen Bestandteil in der Behandlung von Osteoporosen dar. Die körperliche Aktivität sollte auf eine physiologische Knochenbelastung hin ausgerichtet sein, um die Muskelfunktion und die Beweglichkeit zu verbessern, Stürze dadurch zu vermeiden und ein mögliches Knochenwachstum bei einer entsprechenden Therapie zielgerichtet zu steuern.

### 3 Methodik

#### 3.1 Studienpatienten

##### 3.1.1 Alfacalcidolgruppe

52 Patienten (12 Frauen; 40 Männer; mittleres Alter  $52 \pm 11$ ) durchschnittlich  $5 \pm 3$  Monate nach orthotoper Herztransplantation wurden zwischen 1997 und 2001 in der Herztransplantationsambulanz der Medizinischen Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität in München, in die Studie eingeschlossen.

Ausschlusskriterien für den Studieneinschluss beinhalteten Erkrankungen, die den Knochen- und Mineralhaushalt beeinflussen, wie ein supprimiertes TSH, eine manifeste Hyperthyreose, ein primärer Hyperparathyreoidismus und eine eingeschränkte Nierenfunktion mit Creatinin  $> 2,5$  mg/ml.

Die postoperative Immunsuppression bestand bei 52 Patienten aus einer Dreifach-Kombinationstherapie mit Cyclosporin A oder Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil und Glukokortikosteroiden.

Cyclosporin A wurde in einer mittleren Dosis von 2-5 mg/kg/Tag adaptiert an Serumspiegelkonzentration von 120-180 ng/ml (monoklonalen, monospezifischen Immunoassay) verabreicht.

Tacrolimus wurde in einer mittleren Dosis von 2-6 mg FK 506/Tag adaptiert an die Serumspiegelkonzentration von 10-16 ng/ml (ELISA) verabreicht.

Mycophenolat Mofetil wurde in einer mittleren Tagesdosis von 2-6 g, adaptiert an die angestrebte Serumkonzentration von 2-4  $\mu$ g/ml (ELISA) verabreicht.

Die intravenöse Gabe von Glukokortikosteroiden bestand aus 500 mg Methylprednisolon intraoperativ und dreimal 125 mg Methylprednisolon in den ersten 24 Stunden. Ab dem ersten postoperativen Tag erhielten alle Patienten oral 1 mg/kg/Tag Prednisolon. Innerhalb von drei bis vier Wochen erfolgte eine Dosisreduktion auf 7,5 mg Prednisolon täglich. In der Regel erfolgte eine weitere Dosisreduktion auf 5 mg Prednisolon täglich bzw. 2,5 mg Prednisolon täglich, sechs bzw. zwölf Monate nach orthotoper Herztransplantation. Akute Abstoßungen (ISHLT-Grad  $\geq$  IB; 1 Jahr POP  $>$  IB) wurden mit einer intravenösen Steroid-Pulstherapie (Methylprednisolon 0,5 bis 1,0 g) an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt.

Es wurden die Daten von 46 Patienten sowohl für die Basisuntersuchung als auch für die Therapiestudie statistisch ausgewertet. Ein Patient verstarb innerhalb des ersten Studienjahres aufgrund von Transplantatversagen. Bei fünf Patienten kam es zu einem (zeitweisen) Abbruch der Studienmedikation auf Grund von Erkrankungen bzw. Noncompliance, so dass diese Daten nicht ausgewertet werden konnten.

### 3.1.2 Historische Placebogruppe

Aus ethischen Gründen wurden die Ergebnisse der Alfacalcidolgruppe mit den Ergebnissen einer historischen Placebogruppe verglichen [127, 128]. Ein- und Ausschlusskriterien, sowie sämtliche Untersuchungsmethoden waren mit denen der Alfacalcidolgruppe identisch.

32 Patienten (1 Frau; 31 Männer; mittleres Alter  $52 \pm 9$ ) durchschnittlich  $5 \pm 4$  Monate nach orthotoper Herztransplantation waren zwischen 1995 und 1997 in der Herztransplantationsambulanz der Medizinischen Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität in München, eingeschlossen worden.

Die postoperative Immunsuppression bestand bei allen Patienten aus einer Dreifach-Kombinationstherapie mit Cyclosporin A oder Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil und Glukokortikosteroiden.

Cyclosporin A wurde in einer mittleren Dosis von 2-5 mg/kg/Tag adaptiert an Serumspiegelkonzentration von 120-180 ng/ml (monoklonalen, monospezifischen Immunoassay) verabreicht.

Tacrolimus wurde in einer mittleren Dosis von 2-6 mg FK 506/Tag adaptiert an die Serumspiegelkonzentration von 10-16 ng/ml (ELISA) verabreicht.

Mycophenolat Mofetil wurde in einer mittleren Tagesdosis von 2-6 g, adaptiert an die angestrebte Serumkonzentration von 2-4  $\mu\text{g/ml}$  (ELISA) verabreicht.

Die intravenöse Gabe von Glukokortikosteroiden bestand aus 500 mg Methylprednisolon intraoperativ und dreimal 125 mg Methylprednisolon in den ersten 24 Stunden. Ab dem ersten postoperativen Tag erhielten alle Patienten oral 1 mg/kg/Tag Prednisolon. Innerhalb von drei bis vier Wochen erfolgte eine Dosisreduktion auf 7,5 mg Prednisolon täglich. In der Regel erfolgte eine weitere Dosisreduktion auf 5 mg Prednisolon täglich bzw. 2,5 mg Prednisolon täglich, sechs bzw. zwölf Monate nach orthotoper Herztransplantation. Akute Abstoßungen (ISHLT-Grad  $\geq$  IB; 1 Jahr POP  $>$  IB) wurden mit einer intravenösen Steroid-Pulstherapie (Methylprednisolon 0,5 bis 1,0 g) an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt.

## 3.2 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive longitudinale Studie, die mit dem Ziel konzipiert wurde, den Effekt einer Behandlung mit Alfacalcidol gegenüber einer Placebogabe zusätzlich zur Basistherapie mit Calcium und Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus im Hinblick auf Zunahme der Knochendichte, Parameter des Knochenmetabolismus und neu aufgetretenen Frakturen in der Osteoporoseprophylaxe und -therapie aufzuzeigen.

### 3.2.1 Alfacalcidolgruppe

Die eingeschlossenen Patienten erhielten 1 µg Alfacalcidol (Doss, Byk Gulden, Deutschland) und 500 mg elementares Calcium pro Tag (Calcium-sandoz forte 1x/Tag, Novartis Consumer Health GmbH, Deutschland). Bei der Einschlussuntersuchung wurde ein Screening des Sexualhormonstatus durchgeführt, um Einflüsse eines Hypogonadismus auszuschließen. Hypogonade männliche Patienten wurden vor Studienbeginn mit 250 mg Testosteronester (Testoviron-Depot, Schering, Deutschland) intramuskulär alle 3 Wochen substituiert. In Abhängigkeit vom Basisspiegel wurde das Dosisintervall in Einzelfällen auf 2 bzw. 4 Wochen adaptiert.

Postmenopausale Patientinnen wurden je nach Verträglichkeit mit einem Kombipräparat aus 17β-Estradiol, 1 mg Estriol und 1 mg Norethisteronacetat (Kliogest, Novo Nordisk Pharma GmbH, Deutschland), einem Präparat aus konjugierten Estrogenen und intermediärem Medrogeston (Presomen compositum, Kali-Chemi Pharma GmbH, Deutschland) oder einer transdermalen Estradiolapplikation (Estraderm TTS, 4 mg Estradiol, Ciba-Geigy GmbH, Deutschland) substituiert.

### 3.2.2 Placebogruppe

Die eingeschlossenen Patienten erhielten Placebo und 500 mg elementares Calcium pro Tag (Calcium-sandoz forte 1x/Tag, Novartis Consumer Health GmbH, Deutschland). Ebenso wie in der Alfacalcidolgruppe wurde bei der Einschlussuntersuchung ein Screening des Sexualhormonstatus durchgeführt, um Einflüsse eines Hypogonadismus auszuschließen. Hypogonade männliche Patienten wurden vor Studienbeginn mit 250 mg Testosteronester (Testoviron-Depot, Schering, Deutschland) intramuskulär alle 3 Wochen substituiert. In Abhängigkeit vom Basisspiegel wurde das Dosisintervall in Einzelfällen auf 2 bzw. 4 Wochen adaptiert.

Postmenopausale Patientinnen wurden je nach Verträglichkeit mit einem Kombipräparat aus 17β-Estradiol, 1 mg Estriol und 1 mg Norethisteronacetat (Kliogest, No-

vo Nordisk Pharma GmbH, Deutschland), einem Präparat aus konjugierten Estrogenen und intermediärem Medrogeston (Presomen compositum, Kali-Chemi Pharma GmbH, Deutschland) oder einer transdermalen Estradiolapplikation (Estraderm TTS, 4 mg Estradiol, Ciba-Geigy GmbH, Deutschland) substituiert.

### **3.3 Einschlusskriterien**

Eingeschlossen wurden bei beiden Patientengruppen Patienten nach Herztransplantation, die bei Aufnahme in die Studie älter als 18 Jahre waren und nach ausführlicher Aufklärung über das Prozedere der Studie und die für den Probanden möglicherweise entstehenden Vor- und Nachteile schriftlich ihr Einverständnis über die Teilnahme an der Studie erteilten.

Das Durchführen der Studie wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt.

### **3.4 Ausschlusskriterien**

Ausschlusskriterien für eine Aufnahme in die Studie waren bei beiden Patientengruppen Erkrankungen, die den Knochen- und Mineralhaushalt beeinflussen, wie ein supprimiertes TSH, eine manifeste Hyperthyreose, ein primärer Hyperparathyreoidismus, sowie Nephrolithiasis, Nephrocalcinose, Hypercalcämie, Hypercalciurie und eingeschränkte Nierenfunktion mit Creatinin  $>2,5$  mg/ml. Ebenso von der Studienaufnahme ausgeschlossen wurden Patienten mit schweren Begleiterkrankungen wie metastasierende Tumore, Kollagenosen und autoimmunologische Lebererkrankungen.

### **3.5 Untersuchungsmethoden**

#### **3.5.1 Anamnese und körperliche Untersuchung**

Bei Aufnahme in die Studie wurde eine ausführliche osteologische und endokrinologische Anamnese erhoben. Festgehalten wurden Beschwerden des Bewegungsapparates, Reduktion der Körpergröße, vorangegangene traumatische und atraumatische Frakturen, sowie Störungen des Sexualhormonhaushaltes mit Abnahme von Libido und Potenz, Schilddrüsenerkrankungen und Diabetes mellitus. Die Patienten wurden nach längeren Immobilisationsphasen sowie Alkohol- und Nikotinkonsum und Medikamenteneinnahme befragt.

Bei der körperlichen Untersuchung wurden Größe und Gewicht gemessen.

Es folgte eine Untersuchung der Wirbelsäule; Skoliosen, Kyphosen, Hautfaltenasymmetrien, Bauchdeckenvorwölbung, sowie Druck- und Kompressionsschmerz wurden dokumentiert und abschliessend die Beweglichkeit der Wirbelsäule mittels Finger-Bodenabstand und Schoberzeichen beurteilt, sowie radikuläre Schmerzen mit positivem Lasegue-Zeichen festgehalten.

Die Anamnese und die körperliche Untersuchung wurden ein Jahr nach Studieneinschluss wiederholt.

### 3.5.2 Knochendichtemessungen

#### 3.5.2.1 Digitale Radiographie

Die Knochenmineralsalzdichte (BMD) wurde an der Lendenwirbelsäule und am Femurhals mit Hilfe der Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) mit einem Gerät der Marke Lunar Expert-XL bestimmt. Die mittlere Knochenmineralsalzdichte an der Lendenwirbelsäule wurde aus anterior-posterior Messungen der Wirbelkörper in der Regel LWK 1-4 errechnet. Frakturierte Wirbelkörper im Bereich LWK 1-4 wurden aus der Messung ausgeschlossen. Die Knochendichte wurde in  $\text{g/cm}^2$  und standardisiertem T-Score, der die individuellen Werte auf junge, gesunde, gleichgeschlechtliche Erwachsene der Altersgruppe 25-35 Jahre bezieht, gemessen.

#### 3.5.2.2 Quantitative Computertomographie

Die Knochenmineralsalzdichte des spongiösen Knochens wurde im Bereich der Lendenwirbelkörper LWK 1-4 mittels quantitativer Computertomographie gemessen. Verwendet wurde dazu die Zwei-Energie Methode (Somaton Plus 4, Siemens AG, Forchheim, Deutschland). Alle Patienten wurden in Rückenlage positioniert, und es wurde ein seitliches Radiogramm angefertigt. Anschließend wurde die mittervertebrale Schicht in der Regel von LWK 1-3, und jeweils der Auswertebereich (Region of Interest, ROI) in der Spongiosa festgelegt. Der gemessene, energieabhängige Wert in Hounsfield-Einheiten wurde zur Festlegung der vertebrealen Knochendichte (VBD) mit einem Referenzsystem bekannter Zusammensetzung und Dichte verglichen. Die Kalibrierung der Messwerte auf  $\text{mg Hydroxylapatit (HA) pro cm}^3$  erfolgte über ein Phantom, welches Referenzsubstanzen wie wässrige  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösungen der Kunststoffmaterialien mit HA-Beimengungen enthielt. Das Ergebnis wurde als Mittelwert von LWK 1-3 ausgedrückt und mit einem altersbezogenen, kaukasischen Normalkollektiv verglichen. Die Reproduzierbarkeit lag bei 2 %, die Genauigkeit bei 5-10 %.

### 3.5.3 Radiologische Untersuchungen

Zur Bestimmung von Frakturen wurde eine konventionelle anterior-posteriore und laterale Aufnahmen der Brust- und Lendenwirbelsäule durchgeführt. Die Frakturen wurden nach den internationalen Richtlinien der „Osteoporotic fracture group“ definiert.

### 3.5.4 Biochemische Untersuchung des Knochenstoffwechsels

Bei jedem Patienten wurde bei der Einschlussuntersuchung eine Serumprobe entnommen und Calcium, Gesamtprotein, Albumin, Magnesium, Phosphat, Creatinin, Harnstoff und alkalische Phosphatase mit einem automatischen Analysegerät (Hitachi 917, Boehringer, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Gesamttestosteron, SHBG, freier Testosteronindex, Estradiol, Prolaktin, Gonadotropine, intaktes Parathormon, 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, TSH, FT3 und FT4 wurden mittels Radioimmunoassay gemessen. [133]

Die Gonadotropine wurden erneut 30 Minuten nach Stimulation mit Gonadotropin-Releasing Hormon (Relefact<sup>®</sup> LH-RH 0,1 mg; Hoechst; Bad Soden, Deutschland) untersucht.

In 24 Stunden-Urinsammlungen wurde Calcium, Phosphat und Creatinin bestimmt (Hitachi 717, Boehringer, Mannheim, Deutschland), und die Creatininclearance sowie die 24 Stunden-Calcium- und 24-Stunden-Phosphatausscheidung errechnet. Die obengenannten Serum- und Urinuntersuchungen wurden 12 Monate nach Therapiebeginn erneut durchgeführt. Calcium und Creatinin in Blut und 24-Stunden-Sammelurin wurde zur Überwachung der Nierenfunktion erstmals nach sechs Wochen und anschließend nach 3, 6, 9 und 12 Monaten kontrolliert. Die Blutparameter 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>, alkalische Phosphatase und intaktes Parathormon wurden 3, 6 und 12 Monate nach Therapiebeginn bestimmt. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der zu Kontrollzwecken durchgeführten Untersuchungen.

Tabelle 2: Übersicht über die biochemische Parameter in Serum und Urin und den Analysezeitpunkt

Parameter	Zeitpunkt der Analyse				
	Einschluss	6 Wochen	3 Monate	6 Monate	12 Monate
<b>Serum</b>					
Calcium	X	X	X	X	X
Creatinin	X	X	X	X	X
25-OH Vit. D <sub>3</sub>	X		X	X	X
IPTH	X	X	X	X	X
APH	X	X	X	X	X
KAPH	X	X	X	X	X
LH	X				X
FSH	X				X
Estradiol	X				X
Testosteron	X				X
<b>Urin</b>					
Calcium	X	X	X	X	X
Phosphat	X	X	X	X	X
Creatinin	X	X	X	X	X

### 3.5.5 Untersuchung spezifischer Knochenmarker

Aus jeweils einer Serum- und einer Morgenurinprobe nach nächtlicher Fastenperiode wurden am Institut für Physiologie, physiologische Chemie und Tierernährung der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München folgende spezifische Knochenmarker bestimmt: Die Marker der Knochenformation beinhalteten Osteocalcin und die knochenspezifische alkalische Phosphatase. Als Marker der Knochenresorption wurden die Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) im Urin bestimmt. Diese Analysen wurden 12 Monate nach Therapiebeginn wiederholt.

Die Bestimmung von Osteocalcin im Serum wurde mit einem ELISA der Firma Diagnostic System Laboratories durchgeführt. Die Bestimmung der Einzelkonzentrationen der Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) im Urin erfolgte mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) nach einer modifizierten isokratischen Methode nach Black. Die knochenspezifische alkalische Phosphatase im Serum wurde mit einem Enzymimmunoassay Alkphase-B<sup>TM</sup> (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) bestimmt.

### 3.6 Statistische Analyse

Alle Daten in Text, Tabellen und Graphiken wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben, soweit nicht anders vermerkt. Zum Vergleich der Gruppen

wurde ein gepaarter bzw. ungepaarter t-Test für normal verteilte Variablen sowie der Mann-Whitney-U-Test für nicht normal verteilte Variablen benutzt. Für Korrelationsanalysen wurden Pearson's bivariate Korrelationskoeffizienten errechnet. Für alle Tests wurden Unterschiede als signifikant gewertet, wenn der p-Wert des jeweiligen statistischen Testverfahrens  $< 0,05$  war. Die Datenaufnahme und -verarbeitung wurde mit dem SPSS 9.0 Statistik-Software-Paket für Windows 98 durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tacrolimus-basierende Immunsuppression

#### 4.1.1 Patientendaten

Es wurden 61 Patienten in die Studie aufgenommen. Ein Patient verstarb innerhalb des ersten Studienjahres durch Transplantatversagen. Bei fünf Patienten kam es zu einem (zeitweisen) Abbruch der Studienmedikation auf Grund von Erkrankungen bzw. Noncompliance, so dass diese Daten nicht ausgewertet werden konnten. Tabelle 3 zeigt die demographischen und klinischen Basisdaten der 55 Studienpatienten mit einer auf Tacrolimus basierenden immunsuppressiven Behandlung, aufgeteilt in eine Alfalcidol- und eine Placebogruppe.

Die Behandlung mit Glukokortikoiden und Mycophenolat Mofetil erfolgte wie im Kapitel Methodik beschrieben. Zwischen beiden Gruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der in Tabelle 3 aufgeführten Parameter.

Tabelle 3: Patientencharakteristika nach HTx unter Tacrolimus unterteilt nach Alfalcidol und Placebo

	<b>Alfalcidol</b>	<b>Placebo</b>
Patientenanzahl	37	18
Geschlecht (m/w)	28/9	18/0
Alter (Jahre)	58 ± 12	53 ± 12
Zeit nach HTx (Monate)	5 ± 3	5 ± 4
Indikationen für HTx (dCMP* / iCMP** / andere)	25/11/1	12/5/1
Anzahl hypogonade Patienten vor Randomisierung (m/w)	13/5	3/0
Anzahl der behandelten Abstoßungsreaktionen	1 ± 2	1 ± 2
Kumulative Kortikosteroiddosis (g)	5,2 ± 3,9	4,9 ± 3,4

\*dilatare Kardiomyopathie, \*\* ischämische Kardiomyopathie;  
Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen

#### 4.1.2 Biochemische Untersuchungen

Tabelle 4 zeigt die Basisdaten der biochemischen Untersuchungen bei Studieneinschluss. Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der dort aufgeführten Parameter.

Bereits bei der Basisuntersuchung wiesen die Patienten beider Gruppen eine Einschränkung der Nierenfunktion mit verminderter Creatininclearance, sowie nachfol-

gend erhöhten Creatinin und Harnstoff-N-Werte im Serum auf. Alle weiteren Parameter lagen in beiden Gruppen im Normbereich.

In beiden Gruppen korrelierten Creatinin im Serum ( $r_A = 0,26$ ;  $r_P = 0,23$ ), Harnstoff-N ( $r_A = 0,01$ ;  $r_P = 0,06$ ) und intaktes PTH ( $r_A = 0,20$ ;  $r_P = 0,46$ ) positiv mit dem Zeitraum nach HTx.

Ebenso korrelierte intaktes PTH positiv mit Creatinin ( $r_A = 0,63$ ;  $r_P = 0,19$ ) und Harnstoff-N ( $r_A = 0,67$ ;  $r_P = 0,17$ ), negativ mit Calcium ( $r_A = -0,22$ ;  $r_P = -0,25$ ).

In beiden Gruppen ergab sich eine positive Korrelation von Phosphat im Serum mit Creatinin im Serum ( $r_A = 0,01$ ;  $r_P = 0,09$ ).

Tabelle 4: Basisdaten der biochemischen Untersuchungen nach HTx unter Tacrolimus unterteilt in Alfacalcidol- und Placebogruppe

Parameter	Normwerte	Basisdaten Alfacalcidol n= 37	Basisdaten Placebo n= 18
<b>Serum</b>			
Creatinin [mg/dl]	0,5 -1,2l	1,6 ± 0,6	1,5 ± 0,3
Harnstoff-N [mg/dl]	9 - 24	33,0 ± 17,5	26 ± 10
iPTH [pg/ml]	10 - 55	66 ± 39	49 ± 18
25OH Vit. D <sub>3</sub> [nmol/l]	50 - 300	88 ± 38	89 ± 48
Eiweiß [g/dl]	6,1 - 8,2	7,5 ± 2,1	6,9 ± 0,4
Albumin [g/d]	3,5 - 5,0	4,8 ± 0,5	4,6 ± 0,4
APH [U/l]	40 - 190	105 ± 56	113 ± 47
Calcium [mmol/l]	2,1 - 2,6	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Phosphat [mg/dl]	2,5 - 4,8	2,6 ± 1,0	3,1 ± 0,8
Magnesium [mmol/l]	0,65 - 1,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2
TSH [μU/ml]	0,4 - 4	0,8 ± 0,9	0,7 ± 0,5
FT3 [pg/dl]	2,3 - 4,2	2,9 ± 0,6	2,6 ± 0,6
FT4 [ng/dl]	0,8 -1,8	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,3
<b>Urin</b>			
Calcium/24h [mmol]	< 10	4,0 ± 2,5	4,8 ± 3,3
Phosphat/24h [mg]	< 1000	804 ± 330	995 ± 409
Creatinin/24h [g]	0,8 - 22	12,7 ± 5,3	13,9 ± 6,5
ClCr [ml/min]	> 95	61 ± 32	66 ± 33

Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen des Knochenstoffwechsels bei Einschluss und nach zwölf Monaten unterteilt in die Alfacalcidol- und Placebo-Gruppe.

Beide Gruppen zeigten eine pathologisch verminderte Creatininclearance mit nachfolgend erhöhten Retentionsparametern. Die Verschlechterung der Nierenfunktion war in der Alfacalcidolgruppe innerhalb zwölf Monaten ausgeprägter als in der Placebogruppe. Während in der Alfacalcidolgruppe das Creatinin von  $1,6 \pm 0,6$  mg/dl auf  $2,0 \pm 0,8$  mg/dl statistisch signifikant anstieg ( $p < 0,05$ ), war in der Placebogruppe nur ein Anstieg von  $1,5 \pm 0,3$  mg/dl auf  $1,6 \pm 0,4$  mg/dl zu verzeichnen (n.s.).

Tabelle 5: Biochemische Untersuchungen des Knochenstoffwechsels nach HTx unter Tacrolimus bei Einschluss und nach 12 Monaten unterteilt in Alfacalcidol und Placebo

Parameter	Normwerte	Basisuntersuchung		Nach 12 Monaten	
		Alfacalcidol n = 37	Placebo n = 18	Alfacalcidol n = 37	Placebo n = 18
<b>Serum</b>					
Calcium [mmol/l]	2,1 - 2,6	$2,4 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$
Phosphat [mg/dl]	2,5 - 4,8	$3,6 \pm 1,0$	$3,1 \pm 0,8$	$3,7 \pm 0,7$	$4,0 \pm 1,6$
Creatinin [mg/dl]	0,5 - 1,2	$1,6 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,8^a$	$1,6 \pm 0,4$
25-OH VitD <sub>3</sub> [nmol/l]	50 - 300	$88 \pm 38$	$89 \pm 48$	$108 \pm 49^a$	$101 \pm 52$
iPTH [pg/ml]	10 - 55	$66 \pm 39$	$47 \pm 18$	$48 \pm 43^c$	$72 \pm 30^b$
<b>Urin</b>					
Phosphat in 24h [mg]	< 1000	$804 \pm 330$	$995 \pm 419$	$822 \pm 410$	$946 \pm 463$
Calcium in 24h [mmol]	< 10	$4,0 \pm 2,5$	$4,8 \pm 3,3$	$4,7 \pm 3,0$	$4,4 \pm 3,0$
Creatinin in 24h [g]	0,8 - 2,2	$12,7 \pm 5,3$	$13,9 \pm 6,5$	$14,5 \pm 6,0$	$13,9 \pm 4,5$
ClCr [ml/min]	> 95	$61 \pm 32$	$66 \pm 33$	$57 \pm 39$	$63 \pm 26$

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  im Vergleich mit der Alfacalcidol-Basisuntersuchung, Wilcoxon-Test

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  im Vergleich mit der Placebo-Basisuntersuchung, Wilcoxon-Test

<sup>c</sup>  $p < 0,01$  im Vergleich mit der Untersuchung nach 12 Monaten in der Placebogruppe, Mann-Whitney-U-Test

Keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen

Die Einzelwerte von iPTH unterlagen einer hohen Intra- und Intervariabilität. Abbildung 17 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten mit normalem und erhöhtem iPTH bei Studieneinschluss. IPTH lag bei 57 % der Patienten ( $n = 31$ ) im Normbereich, bei 43 % der Patienten ( $n = 24$ ) war iPTH erhöht.

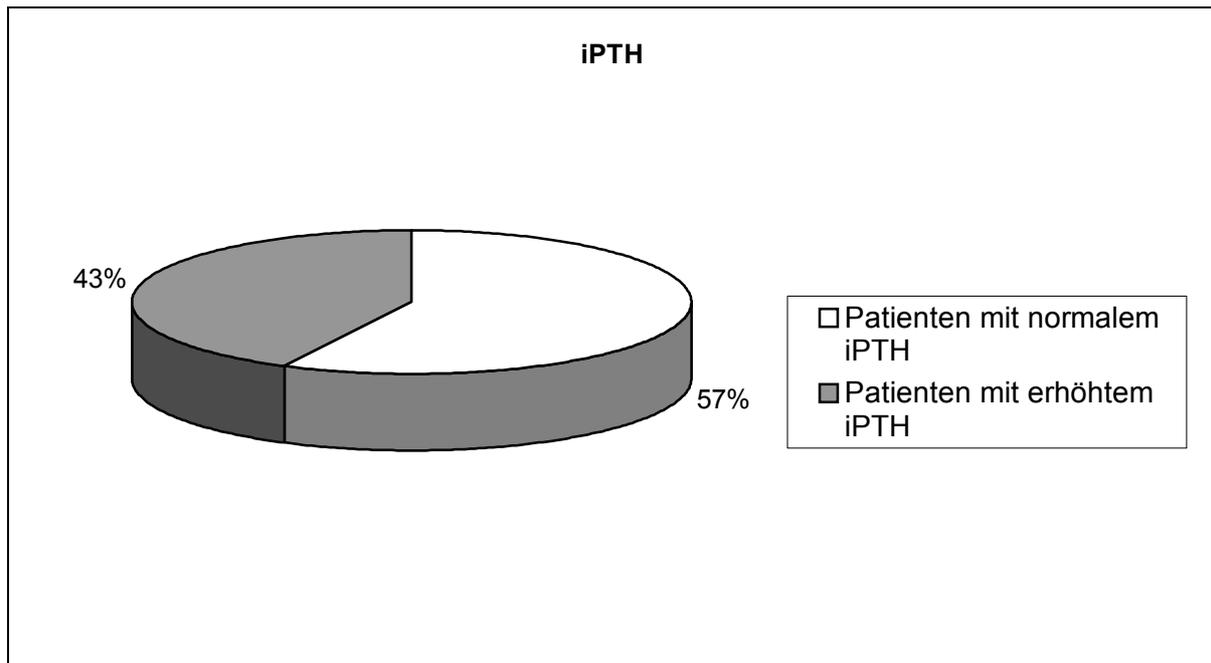


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der Patienten unter Tacrolimus bei Studieneinschluss mit normalen und erhöhtem iPTH

Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil an Patienten mit normalen und erhöhten iPTH Werten bei Studieneinschluss und zwölf Monate nach Behandlung unterteilt in die Alfacalcidol- und die Placebogruppe. Intaktes Parathormon war im Mittel bei Einschluss in der Alfacalcidolgruppe leicht erhöht (n.s.), lag in der Placebogruppe im Normbereich, der Unterschied zwischen beiden Gruppen lag unterhalb des Signifikanzniveaus. Unter einer Behandlung mit Alfacalcidol normalisierte sich das iPTH bei 16 % der Patienten. In der Placebogruppe nahm die Gruppe der Patienten mit erhöhtem iPTH-Werten innerhalb eines Jahres um 9 % zu. In der Placebogruppe stieg iPTH im Verlauf eines Jahres statistisch signifikant an ( $p < 0,05$ ). Die Parathormonspiegel beider Gruppen unterschieden sich 12 Monate nach Studieneinschluss somit signifikant ( $p < 0,01$ ).

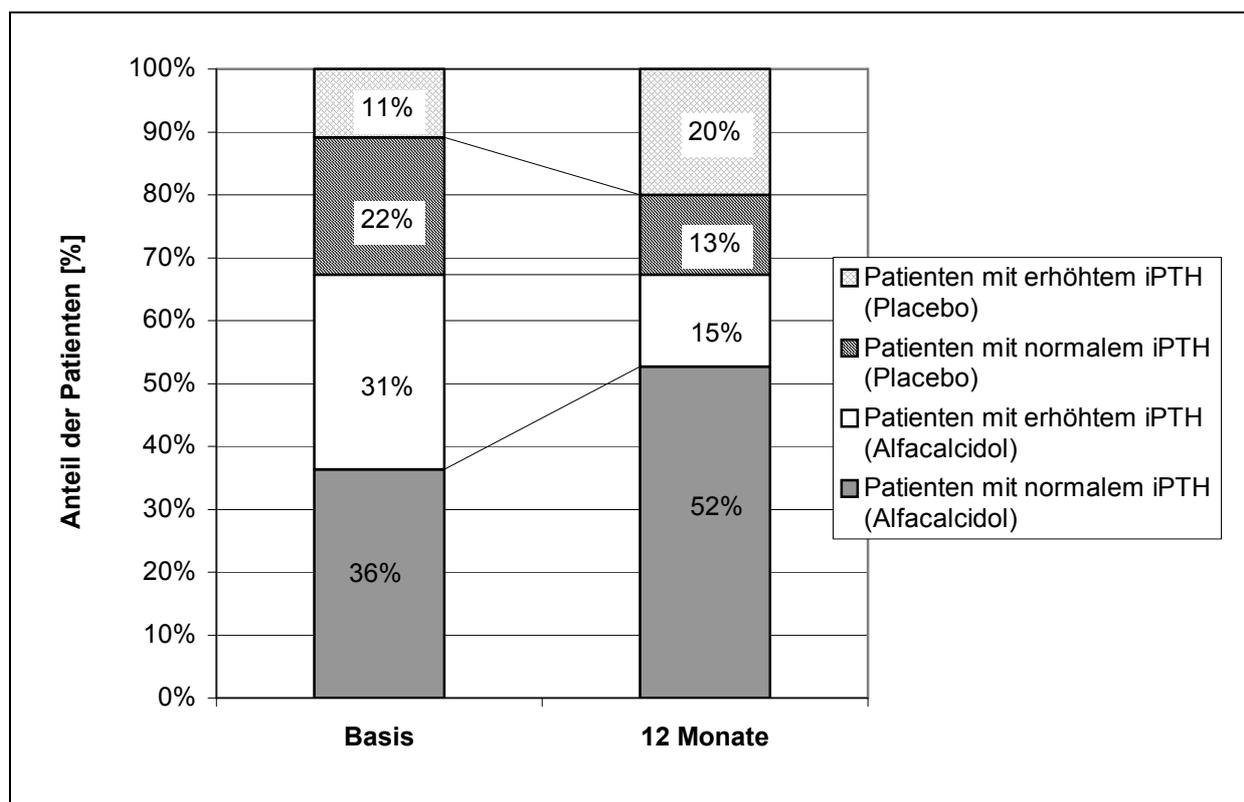


Abbildung 18: Prozentualer Anteil an Patienten unter Tacrolimus mit normalem und erhöhtem iPTH Basis vs. 12 Monate

25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> lag sowohl bei Einschluss als auch in der Kontrolle nach zwölf Monaten in beiden Gruppen im Normbereich. In der Alfacalcidolgruppe war nach zwölf Monaten Behandlung ein signifikanter Anstieg von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ). In der Placebogruppe kam es ebenfalls zu einem Anstieg von 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>, dieser lag jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus.

Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Unter der Therapie mit 1 µg Alfacalcidol und 500 mg Calcium täglich kam es in einem Fall (= 3 %) zu einer Hypercalciurie (Calcium im Urin > 10 mmol/24h) und in zwei Fällen (= 5 %) zu einer Hypercalcämie (Calcium im Serum > 2,6 mmol/l). Bei diesen Patienten wurde erst die Calcium-Dosis auf 250 mg reduziert, musste aber aufgrund weiterhin erhöhter Werte abgesetzt werden. Ein Patient (= 3 %) entwickelte unter der Behandlung Nierensteine, so dass beide Medikamente abgesetzt werden mussten. Aufgrund von mehreren Fällen von Hypercalciurie und Hypercalcämie wurden die Patienten (n = 14), die ab Februar 1999 in die Studie eingeschlossen wurden und die bei der Basisuntersuchung einen normalen Calcium-Serum-Spiegel aufwiesen nur mit 1 µg Alfacalcidol behandelt; auf eine Calciumsubstitution wurde verzichtet.

#### 4.1.3 Sexualhormonstatus

In der Alfacalcidolgruppe wiesen 13 von 28 männlichen Patienten (46 %), in der Placebogruppe 3 von 18 männlichen Patienten (16 %) einen Hypogonadismus mit erniedrigtem Gesamttestosteron und erniedrigtem freien Testosteronindex auf. Die Gonadotropine FSH und LH lagen im Normbereich mit normalem Anstieg 30 Minuten nach intravenöser Gabe von Gonadotropin-Releasing-Hormon.

Tabelle 6 zeigt die Basisdaten des Sexualhormonhaushaltes männlicher Patienten nach Aufteilung in Alfacalcidol- bzw. Placebogruppe.

SHBG war bei Studieneinschluss in der Placebogruppe deutlich erhöht, der Testosteronfreier Index infolgedessen erniedrigt. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen bezogen auf diese beiden Parameter war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Bei den übrigen Parametern waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Tabelle 6: Basisdaten des Sexualhormonhaushaltes männlicher Patienten unter Tacrolimus nach Studieneinschluss unterteilt in Alfacalcidol- und Placebogruppe

Sexualhormone	Normwerte	Männliche Patienten	
		Alfacalcidol n=28	Placebo n=18
LH [mU/ml]	1,5 - 9,2	8,0 ± 7,8	5,9 ± 3,2
LHT *		28,4 ± 21,1	26,7 ± 18,6
FSH [mU/ml]	1 - 14	10,6 ± 12,6	6,5 ± 3,2
FSHT*		16,8 ± 20,2	10,0 ± 6,1
Testosteron [ng/dl]	350 - 1000	373 ± 158	438 ± 129
SHBG [nmol/l]	20 - 50	32 ± 11 <sup>a</sup>	91 ± 28
Testosteronfreier Index [%]	> 35	40 ± 16 <sup>a</sup>	18 ± 5
Estradiol [pg/ml]	15 - 45	31 ± 65	17 ± 6
Prolaktin [µE/ml]	< 500	274 ± 158	217 ± 91

\*30 Minuten nach Stimulation mit 0,1 mg Gonadorelin (Relefact® LH-RH 0,1 mg)

<sup>a</sup> $p < 0,01$  im Vergleich zu der Placebogruppe, Mann-Whitney-U-Test

Keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen

#### 4.1.4 Untersuchung spezifischer Knochenmarker

In Tabelle 7 sind die Veränderungen der Knochenformations- und Resorptionsmarker unterteilt in die Alfacalcidol- und Placebogruppe dargestellt. Alle Knochenmarker zeigten sowohl bei Einschluss, als auch im Verlauf eine hohe Intra- und Intervariabilität.

Um den Effekt von Alfacalcidol auf die Knochenmarker beurteilen zu können, wurden die Delta-Werte der Knochenmarker in beiden Gruppen statistisch ausgewertet. In der Gruppe der Knochenformationsmarker nahm die knochenspezifische alkalische Phosphatase in der Alfacalcidolgruppe ab, in der Placebogruppe war nach drei Monaten ebenfalls eine Abnahme, nach zwölf Monaten jedoch eine geringfügigen Zunahme zu verzeichnen. Osteocalcin nahm im Verlauf eines Jahres in der Alfacalcidolgruppe zu, in der Placebogruppe in den ersten drei Behandlungsmonaten ab, im Verlauf eines Jahres aber ebenfalls zu. Die Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin zeigten in der Alfacalcidolgruppe im Verlauf eine statistisch signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ ). In der Placebogruppe war innerhalb der ersten drei Monate eine geringfügige Abnahme, innerhalb von zwölf Monaten nach Studieneinschluss jedoch eine Zunahme beider Resorptionsmarker zu verzeichnen. In der Placebogruppe waren die Veränderungen nicht signifikant. Der Unterschied der Resorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin in beiden Gruppen war sowohl nach drei, als auch nach zwölf Behandlungsmonaten statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Tabelle 7: Spezifische Knochenmarker von Patienten unter Tacrolimus bei Einschluss, nach 3 und 12 Monaten unterteilt in Alfacalcidol und Placebo

Parameter	Normwerte	Alfacalcidol (n = 20)			Placebo (n = 18)		
		Basis	Delta 0-3 Monate	Delta 0-12 Monate	Basis	Delta 0-3 Monate	Delta 0-12 Monate
KAPH [U/l]	10 - 80	37 ± 22	-3 ± 30	-4 ± 34	35 ± 19	-4 ± 19	1 ± 31
Oc [ng/dl]	4 - 12	40 ± 43	10 ± 22	8 ± 36	16 ± 13	-1 ± 10	3 ± 17
PYD [nmol/mmol Cr]	18 - 24	89 ± 35	-17 ± 20 <sup>ab</sup>	-18 ± 22 <sup>ab</sup>	33 ± 14	-1 ± 12	6 ± 18
DPD [nmol/mol Cr]	4,5 - 6	26 ± 11	-6 ± 7 <sup>ab</sup>	-6 ± 7 <sup>ab</sup>	8 ± 3	0 ± 3	2 ± 4

<sup>a</sup> $p < 0,01$  im Vergleich mit der Basisuntersuchung, Wilcoxon-Test

<sup>b</sup> $p < 0,01$  im Vergleich mit der Placebogruppe, Mann-Whitney-U-Test

#### 4.1.5 Knochendichtemessungen

##### 4.1.5.1 Quantitative Computertomographie

Abbildung 19 zeigt die vertebrale Knochendichte (VBD) der Patienten nach Herztransplantation bei Studieneinschluss in der quantitativen Computertomographie im Vergleich zum Normalkollektiv. Die Knochendichte der Patienten war im Vergleich

zum Normalkollektiv signifikant erniedrigt (VBD:  $86,0 \pm 33,9$  mg/ml vs.  $123,3 \pm 28,9$  mg/ml;  $p < 0,001$ ). Bei 76 % der Patienten war der Knochenmineralsalzgehalt mit Werten unter  $120$  mg/cm<sup>3</sup> vermindert.

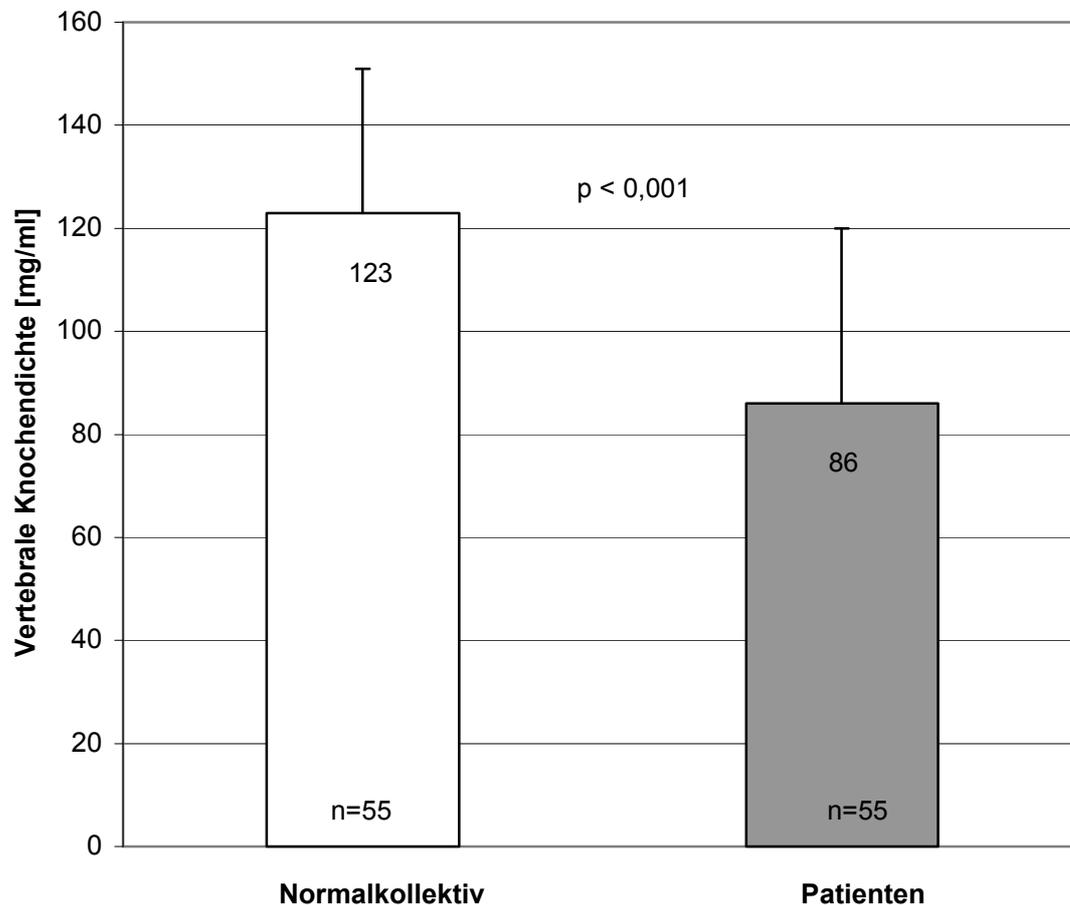


Abbildung 19: Vertebrale Knochendichte herztransplantiierter Patienten unter Tacrolimus im Vergleich zu einem Normalkollektiv

#### 4.1.5.2 Digitale Radiographie

Bei Studieneinschluss konnte in der Alfacalcidolgruppe bei 21 Patienten (57 %) eine im Vergleich zum Durchschnittswert junger Erwachsener normale Knochendichte gemessen werden. Bei 7 Patienten (19 %) musste nach den WHO-Kriterien eine Osteopenie, bei 5 Patienten (13%) eine Osteoporose ohne Frakturen und bei 4 Patienten (11 %) eine klinisch manifeste Osteoporose mit atraumatischen Frakturen diagnostiziert werden. Zwölf Monate nach Behandlung lag in der Alfacalcidolgruppe die Knochendichte bei 25 Patienten (68 %) im Normbereich, 5 Patienten (13 %) hatten eine Osteopenie, 3 Patienten (8 %) Patienten eine Osteoporose ohne Frakturen. Der

Anteil der Patienten mit klinisch manifester Osteoporose blieb unverändert. Die Veränderungen der Knochendichte innerhalb eines Behandlungsjahres im Vergleich zum Durchschnittswert junger Erwachsener war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). Abbildung 20 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten in der Alfacalcidolgruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose. In der Abbildung werden die Veränderungen bezüglich der Knochendichte nach zwölf Monaten Behandlung mit Alfacalcidol dargestellt.

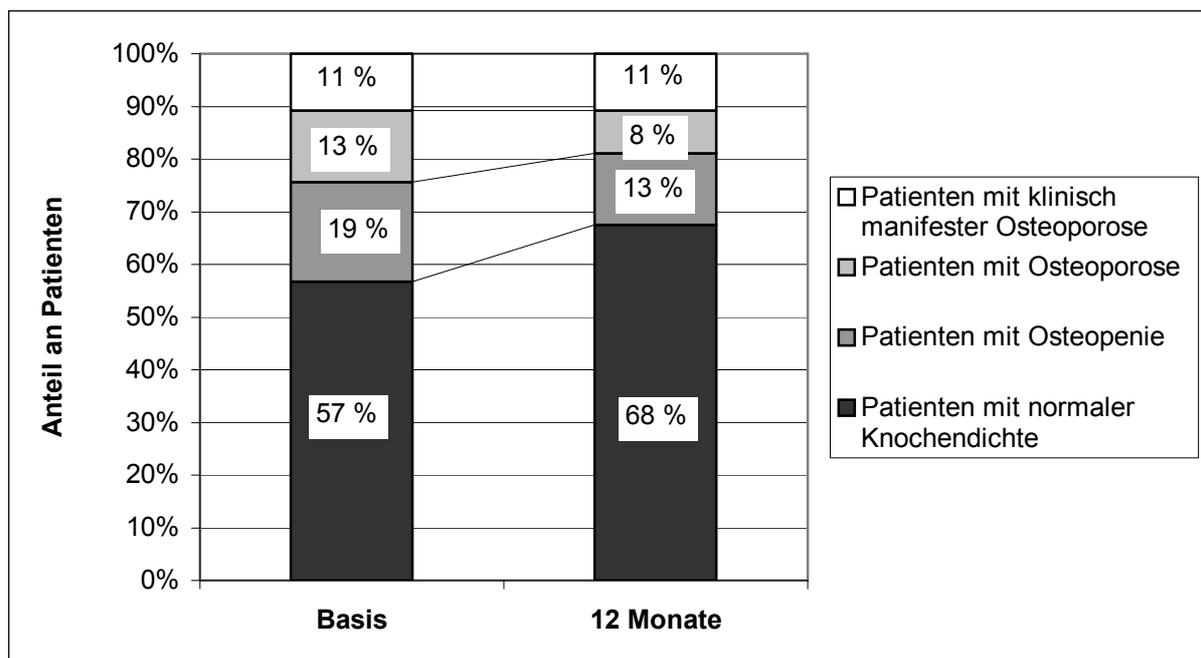


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der Patienten unter Tacrolimus in der Alfacalcidolgruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate

In der Placebogruppe lag bei Studieneinschluss bei 8 Patienten (44 %) die Knochendichte nach den WHO-Kriterien im Normbereich, 6 Patienten (33 %) hatten eine Osteopenie, 3 Patienten (17 %) eine Osteoporose ohne Frakturen und ein Patient (5 %) eine klinisch manifeste Osteoporose mit Fraktur.

Nach zwölf Monaten Behandlung lag in der Placebogruppe die Knochendichte nur noch bei 7 Patienten (39 %) im Normbereich, 7 Patienten (39 %) hatten eine Osteopenie, 2 Patienten (11%) eine Osteoporose ohne Frakturen und 2 Patienten (11 %) eine Osteoporose mit atraumatischen Frakturen. Die Veränderungen der Knochen-

dichte innerhalb eines Behandlungsjahres im Vergleich zum Durchschnittswert junger Erwachsener war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Abbildung 21 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose. In der Abbildung werden die Veränderungen bezüglich der Knochendichte nach zwölf Monaten Behandlung mit Placebo dargestellt.

Die unterschiedliche prozentuale Verteilung der Patienten mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose in der Alfacalcidolgruppe und der Placebogruppe lag sowohl bei Einschluss, als auch nach zwölf Monaten unterhalb des Signifikanzniveaus.

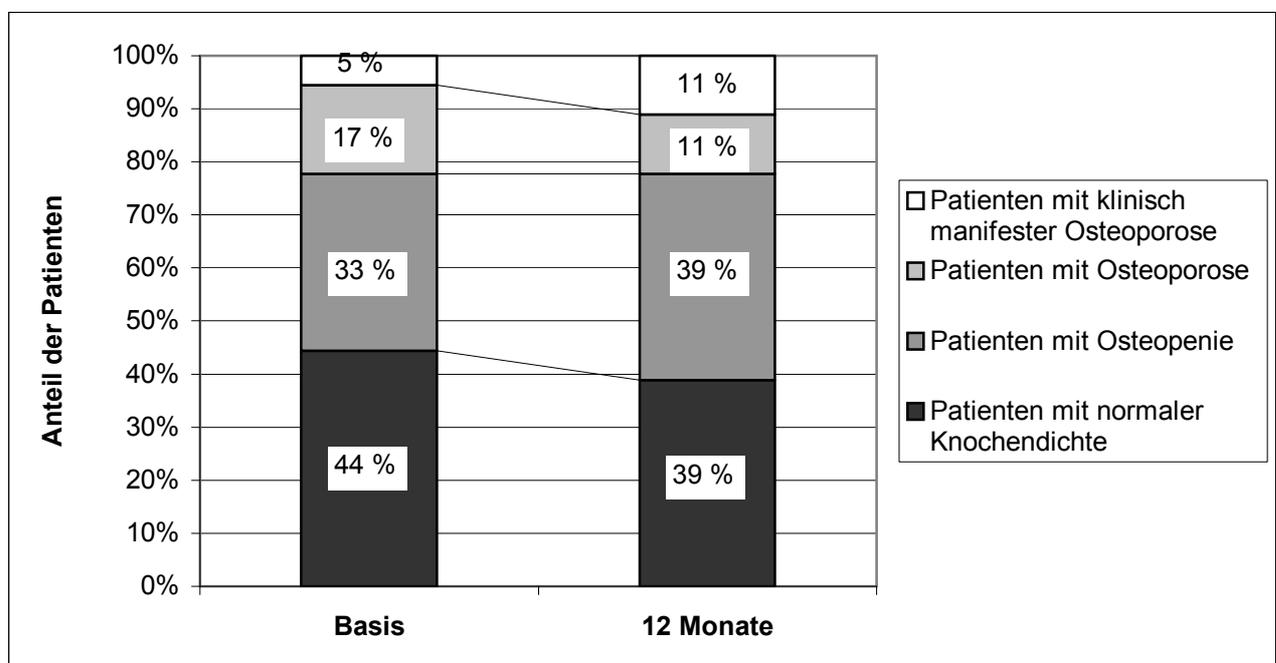


Abbildung 21: Prozentualer Anteil der Patienten unter Tacrolimus in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate

Abbildung 22 zeigt die Knochendichte an der LWS bei Studieneinschluss und ein Jahr nach Einschluss in  $\text{g/cm}^2$ . Betrachtet wird die Alfacalcidolgruppe im Vergleich zur Placebogruppe. Innerhalb von zwölf Monaten nahm die Knochendichte an der LWS im Mittel in der Alfacalcidolgruppe statistisch signifikant um  $0,067 \text{ g/cm}^2$  ( $6,3 \% \pm 7,5 \%$ ) ( $p < 0,01$ ), in der Placebogruppe um  $0,038 \text{ g/cm}^2$  ( $4,5 \% \pm 8,5 \%$ ) zu (n.s.).

Weder bei Studieneinschluss, noch zwölf Monate nach Studienbeginn war der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant.

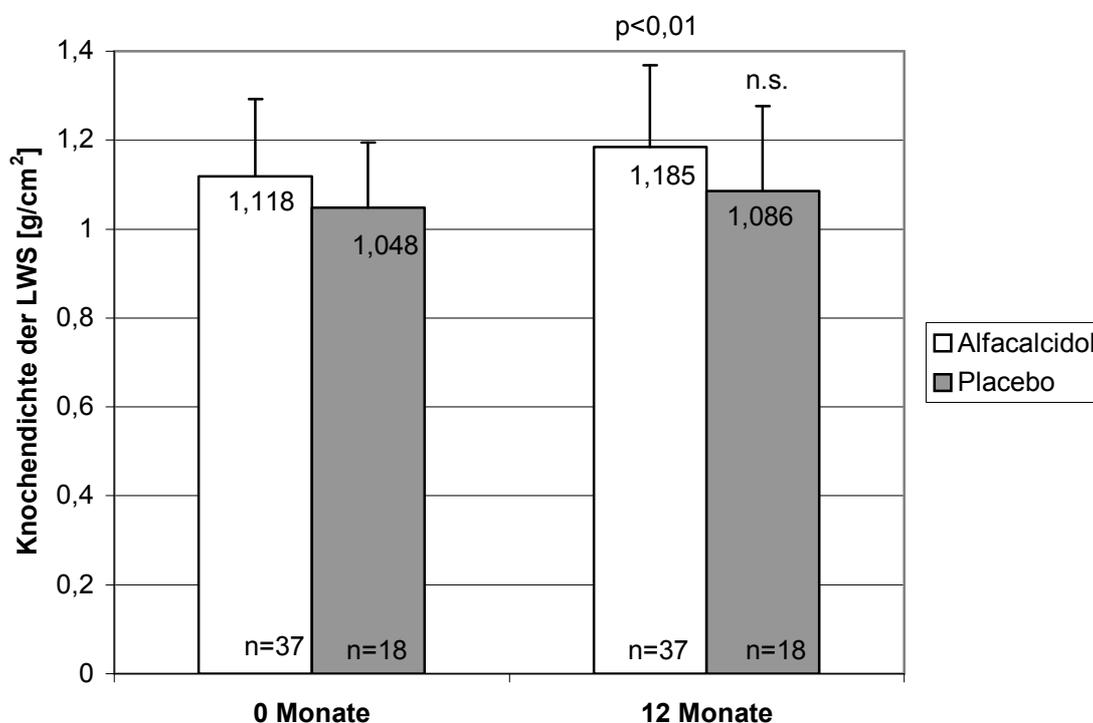


Abbildung 22: Knochendichte der LWS von Patienten unter Tacrolimus bei Studienbeginn und 12 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo

Abbildung 23 zeigt die Knochendichteänderungsrate der LWS einer Untergruppe von Patienten unterteilt in Alfacalcidol- und Placebogruppe 12 und 24 Monate nach Studieneinschluss.

Innerhalb von zwölf Monaten nahm die Knochendichte der LWS in der Alfacalcidolgruppe im Mittel statistisch signifikant um 6,3 % ( $p < 0,01$ ), in der Placebogruppe um 4,5 % (n.s.) zu. Innerhalb von 24 Monaten nahm die Knochendichte der LWS in der Alfacalcidolgruppe statistisch signifikant um 10,8 % ( $p < 0,01$ ), in der Placebogruppe um 5,8 % (n.s.) zu. Die Zunahme der Knochendichte in der Placebogruppe lag unterhalb des Signifikanzniveaus. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant. Innerhalb von zwölf Monaten nahm die Knochendichte am Femur in der Alfacalcidolgruppe im Mittel statistisch signifikant um 2,9 % ( $p < 0,05$ ), in der Placebogruppe um 7,3 % ( $p < 0,0$ ) ab. Innerhalb von 24 Monaten nahm die Knochendichte am Femur in der Alfacalcidolgruppe statistisch signifikant um

5,3 % ( $p < 0,05$ ), in der Placebogruppe um 8,0 % ( $p < 0,05$ ) ab. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant.

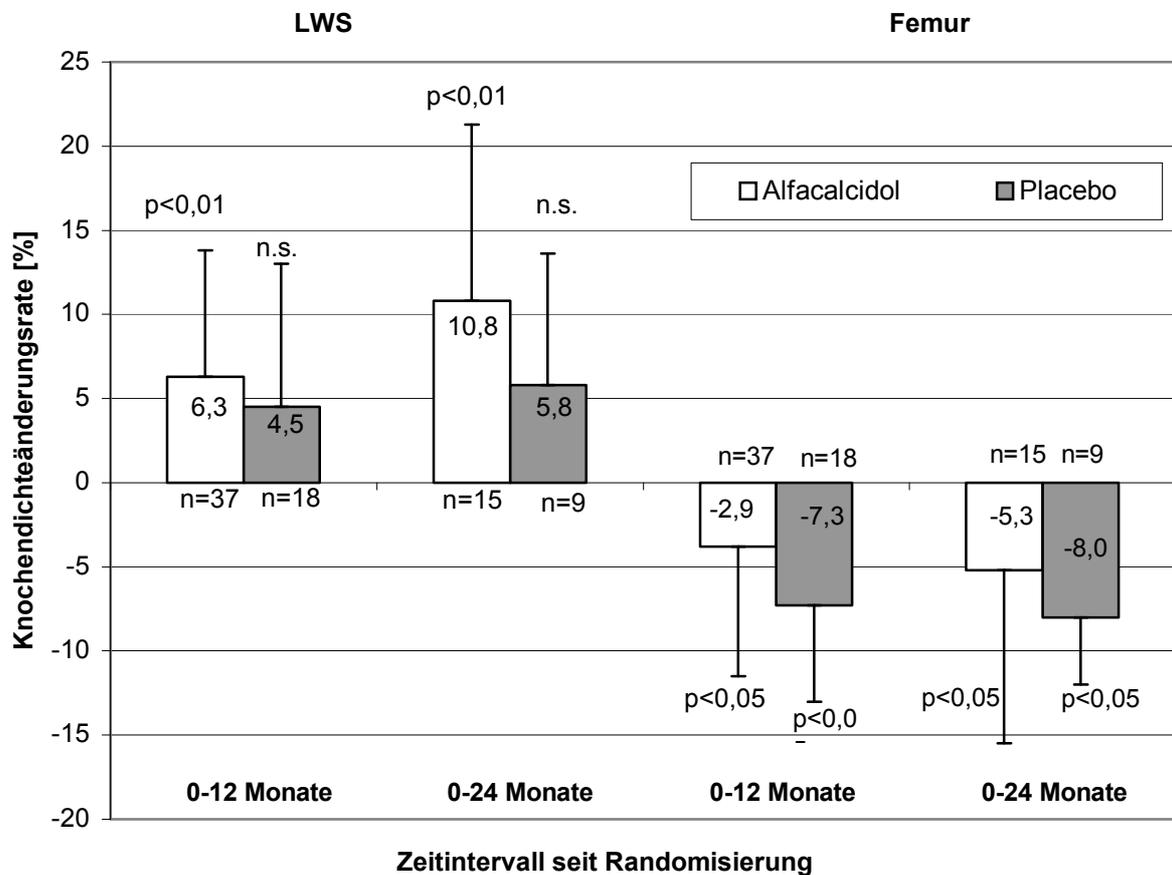


Abbildung 23: Knochendichteänderung unter Tacrolimus 12 und 24 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo

In Abbildung 24 wird die Knochendichte der LWS in  $\text{g}/\text{cm}^2$  von normogonaden und hypogonaden männlichen Patienten bei Einschluss in die Studie verglichen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant.

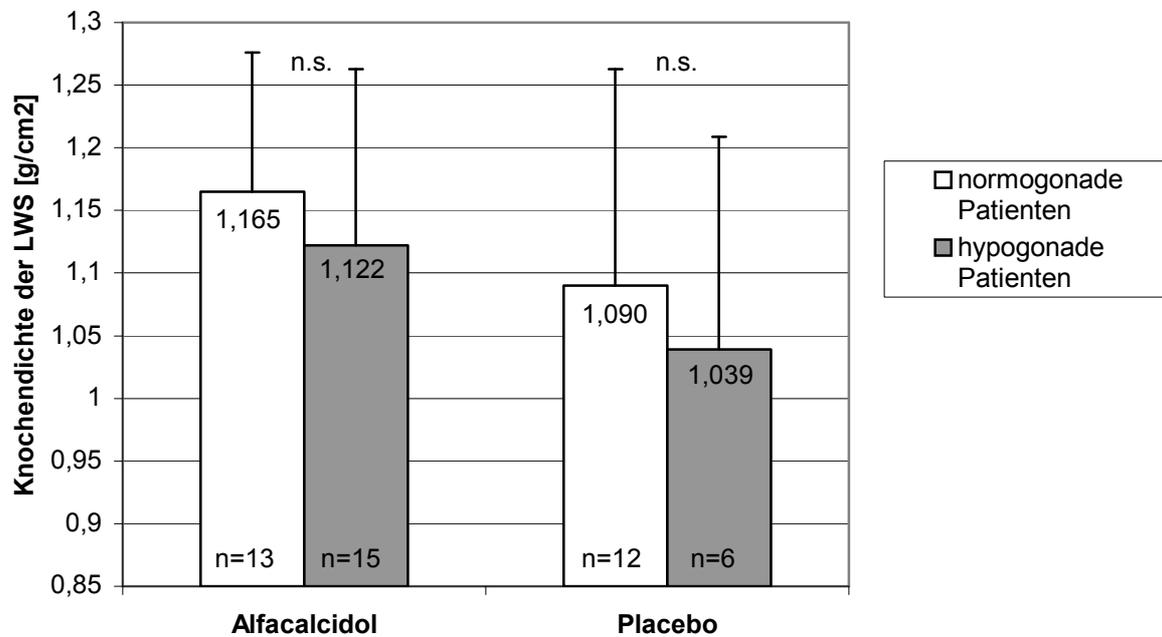


Abbildung 24: Knochendichte der LWS, normogonade vs. hypogonade Patienten unter Tacrolimus

#### 4.1.6 Radiologische Untersuchungen

Bei Studieneinschluss wiesen 5 Patienten (14 %) 8 Frakturen auf. Innerhalb von 12 Monaten erlitt ein Patient in der Placebogruppe eine neue Wirbelkörperfraktur, in der Alfalcidolgruppe trat keine neue Fraktur auf. Alle neuen Frakturen traten atraumatisch auf.

## 4.2 Cyclosporin A-basierende Immunsuppression

### 4.2.1 Patientendaten

Tabelle 8 zeigt die demographischen und klinischen Basisdaten der 20 Patienten unter einer Cyclosporin-basierenden Immunsuppression unterteilt in die Alfalcidolgruppe und die Placebogruppe. Die Behandlung mit Glukokortikoiden und Mycophenolat Mofetil erfolgte wie im Kapitel Methodik beschrieben.

Hinsichtlich der Anzahl an behandelten Abstoßungsreaktionen und damit der kumulativen Glukokortikosteroiddosis unterschieden sich beide Gruppen signifikant ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ). In der Alfalcidolgruppe lag die Anzahl der behandelten Abstoßungsreaktionen bei  $1 \pm 1$ , die kumulative Kortikosteroiddosis bei  $2,7 \text{ g} \pm 1,2 \text{ g}$ . In der Placebogruppe lag die Anzahl der behandelten Abstoßungsreaktionen bei  $3 \pm 2$ , die kumulative Glukokortikosteroiddosis bei  $7,8 \text{ g} \pm 4,6 \text{ g}$ .

Es bestanden keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Tabelle 8: Patientencharakteristika nach HTx unter Cyclosporin A unterteilt nach Alfalcidol und Placebo

	<b>Alfalcidol</b>	<b>Placebo</b>
Patientenzahl	9	14
Geschlecht (m/w)	8/1	13/1
Alter (Jahre)	$53 \pm 9$	$51 \pm 6$
Zeit nach HTx (Monate)	$3 \pm 1$	$4 \pm 3$
Indikationen für HTx (dCMP*/ iCMP**/ andere)	6/3/0	8/2/1
Anzahl hypogonade Patienten vor Randomisierung (m/w)	6/0	4/0
Anzahl der behandelten Abstoßungsreaktionen	$1 \pm 1^a$	$3 \pm 2$
Kumulative Kortikosteroiddosis (g)	$2,7 \pm 1,2^b$	$7,8 \pm 4,6$

\*dilatare Kardiomyopathie, \*\* ischämische Kardiomyopathie

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  im Vergleich zur Placebogruppe, Mann-Whitney-U-Test

<sup>b</sup>  $p < 0,01$  im Vergleich zur Placebogruppe, Mann-Whitney-U-Test

### 4.2.2 Biochemische Untersuchungen

Tabelle 9 zeigt die Basisdaten der biochemischen Untersuchungen bei Studieneinschluss. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

Bereits bei der Basisuntersuchung wiesen die Patienten beider Gruppen eine Einschränkung der Nierenfunktion mit verminderter Creatininclearance, sowie nachfolgend erhöhten Creatinin- und Harnstoff-N-Werten im Serum auf.

In beiden Gruppen korrelierten intaktes PTH negativ mit dem Zeitraum nach HTx ( $r_A = -0,06$ ;  $r_P = -0,35$ ) und positiv mit Creatinin ( $r_A = 0,82$ ;  $r_P = 0,21$ ), Harnstoff-N ( $r_A = 0,92$ ,  $r_P = 0,59$ ) und Calcium ( $r_A = 0,1$ ,  $r_P = 0,76$ ).

Tabelle 9: Basisdaten der biochemischen Untersuchungen nach HTx unter Cyclosporin A unterteilt in Alfacalcidol- und Placebogruppe

Parameter	Normwerte	Basisdaten	
		Alfacalcidol n=9	Placebo n=14
<b>Serum</b>			
Creatinin [mg/dl]	0,5 - 1,2	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3
Harnstoff-N [mg/dl]	9 - 24	26 ± 8	28 ± 9
iPTH [pg/ml]	10 - 55	63 ± 26	55 ± 33
25OH Vit. D <sub>3</sub> [nmol/l]	50 - 300	88 ± 20	106 ± 52
Eiweiß [g/dl]	6,1 - 8,2	7,1 ± 0,4	7,4 ± 0,5
Albumin [g/d]	3,5 - 5,0	4,4 ± 0,3	4,9 ± 0,3
APH [U/l]	40 - 190	96 ± 44	112 ± 58
Calcium [mmol/l]	2,1 - 2,6	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2
Phosphat [mg/dl]	2,5 - 4,8	3,4 ± 1,1	3,2 ± 0,6
Magnesium [mmol/l]	0,65 - 1,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
TSH [μU/ml]	0,4 - 4	0,7 ± 0,4	1,1 ± 2,2
FT3 [pg/dl]	2,3 - 4,2	3,0 ± 0,5	3,3 ± 0,7
FT4 [ng/dl]	0,8 - 1,8	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,5
<b>Urin</b>			
Calcium/24h [mmol]	< 10	5,8 ± 3,5	4,6 ± 1,8
Phosphat/24h [mg]	< 1000	690 ± 286	807 ± 435
Creatinin/24h [g]	0,8 - 22	11,6 ± 3,3	10,8 ± 4,6
ClCr [ml/min]	> 95	63 ± 0	50 ± 21

Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen

Tabelle 10 zeigt die wichtigsten biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels bei Einschluss und nach 12 Monaten unterteilt in die Alfacalcidol- bzw. Placebo-Gruppe. In beiden Gruppen lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

Tabelle 10: Biochemische Untersuchungen des Knochenstoffwechsels unter Cyclosporin A bei Einschluss und nach 12 Monaten unterteilt in Alfacalcidol und Placebo

Parameter	Normwerte	Basisuntersuchung		Nach 12 Monaten	
		Alfacalcidol n = 9	Placebo n = 14	Alfacalcidol n = 9	Placebo n = 14
<b>Serum</b>					
Calcium [mmol/l]	2,1 - 2,6	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Phosphat [mg/dl]	2,5 - 4,8	3,4 ± 1,1	3,2 ± 0,6	3,3 ± 1,2	3,2 ± 1,0
Creatinin [mg/dl]	0,5 - 1,2	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,6	1,8 ± 0,5
25-OH VitD <sub>3</sub> [nmol/l]	50 - 300	88 ± 20	105 ± 50	93 ± 29	122 ± 73
iPTH [pg/ml]	10 - 55	63 ± 26	55 ± 33	77 ± 92	77 ± 76
<b>Urin</b>					
Phosphat/24h [mg]	< 1000	690 ± 286	807 ± 435	786 ± 193	691 ± 264
Calcium/24h [mmol]	< 10	5,8 ± 3,5	4,6 ± 1,8	5,6 ± 4,9	3,3 ± 1,5
Creatinin/24h [g]	0,8 - 22	11,6 ± 3,3	10,8 ± 4,6	12,5 ± 5,8	19,0 ± 20,0
ClCr [ml/min]	> 95	63 ± 20	50 ± 21	64 ± 29	53 ± 33

Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen

Ebenso wie in der Tacrolimusgruppe ist auch hier in beiden Gruppen die Creatininclearance pathologisch vermindert. Infolge dessen sind die Retentionsparameter Creatinin und Harnstoff erhöht.

Die Einzelwerte von iPTH unterlagen einer hohen Intra- und Intervariabilität. Abbildung 25 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten mit normalem und mit erhöhtem iPTH bei Studieneinschluss. iPTH lag bei 65 % der Patienten (n = 15) im Normbereich, bei 35 % der Patienten (n = 8) war iPTH erhöht.

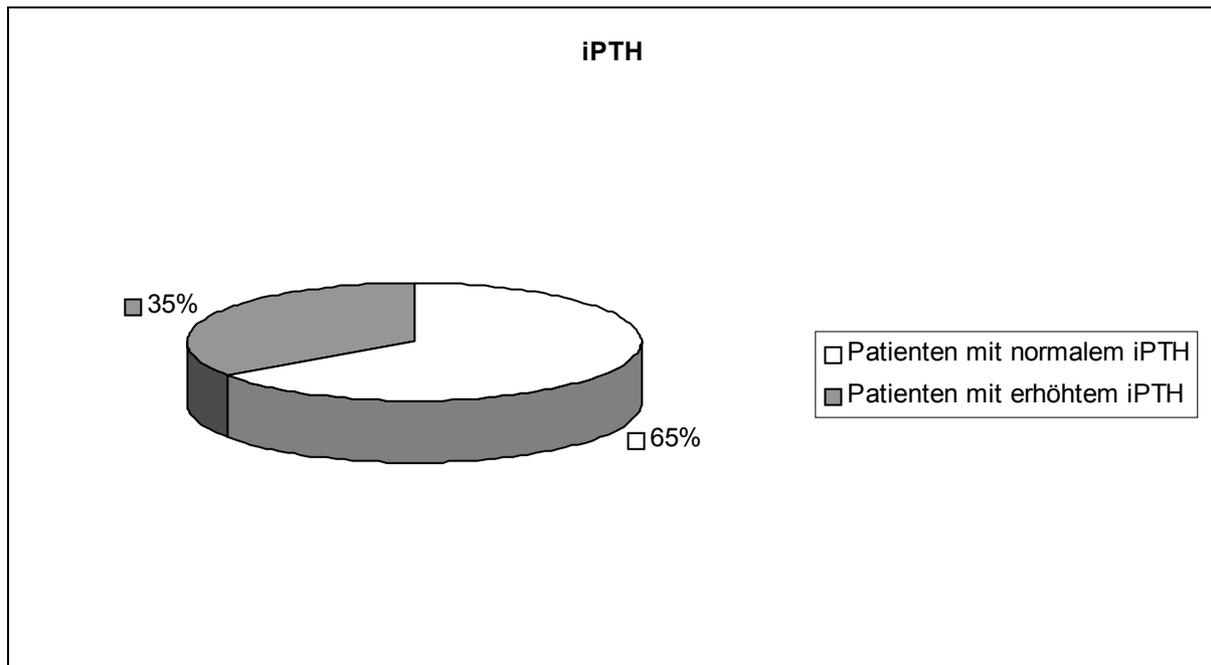


Abbildung 25: Prozentualer Anteil der Patienten unter Cyclosporin A bei Studieneinschluss mit normalem und erhöhtem iPTH

Abbildung 26 zeigt den prozentualen Anteil an Patienten mit normalen und erhöhten iPTH-Werten bei Studieneinschluss und zwölf Monate nach Behandlung unterteilt in die Alfacalcidol- und die Placebogruppe. Intaktes Parathormon war im Mittel bei Einschluss in der Alfacalcidolgruppe leicht erhöht, lag in der Placebogruppe im Normbereich, der Unterschied zwischen beiden Gruppen lag unterhalb des Signifikanzniveaus. Unter einer Behandlung mit Alfacalcidol normalisierte sich das iPTH bei 9 % der Patienten. In der Placebogruppe nahm die Gruppe der Patienten mit erhöhtem iPTH-Werten innerhalb eines Jahres um 22 % zu. In der Placebogruppe stieg iPTH im Verlauf eines Jahres statistisch signifikant an ( $p < 0,001$ ). Die Parathormonspiegel beider Gruppen unterschieden sich 12 Monate nach Studieneinschluss nicht statistisch signifikant.

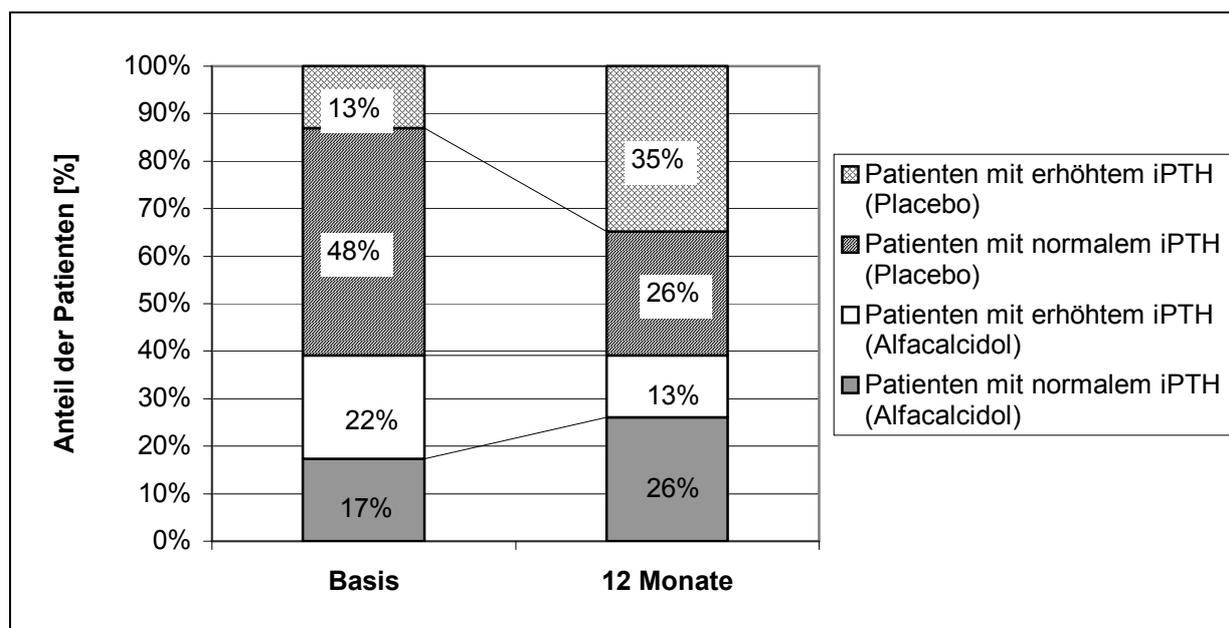


Abbildung 26: Prozentualer Anteil an Patienten unter Cyclosporin A mit normalem und erhöhtem iPTH, Basis vs. 12 Monate

25-Hydroxy-VitaminD<sub>3</sub> lag bei Einschluss bei beiden Gruppen im Normbereich. Nach zwölf Monaten war in beiden Gruppen ein leichter Anstieg zu verzeichnen (n.s.).

Unter der Therapie mit 1 µg Alfacalcidol und 500 mg Calcium täglich kam es in 2 Fällen (9 %) zu einer Hypercalciurie (Calcium im Urin > 10 mmol/24h). Bei diesen Patienten wurde erst die Calcium-Dosis auf 250 mg reduziert, musste aber aufgrund weiterhin erhöhter Werte abgesetzt werden.

Aufgrund mehrerer Fälle von Hypercalciurie und Hypercalcämie wurden die Patienten (n = 6), die ab Februar 1999 in die Studie eingeschlossen wurden und die bei der Basisuntersuchung einen normalen Calcium-Serum-Spiegel aufwiesen, nur mit 1 µg Alfacalcidol behandelt. Bei zwei (22 %) Patienten kam es auch unter dieser Therapie zu Hypercalciurie. Die Alfacalcidol-Dosis wurde reduziert auf jeden zweiten oder dritten Tag 1 µg Alfacalcidol. Nach dieser Reduzierung lagen die Calcium-Urin-Spiegel im Normbereich.

#### 4.2.3 Sexualhormonstatus

In der Alfacalcidolgruppe wiesen 6 von 9 männlichen Patienten (66 %), in der Placebogruppe 4 von 14 männlichen Patienten (28 %) einen Hypogonadismus mit erniedrigtem Gesamttestosteron und erniedrigtem Testosterofreiem Index auf. Die Gonadotropine FSH und LH lagen im Normbereich mit normalem Anstieg 30 Minuten nach intravenöser Gabe von Gonadotropin-Releasing-Hormon.

Tabelle 11 zeigt die Parameter des Sexualhormonstatus bei männlichen Patienten unterteilt in die Alfacalcidol- und die Placebogruppe

Estradiol unterschied sich in beiden Gruppen signifikant von einander ( $p < 0,01$ ).

Bei den übrigen Parametern waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Tabelle 11: Basisdaten des Sexualhormonhaushaltes männlicher Patienten unter Cyclosporin A nach Studieneinschluss unterteilt in Alfacalcidol- und Placebogruppe

Sexualhormone	Normwerte	Männliche Patienten	
		Alfacalcidol n = 9	Placebo n = 10
LH [mU/ml]	1,5 - 9,2	6,4 ± 4,0	4,9 ± 3,3
LHT *		19,2 ± 6,4	24 ± 14,4
FSH [mU/ml]	1 - 14	9,7 ± 7,2	7,1 ± 3,6
FSHT*		13,2 ± 7,3	10,7 ± 5,8
Testosteron [ng/dl]	350 - 1000	263 ± 149	487 ± 215
SHBG [nmol/l]	20 - 50	26 ± 9	34 ± 21
Testosteronfreier Index [%]	> 35	34 ± 11	53 ± 27
Estradiol [pg/ml]	15 - 45	11 ± 2 <sup>a</sup>	23 ± 7
Prolaktin		209 ± 79	243 ± 96

\*30 Minuten nach Stimulation mit 0,1 mg Gonadorelin (Relefact® LH-RH 0,1 mg)

<sup>a</sup> $p < 0,01$  im Vergleich zur Placebogruppe, Mann-Whitney-U-Test

#### 4.2.4 Untersuchung spezifischer Knochenmarker

In Tabelle 12 sind die Veränderungen der Knochenformations- und resorptionsmarker unterteilt in die Alfacalcidol und Placebogruppe dargestellt.

Alle Knochenmarker zeigten sowohl bei Einschluss als auch im Verlauf eine hohe Intra- und Intervariabilität.

Um den Effekt von Alfacalcidol auf die Knochenmarker beurteilen zu können, wurden die Delta-Werte der Knochenmarker in beiden Gruppen statistisch ausgewertet.

In der Gruppe der Knochenformationsmarker nahm die knochenspezifische alkalische Phosphatase in der Alfalcalcidolgruppe zu, in der Placebogruppe war jedoch eine Abnahme zu verzeichnen. Osteocalcin nahm im Verlauf eines Jahres in der Alfalcalcidolgruppe zu, in der Placebogruppe in den ersten drei Behandlungsmonaten ab, im Verlauf eines Jahres aber ebenfalls zu. Die Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin nahmen in beiden Gruppen im Behandlungsverlauf ab. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen, sowie die Veränderungen innerhalb einer Gruppe lag unterhalb des Signifikanzniveaus.

Tabelle 12: Spezifische Knochenmarker von Patienten unter Cyclosporin A bei Einschluss, nach 3 und 12 Monaten unterteilt in Alfalcalcidol und Placebo

Parameter	Norm- werte	Alfalcalcidol (n = 9)			Placebo (n = 14)		
		Basis	Delta 0-3 Monate	Delta 0-12 Monate	Basis	Delta 0-3 Monate	Delta 0-12 Monate
KAPH [U/l]	10 - 80	35 ± 19	2 ± 16	6 ± 20	50 ± 29	-21 ± 45	-16 ± 20
Oc [ng/dl]	4 - 12	20 ± 13	2 ± 13	14 ± 12	16 ± 11	-8 ± 7	3 ± 11
PYD [nmol/mmol Cr]	18 - 24	76 ± 14	-16 ± 24	-10 ± 28	28 ± 8	-7 ± 14	-17 ± 8
DPD [nmol/mol Cr]	4,5 - 6	22 ± 5	-5 ± 8	-2 ± 9	6 ± 1	-2 ± 2	-4 ± 1

Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

#### 4.2.5 Knochendichtemessungen

##### 4.2.5.1 Quantitative Computertomographie

Abbildung 27 zeigt die vertebrale Knochendichte (VBD) der Patienten nach Herztransplantation in der quantitativen Computertomographie im Vergleich zum Normalkollektiv. Die Knochendichte der transplantierten Patienten war signifikant erniedrigt. (VBD:  $87,8 \pm 25,5$  mg/ml vs.  $127,4 \pm 18,8$  mg/ml;  $p < 0,001$ ). Bei 83 % der Patienten war der Mineralsalzgehalt des Knochens mit Werten unter  $120 \text{ mg/cm}^3$  vermindert.

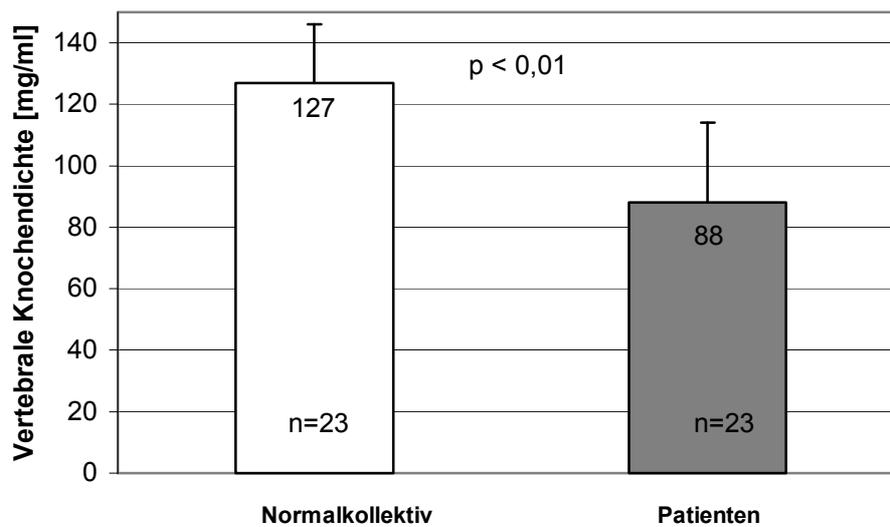


Abbildung 27: Vertebrale Knochendichte herztransplantierten Patienten unter Cyclosporin A im Vergleich zu einem Normalkollektiv

#### 4.2.5.2 Digitale Radiographie

Bei Studieneinschluss konnte in der Alfacalcidolgruppe bei 6 Patienten (60 %) eine im Vergleich zum Durchschnittswert junger Erwachsener normale Knochendichte gemessen werden. Bei 3 Patienten (30 %) musste nach den WHO-Kriterien eine Osteopenie, und bei einem Patienten (10 %) eine klinisch manifeste Osteoporose mit atraumatischen Frakturen diagnostiziert werden. Abbildung 28 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose. In der Alfacalcidolgruppe blieben nach einem Behandlungsjahr die Anteile der Patienten in den einzelnen Diagnosegruppen unverändert.

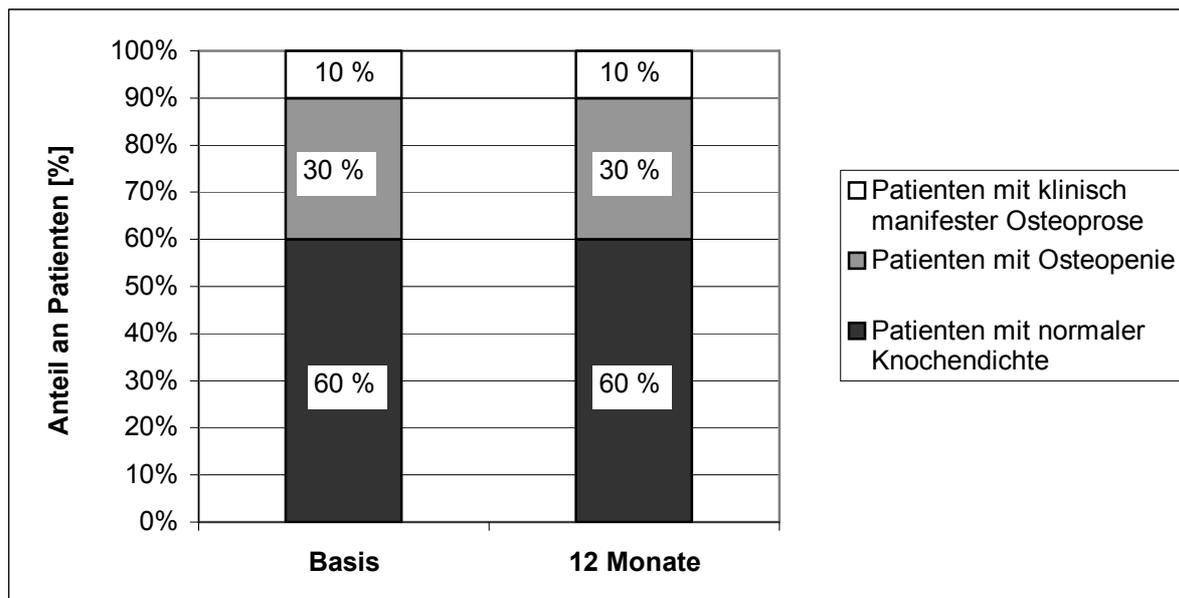


Abbildung 28: Prozentualer Anteil der Patienten unter Cyclosporin A in der Alfacalcidolgruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate

In der Placebogruppe lag bei Studieneinschluss bei 6 Patienten (43 %) die Knochendichte nach den WHO-Kriterien im Normbereich, 5 Patienten (36 %) hatten eine Osteopenie, ein Patienten (7 %) eine Osteoporose ohne Frakturen und 2 Patienten (14 %) eine klinisch manifeste Osteoporose mit Frakturen. Nach zwölf Monaten Behandlung lag in der Placebogruppe die Knochendichte nur noch bei 5 Patienten (36 %) im Normbereich, 7 Patienten (50 %) hatten eine Osteopenie und 2 Patienten (14 %) eine Osteoporose mit atraumatischen Frakturen. Abbildung 29 zeigt den prozentualen Anteil der Patienten in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose. Die Veränderungen der Knochendichte innerhalb eines Behandlungsjahres im Vergleich zum Durchschnitt junger Erwachsener war statistisch nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen der Alfacalcidolgruppe und der Placebogruppe lagen sowohl bei Einschluss, als auch nach zwölf Monaten unterhalb des Signifikanzniveaus.

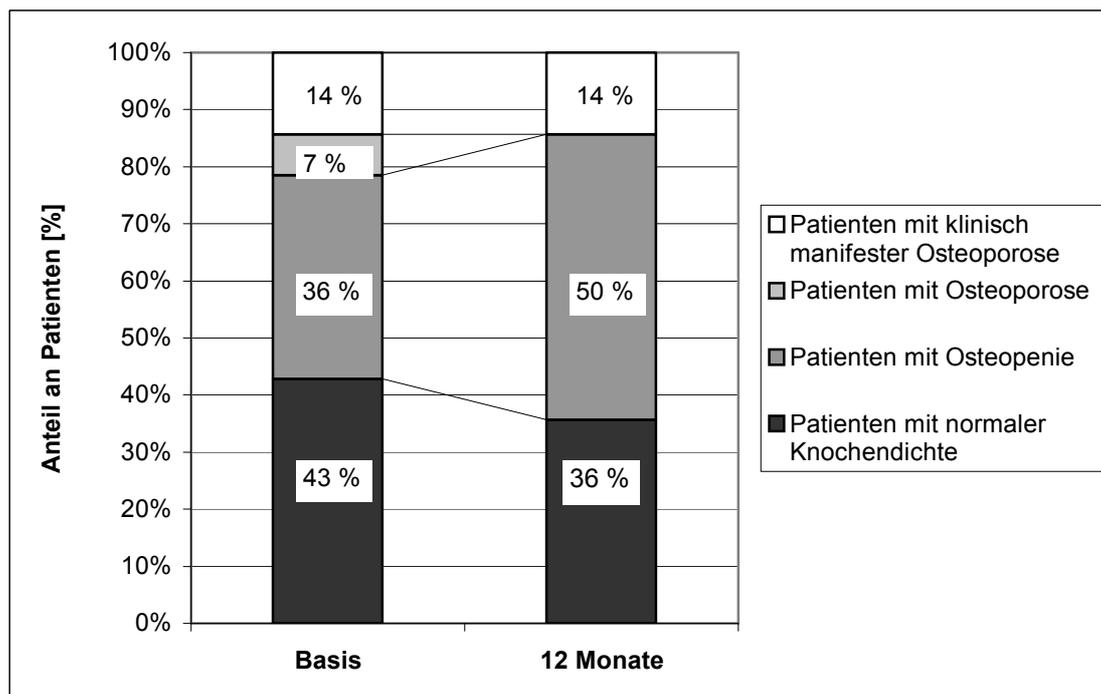


Abbildung 29: Prozentualer Anteil der Patienten unter Cyclosporin A in der Placebogruppe mit normaler Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose und klinisch manifester Osteoporose, Basis vs. 12 Monate

Abbildung 30 zeigt die Knochendichteänderungsrate an der LWS 12 Monate nach Einschluss. Betrachtet wird die Alfacalcidolgruppe im Vergleich zur Placebogruppe. In der Alfacalcidolgruppe nahm die Knochendichte innerhalb eines Jahres um  $0,013 \text{ g/cm}^2$  (0,7 %), in der Placebogruppe um  $0,010 \text{ g/cm}^2$  (1,0 %) ab. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 31 zeigt die Knochendichteänderungsrate der LWS einer Untergruppe von Patienten 12 und 24 Monate nach Studieneinschluss. Betrachtet werden die Placebogruppe im Vergleich zur Alfacalcidolgruppe. Innerhalb von 12 Monaten nahm die Knochendichte der LWS in der Alfacalcidolgruppe um 0,7 %, in der Placebogruppe um 1 % ab. Innerhalb von 24 Monaten nahm die Knochendichte der LWS in der Alfacalcidolgruppe um 1,6 %, in der Placebogruppe um 2,4 % zu. Diese Veränderungen lagen unterhalb des Signifikanzniveaus. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

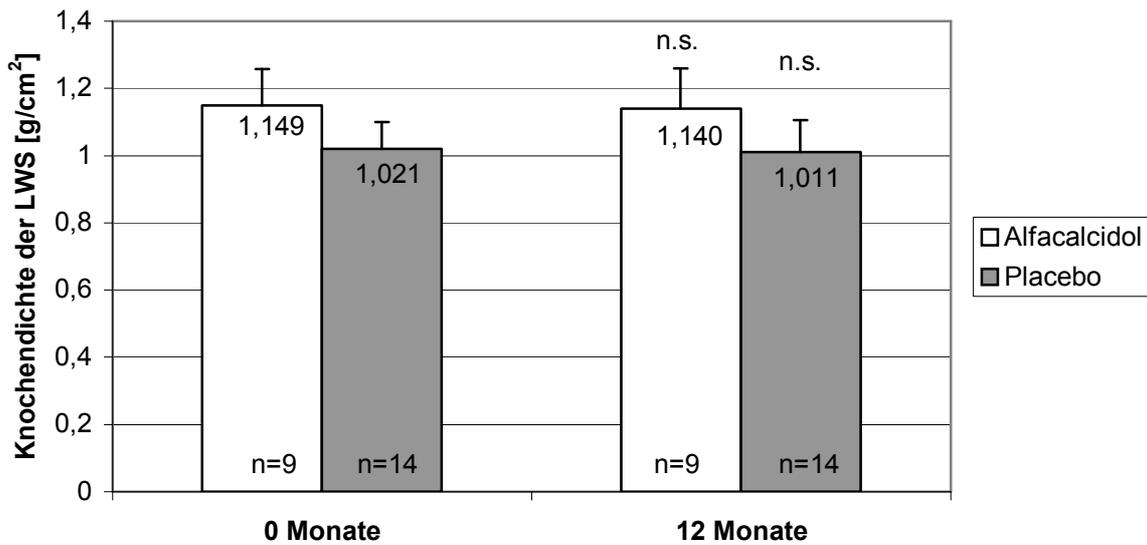


Abbildung 30: Knochendichte der LWS von Patienten unter Cyclosporin A bei Studienbeginn und 12 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo

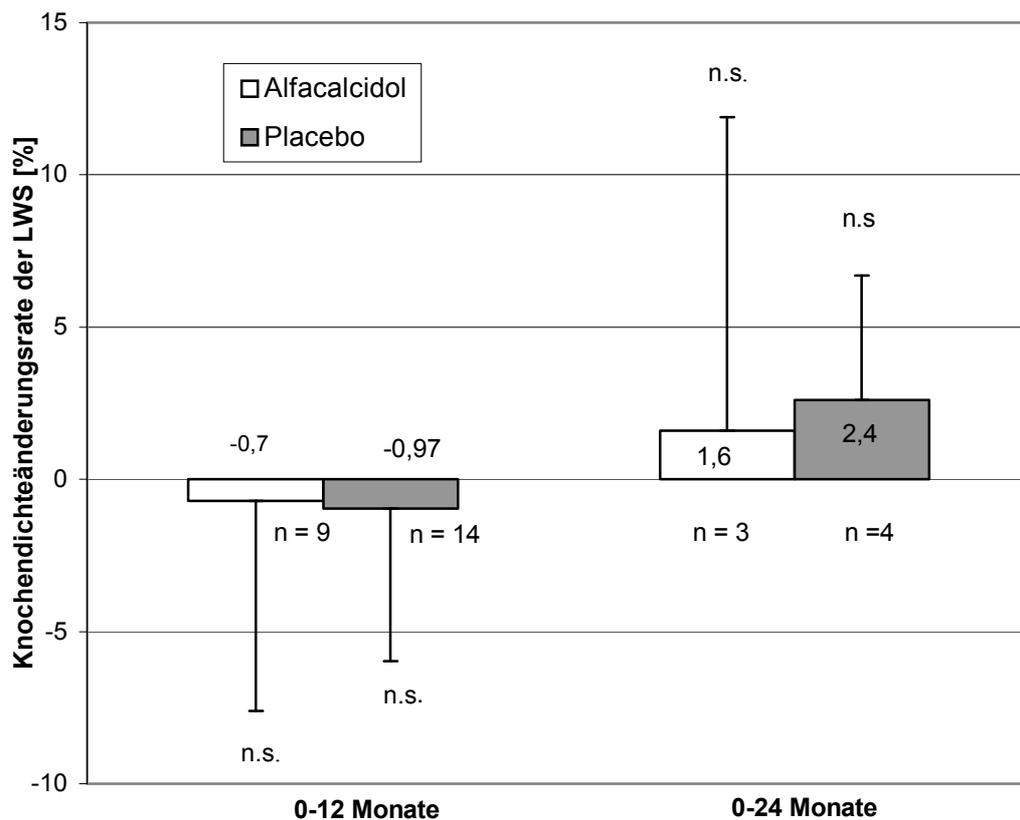


Abbildung 31: Knochendichteänderung unter Cyclosporin A 12 und 24 Monate nach Einschluss, Vergleich Alfacalcidol vs. Placebo

In Abbildung 32 wird die Knochendichte der LWS in  $\text{g}/\text{cm}^2$  von normogonaden und hypogonaden männlichen Patienten bei Einschluss in die Studie verglichen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant.

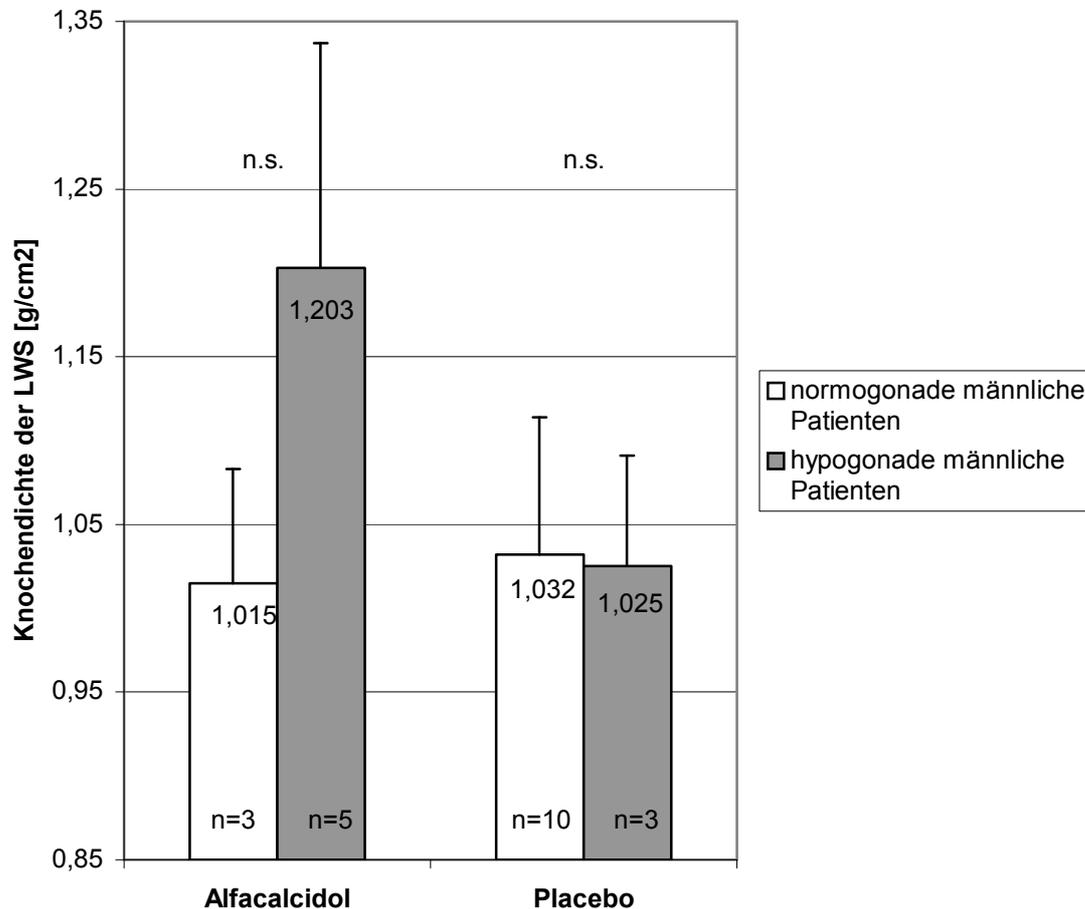


Abbildung 32: Knochendichte der LWS, normogonade vs. hypogonade Patienten unter Cyclosporin A unterteilt in die Alfacalcidol-und Placebogruppe

#### 4.2.6 Radiologische Untersuchungen

Bei Studieneinschluss erlitten 3 Patienten (15 %) 12 Frakturen. Innerhalb von 12 Monaten traten in beiden Gruppen keine neuen Frakturen auf.

## 5 Diskussion

### 5.1 Biochemische Untersuchungen des Knochenstoffwechsels

#### 5.1.1 Parathormon

In der vorliegenden Arbeit war der Parathormonspiegel bereits bei Studieneinschluss bei 41% der Patienten erhöht.

In den aktuellen Studien sind die Ergebnisse im Hinblick auf den Parathormonspiegel sehr unterschiedlich:

Guo et al. [37] stellten in ihrer Studie bei 36 von 40 Patienten erhöhte iPTH Spiegel fest. Lee et al. [58] fanden bei Transplantationspatienten zwar gegenüber der Norm leicht erhöhte Werte, die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren aber nicht statistisch signifikant. Andere Arbeitsgruppen wie Sambrook et al. [99] und Shane et al. [114] berichten von normalen Parathormonspiegeln nach Herztransplantation.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch Abweichungen in der Dosierung der Immunsuppressiva und unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte nach Herztransplantation verursacht sein.

Zur Erhöhung der Parathormonwerte und Entstehung eines sekundären Hyperparathyreoidismus tragen mehrere Faktoren bei.

Zum einen spielt die mit zunehmendem Abstand zur Herztransplantation höhere kumulative Steroiddosis eine entscheidende Rolle. Glukokortikoide verursachen eine verminderte gastrointestinale Calciumabsorption und eine vermehrte Ausscheidung von Calcium im Urin. Dies führt zu einem Ungleichgewicht im Calciumhaushalt und damit zu einer Erhöhung des Parathormons. [43, 61]

Zum anderen beeinflussen Glukokortikoide die Empfindlichkeit der Osteoblasten für iPTH durch vermehrte Expression von iPTH-Rezeptoren auf den Osteoblasten. McSheehy et al. [67] konnten in diesem Zusammenhang in ihrer Studie aufzeigen, dass die knochenresorbierende Wirkung von PTH nur in Gegenwart von Osteoblasten zu induzieren ist.

Außerdem führt eine zunehmende Niereninsuffizienz unter einer Behandlung mit Cyclosporin A bzw. Tacrolimus zu Veränderungen im Parathormon-Vitamin D-Haushalt. Reichel et al. [87] beschreiben bereits die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus in einer frühen Phase der Niereninsuffizienz mit einer Creati-

ninclearance von 60-80 ml/min. Unter einer Behandlung mit Cyclosporin A bzw. Tacrolimus kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Phosphaten in Tubulosepithelzellen, die zu einer Hemmung der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase führt und damit eine verminderte Calcitriol-Biosynthese verursacht. Außerdem kommt es zu einer verminderten Phosphatreabsorption und Tendenz zur Hypophosphatämie. Es wird auch eine Aktivitätshemmung der  $1\alpha$ -Hydroxylase durch urhämische Toxine diskutiert. [46]

Stempfle et al. [125] zeigten in einer Untersuchung zum Knochenstoffwechsel nach orthotoper Herztransplantation eine grenzwertig erhöhte Phosphatausscheidung im Urin bei normalen Serumcalcium und Serumphosphat. Serum-PTH korrelierte positiv mit Creatinin, Harnstoff und der Glukokortikoiddosis und negativ mit der Creatininclearance.

Vergleichbare Ergebnisse erzielten Guo et al. [37], die ebenfalls von einer Korrelation zwischen erhöhten iPTH-Werten und der verschlechterten Nierenfunktion nach Herztransplantation berichteten.

Im Gegensatz dazu fanden Shane und Mitarbeiter [116] in ihrer Studie in einer frühen Phase nach Transplantation normale iPTH-Werte trotz eingeschränkter Creatininclearance.

Nach einem Behandlungsjahr konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in der Tacrolimusgruppe durch die zusätzliche Gabe von Alfacalcidol im Gegensatz zur Placebogruppe eine signifikante Abnahme von Parathormon erzielt werden konnte. In der Cyclosporingruppe konnte im Mittel eine Zunahme von iPTH im Verlauf durch die Gabe von Alfacalcidol nicht verhindert werden. Trotz einer niedrigeren Anzahl von Abstoßungsreaktionen und somit signifikant niedrigerer kumulativer Glukokortikoiddosis bei Einschluss, waren die iPTH-Werte in der Alfacalcidolgruppe bereits bei Einschluss höher als in der Placebogruppe. Dieses Ergebnis resultiert aus einer hohen Intra- und Intervariabilität der Parathormonwerte bei kleiner Fallzahl, so dass es bereits bei im Einzelfall erhöhten Werten zu einer Verschiebung des Gesamtergebnisses kommt. Dennoch konnte auch hier in der Einzelanalyse gezeigt werden, dass im Verlauf eines Jahres in der Alfacalcidolgruppe der Anteil der Patienten mit erhöhtem iPTH abnahm, in der Placebogruppe jedoch zunahm.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Francis et al. [27, 28] in ihrer Studie, in der sie aufzeigten, dass die Gabe von 0,25  $\mu$ g Alfacalcidol zweimal am Tag bei diagnostizierter

postmenopausaler Osteoporose die Calciumabsorption steigert und Serum-PTH dadurch senkt.

Stempfle et al. [127] zeigten in ihrer Studie, in die 132 Patienten mit einer auf Cyclosporin A basierenden immunsuppressiven Therapie,  $35 \pm 25$  Monate nach Herztransplantation eingeschlossen wurden, dass bei den Patienten bereits bei Studieneinschluss ein sekundärer Hyperparathyreoidismus vorlag. Ein Jahr nach Behandlung normalisierten sich in dieser Studie die iPTH-Werte sowohl in der Calcitriol als auch in der Placebogruppe.

In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe [128] wurden 53 Patienten  $6 \pm 8$  Monate nach Transplantation in die Studie eingeschlossen. Bei Einschluss wurden nur in der Calcitriolgruppe erhöhte iPTH-Werte im Sinne eines sekundären Hyperparathyreoidismus festgestellt. Nach einem Jahr Behandlung waren die Werte in beiden Gruppen annähernd gleich, blieben insgesamt aber leicht erhöht. Nach weiteren zwölf Monaten Behandlung stieg iPTH in der Placebogruppe weiter an, in der Calcitriolgruppe blieb es unverändert. Durch die Gabe von Calcitriol konnte eine zunehmende Hypersekretion von PTH verhindert werden.

Somit scheint die Behandlung mit Alfacalcidol nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie aufgrund von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Vorteilen einer Behandlung mit Calcitriol, insbesondere durch die duale Aktivierung von Alfacalcidol zu Calcitriol in Leber und Knochen, in der Behandlung der Posttransplantationsosteoporose im Hinblick auf eine Normalisierung des Parathormonspiegels überlegen zu sein.

### 5.1.2 Sexualhormonstatus

41 % der Männer in der FK 506-Gruppe und 32 % in der CyA-Gruppe wiesen unter Immunsuppression einen Hypogonadismus mit erniedrigtem Gesamttestosteron und freiem Testosteronindex auf.

Es bestand hinsichtlich der Knochendichte kein signifikanter Unterschied zwischen normogonaden und hypogonaden Patienten.

Stief et al. [129] stellten in ihrer Studie bei 24 % der transplantierten Patienten einen Hypogonadismus fest. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie war hier auch die Knochendichte in der Gruppe der hypogonaden Patienten im Vergleich zu den normogonaden Patienten signifikant vermindert.

Ursächlich für diese Diskrepanz ist die frühzeitigere Untersuchung des Sexualhormonhaushaltes nach Herztransplantation sowie eine sofortige Hormonsubstitution bei diagnostiziertem hypogonaden Hypogonadismus in der vorliegenden Studie ( $27 \pm 28$  vs.  $4 \pm 3$  Monate nach HTx).

Guo und Mitarbeiter [37] beobachteten ebenfalls erniedrigte Testosteronwerte ohne Korrelation zu Knochendichte oder Knochenmarkern. Im Gegensatz dazu fanden Sambrook und Mitarbeiter [101] bei Patienten mit nachgewiesenem Hypogonadismus häufig eine verminderte Knochenmasse.

Shane und Mitarbeiter [117] berichteten in ihrer Studie ebenfalls von erniedrigten Testosteronwerten direkt nach Herztransplantation, die sich innerhalb der ersten 6 Monate ohne Substitution allmählich wieder Normwerten annähern.

Der hohe Prozentsatz hypogonader Männer ist vergleichbar mit weiteren klinischen Daten. Rivas und Mitarbeiter [96] stellten bei 22 % der männlichen Herztransplantationspatienten einen Hypogonadismus fest. Dabei zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen Testosteron und den Cyclosporinspiegeln. Muchmore und Mitarbeiter [71] nahmen in ihrer Studie aufgrund erniedrigter Gesamttestosteronwerte bei 52 % der männlichen Patienten nach Herztransplantation eine Hormonsubstitution vor.

Stempfle et al. [127] stellten in einer Studie mit Patienten unter Cyclosporin basierender Immunsuppression bei 20 % der männlichen Patienten nach Herztransplantation einen Hypogonadismus fest, in einer weiteren Studie [125] bei 60 % der männlichen Patienten unter Tacrolimus basierender Immunsuppression.

Auf die Wirkung von Glukokortikoiden, Cyclosporin A und Tacrolimus auf den Sexualhormonhaushalt wurde bereits im Abschnitt 2 eingegangen.

### 5.1.3 Untersuchung spezifischer Knochenmarker

Um den Effekt einer zusätzlichen Gabe von Alfacalcidol beurteilen zu können, wurde der dynamische Umbauprozess des Knochens durch die Bestimmung von spezifischen Knochenmarkern untersucht.

Bestimmt wurden die Knochenformationsmarker, knochenspezifische alkalische Phosphatase und Osteocalcin, sowie die Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin. In der Patientengruppe mit einer auf Tacrolimus basierenden Immunsuppression kam es zu einer signifikanten Abnahme der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin innerhalb eines Jahres, sowie im Vergleich zur Placebogruppe. Bei den Knochenformationsmarkern war kein signifikanter Unter-

schied zwischen den Gruppen zu verzeichnen. In der Patientengruppe mit einer auf Cyclosporin A basierenden Immunsuppression konnte sowohl bei den Knochenformations- als auch bei den Knochenresorptionsmarkern zwischen beiden Behandlungsgruppen auf Grund der zu geringen Fallzahl und der daraus resultierenden hohen Intra- und Intervariabilität kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu konnten Shirashi et al. [120] in ihrer tierexperimentellen Studie aufzeigen, dass Alfacalcidol bei Ratten, die nach Ovariectomie einen „high-turnover“-Knochenstoffwechsel aufweisen, nicht nur die Knochenresorption durch Hemmung der Osteoklasten vermindert, sondern auch die Knochenformation durch Stimulation der Osteoblasten, gemessen an einer Osteocalcinerhöhung, fördert und somit ein Gleichgewicht im Knochenstoffwechsel herstellt.

Sambrook und Mitarbeiter [99] fanden in ihrer Studie in den ersten sechs Monaten nach Transplantation supprimierte Osteocalcinwerte und führten das Ergebnis auf die hochdosierte Steroidtherapie zurück. In Nachuntersuchungen normalisierten sich die Werte ohne Osteoporosetherapie und stiegen teilweise im Verlauf kontinuierlich an.

Die Arbeitsgruppe um Shane [116] erzielte in ihrer Studie vergleichbare Ergebnisse zur vorliegenden Studie. Innerhalb der ersten sechs Monate nach Herztransplantation zeigte sich sowohl eine signifikante Osteocalcinerhöhung, als auch eine signifikante Erhöhung der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Hydroxyprolin. Unter einer Medikation mit 1 g Calcium und 400 IU Vitamin D kam es im weiteren Verlauf zu einer Normalisierung aller Knochenmarker. Die Arbeitsgruppe führte dies vor allem auf die in den ersten sechs Monaten nach Herztransplantation erhöhte Steroiddosis, sowie auf die niedrigen Testosteron und Vitamin D-Spiegel der Patienten in der frühpostoperativen Phase zurück.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den antiresorptiven Effekt von Alfacalcidol, der bereits von Dambacher et al. beschrieben wurde.[13]

## **5.2 Knochendichtemessungen**

### **5.2.1 Quantitative Computertomographie**

In der vorliegenden Studie war der Mineralsalzgehalt des Knochens in der quantitativen Computertomographie bei Studieneinschluss in der Tacrolimusgruppe bei 76 % der Patienten, in der Cyclosporingruppe bei 83 % der Patienten mit Werten unter  $120 \text{ mg/cm}^3$  im Vergleich zum Normalkollektiv statistisch signifikant vermindert.

Shane und Mitarbeiter [114] sowie Meys et al. [68] berichten in ihren Studien von vergleichbaren Ergebnissen in der quantitativen Computertomographie.

### 5.2.2 Digitale Radiographie

Es gibt nur wenige Studien, die den Knochenmasseverlust nach Herztransplantation ohne Calcium- und Hormonsubstitution untersucht haben.

In der Studie von Sambrook et al. kam es nach Transplantation im Mittel zu einem Knochenmasseverlust der LWS von  $7,4 \% \pm 4,5 \%$  innerhalb von 12 Monaten nach Transplantation [99].

Bei Einschluss in die vorgelegte Studie wurde mittels digitaler Radiographie in der Tacrolimusgruppe bei 19 % der Patienten eine Osteopenie und bei 24 % der Patienten eine Osteoporose diagnostiziert. Unter einer Behandlung mit Alfacalcidol kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Patienten mit einer Osteopenie um 6 %, sowie einer statistisch signifikanten Abnahme der Patienten mit Osteoporose um 5 %. In der Placebogruppe dagegen nahm der Anteil der Patienten mit einer Osteopenie statistisch signifikant um 6 % zu, der Anteil der Patienten mit einer Osteoporose blieb unverändert. In der Gruppe der mit Cyclosporin behandelten Patienten wurde bei Einschluss bei 35 % der Patienten eine Osteopenie und bei 17 % der Patienten eine Osteoporose diagnostiziert. Unter einer Behandlung mit Alfacalcidol kam zu keinen Veränderungen, in der Placebogruppe nahmen die Patienten mit einer Osteopenie um 14 % zu, die Patienten mit einer Osteoporose um 8 % ab. Diese Veränderungen lagen unterhalb des Signifikanzniveaus. Die Diskrepanz zwischen der Tacrolimus und der CyclosporinGruppe liegt vermutlich an der kleinen Fallzahl in der CyclosporinGruppe ( $n = 9$ ) mit hoher Intra- und Intervariabilität der Einzelwerte. Wertet man die Ergebnisse der digitalen Radiographie unabhängig von der immunsuppressiven Behandlung aus, wurde bei Studieneinschluss bei 27 % der Patienten eine Osteopenie und bei 22 % der Patienten eine Osteoporose diagnostiziert. Unter einer Behandlung mit Alfacalcidol kam es zu einer Abnahme der Patienten mit Osteopenie um 5 %, sowie zu einer Abnahme der Patienten mit Osteoporose um 13 %. In der Placebogruppe nahmen die Patienten mit einer Osteopenie um 11 % zu, die Patienten mit einer Osteoporose um 6 % ab.

Die zusätzliche Behandlung mit Alfacalcidol bewirkte nach 24 Monaten in der Gruppe der mit Tacrolimus behandelten Patienten eine statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte um 11 %, in der Placebogruppe dagegen war nur eine Zunahme um

6 % zu verzeichnen. Diese Zunahme war statistisch nicht signifikant. Auch der Unterschied zwischen beiden Gruppen lag unterhalb des Signifikanzniveaus. In der Gruppe der mit Cyclosporin behandelten Patienten war weder in der Alfacalcidolgruppe noch in der Placebogruppe eine signifikante Zunahme zu verzeichnen. Die Knochendichte am Femur nahm innerhalb von 24 Monaten Behandlung in der Alfacalcidolgruppe in der Gruppe der mit Tacrolimus behandelten Patienten statistisch signifikant um 5 %, in der Placebogruppe um 8 % ab. Aufgrund zu geringer Fallzahlen bei der Verlaufskontrolle der Knochendichtemessung am Femur konnte in der Cyclosporin-Gruppe keine Analyse erfolgen.

Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnten Stempfle et al. [127] in ihrer Placebo-kontrollierten Studie zur Osteoporoseprophylaxe nach Herztransplantation bei Patienten mit auf Cyclosporin-basierender Immunsuppression keinen statistisch signifikanten Effekt einer zusätzlichen Behandlung mit Calcitriol im Hinblick auf die Knochendichte nachweisen. Ursächlich für die Diskrepanz in den Studienergebnissen ist vermutlich der unterschiedliche Abstand nach Herztransplantation bis zum Einschluss in die Studie ( $35 \pm 25$  Monate vs.  $5 \pm 3$  Monate). In einer weiteren Studie zur Osteoporoseprophylaxe nach Herztransplantation bei Patienten mit auf Tacrolimus-basierender Immunsuppression früh postoperativ ( $6 \pm 8$  Monate) derselben Arbeitsgruppe [128] wurden ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit erzielt. Stempfle et al. konnten eine statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte der LWS in der Calcitriolgruppe von 14 % (delta T-score) nach 24 Monaten Behandlung, in der Placebogruppe eine Zunahme von 6 % nachweisen. Ebenso zeigten Reginster et al. in einer großen, prospektiven Multicenterstudie, in der der Effekt von Alfacalcidol versus Placebo im Hinblick auf die Glukokortikoid-induzierten Osteoporose untersucht wurde, eine im Vergleich zur Placebogruppe statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte der LWS [85]. Auch die Arbeitsgruppe um Dequeker konnte in ihrer Studie einen positiven Effekt von Alfacalcidol auf den trabekulären Knochen im Vergleich zur Monotherapie mit Calcium nachweisen [16]. Shane et al. [117] erzielten in ihrer Studie ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte unter einer Therapie mit Calcitriol. Im Vergleich zu Calcitriol wurden unter einer Behandlung mit Alendronate an der LWS vergleichbare Ergebnisse erzielt, am Femur konnte jedoch eine statistisch signifikant stärkere Zunahme der Knochendichte nachgewiesen werden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist zu diskutieren, ob eine Kombinationsbehandlung mit Alfacalcidol und A-

lendronate in der Behandlung der Posttransplantationsosteoporose erfolgversprechend ist.

Zusammenfassend zeigt die gegenwärtige Studienlage, dass der Knochenmasseverlust nach Transplantation in den ersten 6 Monaten ohne Behandlung am gravierendsten ist. Im postoperativen Verlauf wird nach Ablauf der ersten 6 Monate die immunsuppressive Medikation sukzessive reduziert, was nachfolgend zu geringeren Nebenwirkungen auf den Knochenmineralhaushalt führt. Auch Abstoßungsreaktionen, die eine vorübergehende Erhöhung der immunsuppressiven Medikation sowie eine Bolusgabe von Glukokortikoiden notwendig machen, nehmen nach Ablauf des ersten halben Jahres nach Transplantation ab. [23, 99, 116, 126]

Somit sollte eine Osteoporoseprophylaxe zum schnellstmöglichen Zeitpunkt nach Herztransplantation begonnen werden, um eine massive Schädigung des Knochens zu verhindern.

### 5.2.3 Radiologische Untersuchungen

Bei Studieneinschluss wies die Patientengruppe mit einer Tacrolimus basierenden Immunsuppression eine Frakturrate von 14 % auf, die Patientengruppe mit einer Cyclosporin basierenden Immunsuppression eine Frakturrate von 15 %.

Im Vergleich dazu werden in anderen Studien Frakturaten nach Transplantation von 7 % bis 44 % angegeben. [58,99]

Diese sehr unterschiedlichen und teilweise deutlich höheren Frakturaten sind durch kleine Fallzahlen (16-31 Patienten) und heterogene Studienkollektive bedingt, die die Vergleichbarkeit erschweren. Der Zeitpunkt des Studieneinschlusses schwankt in den verschiedenen Untersuchungen zwischen einem und 55 Monaten nach HTx. Außerdem ist die Zusammensetzung der Studienpopulation sehr unterschiedlich. Lee et al. [58] untersuchten nur männliche Patienten, während Sambrook et al. [99] sowohl weibliche Patienten, als auch männlich Patienten in ihre Studien einschlossen.

Im Verlauf der vorliegenden Therapiestudie war die Frakturrate gering. In den Alfacalcidolgruppen traten nach Studieneinschluss keine neuen Frakturen auf. In der Placebogruppe unter Tacrolimus basierender Immunsuppression erlitt ein Patient innerhalb von 12 Monaten eine atraumatische Fraktur, das entspricht einer Frakturrate von 5,5 %. In der Placebogruppe unter Cyclosporin basierender Immunsuppression kam es zu keiner neuen Fraktur nach Studienbeginn.

Im Vergleich zur vorliegenden Studie deutlich höhere Frakturrate zeigte eine longitudinale Studie von Shane und Mitarbeitern [116] nach Herztransplantation unter einer Basissubstitution mit 1 g Calcium und 400 IU Vitamin D sowie antiresorptiver Therapie mit Bisphosphonaten bei nachgewiesener Osteoporose. 36 % der 47 untersuchten Patienten erlitten eine oder mehrere atraumatische Frakturen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation. Im zweiten und dritten postoperativen Jahr lag die Frakturrate bei 6 % bzw. 3 %.

Die Ursache für die hohe Frakturrate in der Frühphase nach Transplantation in der Studie von Shane und Mitarbeitern war zum einen die im Vergleich zur vorliegenden Studie um 30 % höhere mittlere Cyclosporin A-Dosis, zum anderen wurde in der vorliegenden Studie im Gegensatz zur Studie von Shane et al. der Sexualhormonstatus der Patienten bei Studieneinschluss untersucht und bei Vorliegen eines Hypogonadismus eine Hormonsubstitution durchgeführt.

Van Cleemput et al. [134] berichteten in ihrer Studie, in der die Patienten nach Transplantation mit 1,25 g Calciumkarbonat und 0,25 µg bis 1 µg Alfacalcidol behandelt wurden, von einer jährlichen Frakturrate von 9 %.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 78 Patienten nach orthotoper Herztransplantation die Wirkung der immunsuppressiven Medikation auf den Knochenstoffwechsel und den Sexualhormonhaushalt untersucht. Insbesondere wurde der Effekt einer Behandlung mit Alfacalcidol gegenüber einer Placebogabe zusätzlich zur Basistherapie mit Calcium und Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus im Hinblick auf Zunahme der Knochendichte, Parameter des Knochenmetabolismus und neu aufgetretenen Frakturen in der Osteoporoseprophylaxe und -therapie aufgezeigt. Bei Studieneinschluss wurde mittels digitaler Radiographie bei 27 % der Patienten eine Osteopenie, bei 12 % der Patienten eine Osteoporose und bei 10 % der Patienten eine klinisch manifeste Osteoporose mit atraumatischen Frakturen nach den Kriterien der WHO diagnostiziert. Die erniedrigte Knochenmasse führte bei 10 % der Patienten zu Frakturen.

Eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer Posttransplantationsosteoporose ist die Störung der Calciumhomöostase durch die Einnahme von Glukokortikoiden, in Folge derer es zu einer Parathormonerhöhung und damit zu einer verstärkten Calciummobilisation aus dem Knochen kommt. Bei 41 % der Patienten konnte bereits bei Einschluss in die Studie ein erhöhter Parathormonspiegel nachgewiesen werden. Die im Vergleich zu anderen Studien geringe Anzahl an Patienten mit erhöhtem iPTH ist zum einen auf die frühzeitige Osteoporoseprophylaxe nach Herztransplantation und zum anderen auf die geringe Fallzahl zurückzuführen.

Ein weiterer Effekt der Glukokortikoideinnahme ist eine verminderte Sekretion von Gonadotropinen sowie eine Suppression von ACTH und damit ein Sexualhormonmangel. Zu Studienbeginn wurde bei 33 % der männlichen Patienten ein Hypogonadismus festgestellt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Knochendichte zwischen hypogonaden und normogonaden Patienten festgestellt werden. Ursächlich hierfür ist die frühzeitige Untersuchung des Sexualhormonhaushaltes nach Herztransplantation sowie eine sofortige Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus.

Um den Effekt einer zusätzlichen Gabe von Alfacalcidol beurteilen zu können, wurde sowohl der dynamische Umbauprozess des Knochens durch die Bestimmung von spezifischen Knochenmarkern, als auch die statische Knochenmasse durch quantitative digitale Radiographie der Lendenwirbelsäule untersucht.

Der dynamische Knochenstoffwechsel wurde mittels Bestimmung der Knochenformationsmarker, knochenspezifische alkalische Phosphatase und Osteocalcin, sowie der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin analysiert. In der Patientengruppe mit einer auf Tacrolimus basierenden Immunsuppression kam es zu einer signifikanten Abnahme der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin innerhalb eines Jahres, der Unterschied zwischen der Alfacalcidolgruppe und der Placebogruppe im Bezug auf die Knochenresorptionsmarker war nach 12 Monaten statistisch signifikant. Bei den Knochenformationsmarkern war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu verzeichnen. In der Patientengruppe mit einer auf Cyclosporin A basierenden Immunsuppression konnte sowohl bei den Knochenformationsmarkern, als auch bei den Knochenresorptionsmarkern zwischen beiden Behandlungsgruppen auf Grund der zu geringen Fallzahl kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die zusätzliche Behandlung mit Alfacalcidol bewirkte in der Gruppe der mit Tacrolimus behandelten Patienten eine statistisch signifikante Zunahme der Knochendichte um 11 %, in der Placebogruppe dagegen war nur eine Zunahme um 6 % zu verzeichnen. Diese Zunahme war statistisch nicht signifikant. Auch der Unterschied zwischen beiden Gruppen lag unterhalb des Signifikanzniveaus. In der Gruppe der mit Cyclosporin behandelten Patienten war weder in der Alfacalcidolgruppe noch in der Placebogruppe eine signifikante Zunahme zu verzeichnen. Die Diskrepanz zwischen den beiden Alfacalcidolgruppen liegt vermutlich an der kleinen Fallzahl in der Cyclosporin-Gruppe (n = 9) mit hoher Intra- und Intervariabilität der Einzelwerte. Aufgrund der langsamen Dosisreduktion der Immunsuppressiva auf eine Erhaltungsdosis nach Ablauf des ersten Jahres kam es auch in den Placebogruppen zu einer Stabilisierung bzw. Zunahme der Knochendichte der LWS. Im Studienverlauf erlitt nur ein Patient aus der Placebogruppe eine weitere atraumatische Fraktur.

Neben der statistisch signifikanten Abnahme der Knochenresorptionsmarker und der ebenfalls signifikanten Zunahme der Knochendichte der Lendenwirbelsäule in der Alfacalcidolgruppe konnte gegenüber der Placebogruppe auch eine signifikante Abnahme des Parathormonspiegels festgestellt werden.

Aufgrund der zu geringen Fallzahl in der Patientengruppe mit auf Cyclosporin A basierender Immunsuppression war eine statistisch signifikante Veränderung der Knochendichte nur in der Patientengruppe mit auf Tacrolimus basierender Immunsuppression zu verzeichnen.

Zusammenfassend hat somit die Gabe von Alfacalcidol zusätzlich zur Basismedikation mit Calcium und Hormonsubstitution bei diagnostiziertem Hypogonadismus einen positiven Effekt auf den Knochenstoffwechsel.

Neben diesem positiven Effekt wurden in der vorliegenden Arbeit auch Nebenwirkungen durch die zusätzliche Behandlung mit Alfacalcidol festgestellt. Unter der Kombinationsbehandlung mit 500 mg Calcium und 1 µg Alfacalcidol pro Tag kam es in 7 % der Fälle zu einer Hypercalciurie und in 4 % der Fälle zu einer Hypercalcämie, sodass Calcium reduziert und schließlich abgesetzt werden musste. In 2 % der Fälle kam es zur Bildung von Nierensteinen. In 4 % der Fälle kam es auch unter Alfacalcidolmonotherapie zu einer Hypercalciurie, so dass die Dosierung von Alfacalcidol auf 1 µg jeden zweiten Tag reduziert werden musste. Aufgrund mehrerer Fälle von Hypercalciurie und Hypercalcämie wurden die Patienten, die ab Februar 1999 in die Studie eingeschlossen wurden und die bei der Basisuntersuchung einen normalen Calcium-Serum-Spiegel aufwiesen, nur mit 1 µg Alfacalcidol behandelt.

Entscheidend in der Osteoporoseprophylaxe und -therapie von herztransplantierten Patienten ist das frühzeitige Screening des Knochenstoffwechsels in Serum und Urin, der Knochendichte und des Sexualhormonstatus nach Transplantation, um pathologische Veränderungen rasch diagnostizieren und behandeln zu können. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Gabe von Alfacalcidol im Vergleich zu einer Calciummonotherapie den Parathormonspiegel statistisch signifikant senkt und die Knochendichte im Verlauf eines Behandlungsjahres statistisch signifikant zunimmt. Aufgrund des oben geschilderten Nebenwirkungsprofils ist bei einer Behandlung mit Alfacalcidol vor allem in Kombination mit einer Calciumsubstitution ein engmaschiges Screening von Calcium in Serum und Urin erforderlich. Bei Hypercalcämie oder Hypercalciurie ist eine Reduktion bzw. ein Absetzen von Calcium und gegebenenfalls eine Reduktion der Alfacalcidol-Dosis notwendig. Die Prophylaxe und Therapie der Osteoporose nach Herztransplantation sollte individuell nach aktuellem Skelettstatus, Calciumstoffwechsel und Sexualhormonhaushalt gestaltet werden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist eine Behandlung mit 1 µg Alfacalcidol, sowie mit 1000 mg elementarem Calcium bei Hypocalcämie und Substitution von Sexualhormonen bei diagnostiziertem Hypogonadismus zu empfehlen.

## 7 Literatur

1. Aerssens J, Van Audekercke R, Talalaj M, Van Vlasselaer P, Bramm E, Geusens P, Dequeker J: Effect of  $1\alpha$ -vitamin  $D_3$  on bone strength and composition in growing rats with and without corticosteroid treatment. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 443-450
2. Aerssens J, Van Audekercke R, Talalaj M: Effect of  $1\alpha$ -vitamin  $D_3$  and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in ovariectomized rat model. *Endocrinology* 1996; 137: 1358-1365
3. Bartl R: Osteoprose, Thieme Verlag 2004
4. Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, Flyvbjerg A: A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *J Bone Miner Res* 1990; 5: 609-618
5. Canalis E: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3441-3447
6. Cann CE: Quantitative CT for the determination of bone mineral density: a review. *Radiology* 1988; 166: 509-522
7. Chesnut CH, Baylink DJ: The role of anabolic steroids in the treatment of osteoporosis. *Geriatr Med Today* 1983; 2: 21-29
8. Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94: 646-650
9. Cvetkovic M, Mann GN, Romero DF, Liang XG, Ma Y, Jee WS, Epstein S: The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G and FK 506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation* 1994; 57: 1231-1237
10. Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose 2006
11. Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose 2006
12. Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.: DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen
13. Dambacher MA, Schacht E: Osteoporose und aktive Vitamin D-Metabolite - ein Blick in die Zukunft, Eular Verlag 1996

14. Delmas PD: Biochemical markers of bone turnover I: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 1993; 95: 11-16
15. Dequeker J, Linthoudt H, Vanschoubroeck I, Van Cleemput J, Geusens P: Prevention of postmenopausal bone loss by  $1\alpha$  Vitamin D<sub>3</sub>. *Akt. Rheumatol* 1994; 19: 19-22 (Suppl.)
16. Dequeker J, Borghs H, Cleemput J, Nevens F, Verleden G, Nijs J: Transplantation osteoporosis and corticosteroid-induced osteoporosis in autoimmune diseases: experience with alfacalcidol. *Z Rheumatol* 2000; 59 (Suppl 1): 1/53-57(10)
17. Deuber HJ: Alfacalcidol zur Behandlung der Osteoporose. *Osteologie Forum* 1999; 1: 5-14
18. De Vernejoule MC: Dynamics of bone remodeling (biochemical and pathophysiological basis). *Cur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 729-734
19. Dissanayake IR, Goodman GR, Bowman AR, Ma Y, Pun S, Jee WSS, Epstein S: Mycophenolate Mofetil: A promising new immunosuppressant that does not cause bone loss in the rat. *Transplantation* 1998; 65: 275-278
20. Doerr P, Pirke KM: Cortisol induced suppression of plasma testosterone in normal adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 43: 622-629
21. Doty SB: Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 509-512
22. Ensley RD, Bristow MR, Olsen SL, Taylor DO, Hammond EH, O'Connell JB, Dunn D, Osburn L, Jones KW, Kauffmann RS, Gay WA, Renlund DG: The use of Mycophenolate Mofetil (RS-61443) in human heart transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56: 75-82
23. Epstein S, Shane E, Bilezikian JP: Organ transplantation and osteoporosis. *Curr Opinion Rheum* 1995; 7:255-261
24. Epstein S: Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1-7
25. Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, Doppelt SH, Rosenthal DI, Segre GV, Crowley WF: Increases in bone density during treatment of men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 776-783
26. Fleisch H: Bisphosphonates in bone disease - from the laboratory to the patient. 2<sup>nd</sup> edition 1995, Parthenon, New York
27. Francis RM, Boyle IT, Moniz C, Sutcliffe AM, Davis BS, Beastall GH, Cowan RA, Downes D: A comparison of the effects of alfacalcidol treatment and vitamin D<sub>2</sub> supplementation on calcium absorption in elderly women with vertebral fractures. *Osteoporosis Int* 1996; 6: 284-290

28. Francis RM: Is there a differential response to Alfacalcidol and vitamin D in the treatment of osteoporosis? *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 11-114
29. Franke J, Clarenz P, Dören M, Fischer M, Franck H, Keck E, Kruse H-P, Schmidt-Gayk H, Seibel M, Werner E: Bericht der interdisziplinären Leitlinienkommission zur Diagnostik der Osteoporose. *Osteologie* 1996; 5: 162-173
30. Gärdsell P, Johnell O, Nilsson BE: Predicting fractures in women by using forearm bone densitometry. *Calcif Tissue Int* 1989; 44: 235-242
31. Garnero P, Delmas PD: Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1046-1053
32. Genant HK, Grampp S, Gluer CC, Faulkner KG, Jergas M, Engelke K, Hagiwara S, Van Kuijk C: Universal standardization for dual x-ray absorptiometry: Patient and phantom cross-calibration results. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1503-1514
33. Geusens P, Dequeker J, Nijs J, Verstraeten A, Bramm E: Prevention and treatment of osteopenia in ovariectomized rat: effect of combined therapy with estrogens, 1-alpha vitamin D and prednisolone. *Calcif Tissue Int* 1991; 48: 127-137
34. Gonwa TA, Mai ML, Pilcher JB, Johnson C, Person S, Capehart JE, Alivizatos PA: Stability of long-term renal function in heart transplant patients treated with induction therapy and low-dose cyclosporine. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 926-928
35. Greenberg A, Thompson ME, Griffith BJ, Hardesty RL, Kormos RL, El-Shahawy MA, Janosky JE, Puschett JB: Cyclosporine nephrotoxicity in cardiac allograft patients - a seven-year follow-up: *Transplantation* 1990; 4: 589-593
36. Grundberg CM, Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM: Osteocalcin: Isolation, characterization and detection. *Methods Enzymol* 1984; 107: 516-544
37. Guo C-Y, Johnson A, Locke TJ, Eastell R: Mechanisms of bone loss after cardiac transplantation. *Bone* 1998; 22: 267-271
38. Hock JM, Gera I: Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 65-7
39. Hodsman AB, Steer BM, Fraher LJ, Drost DJ: Bone densitometric and histomorphometric responses to sequential human parathyroid hormone (1-38) and salmon calcitonin in osteoporotic patients. *Bone Miner* 1991; 14: 67-83
40. Hofbauer LC: Die Rolle von RANK-Ligand und Osteoprotegerin bei Osteoporose. *J Miner Stoffwechsel* 2004; 11: Suppl 1 15-19
41. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S: Stimulation of Osteoprotegerin Ligand and inhibition of Osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracri-

- ne mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140 : 4382-4389
42. Hollick MF: Vitamin D: Relevance for clinical medicine
  43. Hosking DJ: Effects of corticosteroids on bone turnover. *Respiratory Medicine* 1993; 87: 15-21
  44. Hui SL, Slemenda CW, Johnston CC Jr: Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest* 1988; 81: 1804-1809
  45. Hui SL, Slemenda CW, Johnston CC Jr: Baseline measurement of bone mass predicts fracture in white women. *Annals of Int Med* 1989; 111: 355-361
  46. Hsu CH, Patel S: Uremic plasma contains factors inhibiting 1 alpha-hydroxylase activity. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3 : 947-952
  47. Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishi Y, Takahashi N Suda T: Mouse primary osteoblasts express vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase mRNA and convert 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Bone* 1995; 16:129-135
  48. Inoue T, Kawamura I, Matsuo M, Aketa M, Mabuchi M, Seki J, Goto T: Lesser reduction in bone mineral density by the immunosuppressant FK 506 compared with cyclosporine in rats. *Transplantation* 2000; 57: 774-779
  49. Ippoliti G, Pellegrini CC, Campana C, Rinaldi M, D'Armini A, Goggi, C, Aiello M, Viganò M: Clodronate treatment of established bone loss in cardiac recipients: a randomized study. *Transplantation* 2003; 75: 330-334
  50. Jehle PM: Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren bei Osteoporose und renaler Osteopathie. *Osteologie Forum* 1998; 4: 44-45
  51. Joffe I, Katz I, Jacobs T, Epstein S: 17 $\beta$ -Estradiol prevents osteopenia in the oophorectomized rat treated with cyclosporin-A. *Endocrinology* 1992; 130: 1578-1586
  52. Johannson AG, Lindh E, Ljunghall S: Insulin-like growth factor I stimulates bone turnover in osteoporosis. *Lancet* 1992; 339: 1619
  53. Johnston CC Jr, Slemenda CW, Melton LJ III: Clinical use of bone densitometry. *NEJM* 1991; 324: 1105-1109
  54. Kahan BD: Cyclosporine. *NEJM* 1989; 321: 1725-1736
  55. Kann P: Vitamin D und Osteoporose – Pathogenese und Therapie. *Dtsch.med. Wschr.*1994; 119: 1479-1485
  56. Kirklin JK, Bourge RC, Naftel DC, Morrow WR, Deierhoi MH, Kauffmann RS, White-Williams C, Nomberg RI, Holman WL, Smith DC: Treatment of recurrent heart rejection with Mycophenolate Mofetil (RS-61443): Initial clinical Experience. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 444-45

57. Kraenzlin ME: Sinnvolle Osteoprose-Diagnostik in der Praxis. In: Seibel MJ, Kraenzlin ME: *Moderne Diagnostik – therapeutische Konsequenzen für Klinik und Praxis*. 1995, Karger, Freiburg: 24-29
58. Lee AH, Mull RL, Keenan GF, Callegari PE, Dalinka MK, Eisen HJ, Mancini DM, DiSesa VJ, Attie MF: Osteoporosis and bone morbidity in cardiac transplant recipients. *Am J Med* 1994; 96: 35-41
59. Lee, S-K; Lorenzo, J: Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Current Opinion in Rheumatology*: 2006; 18 (49): 411-418
60. Lindsay R: Bone loss after cardiac Transplantation. *NEJM* 2004; 350 :751-754
61. Lukert BP, Raisz LG: Glucocorticoid induced osteoporosis: Pathogenesis and management. *Annals of Int Med* 1990; 112: 352-364
62. Marcus R: Secondary forms of osteoporosis. In Coe FL, Favus MJ, editors: *Disorders of bone and mineral metabolism*. Raven Press 1992; 889-901.
63. Marie PJ, Vernejoule MC, Lomri A: Stimulation of bone in osteoporosis patients treated with flouride associated with increased DNS synthesis by osteoblastic cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 103-113
64. Marshall I, Isserow J, Buchinsky P, Paynton B, Epstein S: Expression of interleukin 1 and interleukin 6 in bone from normal and cyclosporin A treated rats. XI Int. conf. on calcium regulating hormones, February, Melbourne, Australia 1995
65. Mazess R, Collick B, Trempe J, Barden H, Hanson J: Performance evaluation of dual-energy x-ray densitometer. *Calcif Tissue Int* 1989; 44: 228-232
66. McCauley LK, Rosol TJ, Capen CC: Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts (ROS 17/2.8 cells) in vitro. *Calcif Tissue Int* 1992: 51: 291-297
67. McSheehy PMJ, Chambers TJ: Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 1986; 118: 824-828
68. Meys E, Terreaux-Duvert F, Beaume-Six T, Dureau G, Meunier PJ: Bone loss after cardiac transplantation: Effects of calcium, calcidiol and monofluorophosphate. *Osteoporosis Int* 1993; 3: 322-329
69. Mohan S: Die Rolle von insulin-like growth factor (IGF) Bindungsproteinen (IGFBPs) bei der Regulation der IGF-Wirkungen: Warum ist eine Redundanz bei IGFBPs erforderlich? *Osteologie Forum* 1998; 4: 42-43
70. Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, Ismail F, Thomas S: Cyclosporin-A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration. *Endocrinology* 1988; 123: 2571-2577

71. Muchmore JS, Cooper KC, Ye Y, Schlegel V, Pribil A, Zuhdi N: Prevention of loss of vertebral bone density in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 959-964
72. Mundy GR: Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993; 8: Suppl.2, S505-S510
73. Mundy GR: Osteoporosis and inflammation. *Nutr.Rev.* 2007; 65: Suppl 3, 147-151
74. Nordin BEC: Guidelines for bone densitometry. *Med J Australia* 1994; 160: 517-520
75. Orwoll ES, Oviatt SA, Biddle JA: Precision of dual-energy x-ray absorptiometry: development of quality control rules and their application in longitudinal studies. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 693-699
76. Pacifici R, Rupich RC, Griffin MG, Chines A, Susman N, Avioli LV: Dual energy radiography versus quantitative computed tomography for the diagnosis of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 705-710
77. Parfitt AM: The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 1984; 36: 37-45
78. Parfitt AW: The two-stage concept of bone loss revisited. *Triangle* 1992; 31: 99-110
79. Parfitt AW: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994; 55: 273-286
80. Peck WA, Woods W: The cell of bone. In: Riggs L, Melton III LJ: *Osteoporosis: Ethiology, Diagnosis and Management*. Lippincott-Raven, 1988, 1-44
81. Pisani B, Mullen MG: Prevention of osteoporosis in cardiac transplant recipients. *Curr Opin Cardio* 2002; 17: 160-164
82. Pouilles JM, Tremollieres F, Ribot C: Prevention of postmenopausal bone loss with 1 $\alpha$ -Hydroxy vitamin D<sub>3</sub> - a three-year prospective study. *Clinical rheumatology* 1992; 11: 492-497
83. Preisinger E: RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. *J Miner Stoffwechsel* 2007; 14 (4): 144-145
84. Raisz LG, Pilbeam CC, Fall PM: Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone. *Osteopros Int* 1993; 3: 136-140
85. Reginster JY, Kuntz D, Verdickt W, Wouters M, Guillemin L, Menkes CJ, Nielsen K: Prophylactic use of alfacalcidol in corticoid-induced osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1999; 9: 75-81 (11)

86. Reginster JY, Froidmont C, Lecart MP, Sarlet N, Defraigne JO: Alphacalcidol in prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 328-331
87. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *NEJM* 1989; 320: 980-989
88. Reichel H, Deibert B, Schmidt-Gayk H, Ritz E: Calcium metabolism in early chronic renal failure: Implications for the pathogenesis of hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 162-169
89. Richy F, Ehgen O, Bruyere O, Reginster J-Y: Efficacy of alphacalcidol and calcitriol in primary and corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis of their effects on bone mineral density and fracture rate. *Osteoporos Int* 2004; 15: 301-310
90. Riggs B, O'Fallon WM, Hodgson S, Chao E, Wahner H, Muhs J, Melton L: Clinical trial of fluoride in osteoporotic women: extended observation and additional analyses. *Bone Miner* 1992; 17 (Suppl 1): 74
91. Ringe J: Osteoporose. In: Miehle W, Fehr K, Schattenkirchner, Tillmann K (Hrsg.) *Rheumatologie in Praxis und Klinik*. Thieme, 2000, 1207-1218
92. Ringe JD, Schacht E: Alfacalcidol in der Osteoporosetherapie. *Arzneimitteltherapie*, 12. Jahrgang, 1994; 3: 69-73
93. Ringe JD, Meunier PJ: What is future for fluoride in the treatment of osteoporosis? *Osteoporosis Int* 1995; 5: 71-74
94. Ringe JD, Cöster A, Meng T, Schacht E, Umbach R: Treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis with alfacalcidol/calcium versus vitamin D/calcium. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 337-3340 (9)
95. Ristelli L, Ristelli J: Biochemical markers of bone metabolism. *Annals of Med* 1993; 25: 385-393
96. Rivas M, Kim TS, Staron RB, Shane E: Hypogonadism, bone mass and fractures in men after heart transplantation. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 601 A
97. Robey PG, Fisher LW, Young MF, Termin JD: Biochemistry of bone In: Riggs L, Melton III LJ: *Osteoporosis: Ethiology, Diagnosis and Management*. Lippincott-Raven, 1988, 95-109
98. Sambrook P, Kotowicz M, Nash P, Styles CB, Naganathan V, Henderson-Briffa KN, Eisman JA, Nicolson GC: Prevention and treatment of glucocorticosteroid-induced osteoporosis - a comparison of calcitriol, vitamin D plus calcium and alendronate plus calcium. *J Bone Miner Res* 2003; 18 (5): 919-924

99. Sambrook PN, Kelly PJ, Keogh AM, Macdonald P, Spratt P, Freund J, Eisman JA: Bone loss after heart transplantation: A prospective study. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 116-121
100. Sambrook PN: Alfacalcidol and calcitriol in the prevention of bone loss after organ transplantation. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 341-343
101. Sambrook PN: Corticoid osteoporosis. *Z Rheumatol* 2000; 59: Suppl 1, I/45-47
102. Sasaki N, Kusano E, Ando Y, Yano K, Tsuda E, Asano Y: Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): Possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 479-482
103. Sass DA, Bowman AR, Yuan Z, Ma Y, Jee WSS, Epstein S: Alendronate prevents cyclosporin A-induced osteopenia in the rat. *Bone* 1997; 21: 65-70
104. Schacht E: Rationale for treatment of involutional osteoporosis in women and for treatment of corticosteroid-induced osteoporosis with alfacalcidol: *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 317-327
105. Schacht E: Osteoporose bei rheumatoider Arthritis - Bedeutung von Alfacalcidol in Prävention und Therapie; *Z Rheumatol* 2000; 59: Suppl 1, I/10-20
106. Scharla SH, Strong DD, Mohan S, Baylink DJ, Linkhart TA: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> differentially regulates the production of IGF-I and IGFBP-4 in mouse osteoblasts. *Endocrinology* 1991; 129: 3139-3146
107. Scharla SH, Strong DD, Mohan S, Linkhart TA: Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the secretion of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding proteins (IGFBPs) in human osteoblast-like cells. *Exp Clin Endocrinol* 1993; 101: Suppl 1, 69
108. Scharla SH: Bedeutung der Zytokine für den Knochenverlust - gibt es Interventionsmöglichkeiten. *Z Rheumatol* 2001; 60: 104-106
109. Schulz W: Fluoride zur Therapie der Osteoporose. *Osteologie forum* 1998; 4: 58-63
110. Seibel MJ, Woitge HW, Ziegler R: Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels. *KlinLab* 1993; 39: 717-727
111. Seibel MJ, Zipf A, Ziegler R: Pyridinium-Crosslinks im Urin. *Dtsch med Wschr* 1994; 119: 923-923
112. Seino Y, Tanaky H, Yamaoka K, Yabuuchi H: Circulating 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> levels after a single dose of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in normal men. *Bone Miner* 1987; 2: 479-485
113. Seyedin S, Zuk R, Kung V, Daniloff Y, Shepard K: An immunoassay to urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 635-642

114. Shane E, Rivas M, Silverberg SJ, Kim TS, Staron RB, Bilezikian JP: Osteoporosis after cardiac transplantation. *Am J Med* 1993; 94: 257-264
115. Shane E, Epstein S: Immunosuppressive therapy and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 1994; 4: 169-175
116. Shane E, Rivas M, McMahon DJ, Staron RB, Silverberg SJ, Seibel MJ, Mancini D, Michler RE, Aaronson K, Adesso V, Lo SH: Bone loss and turnover after cardiac transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1497-1506
117. Shane E, Adesso V, Namerow PB, McMahon DJ, Donald J, Lo SH, Staron RB, Zucker M, Pardi S, Maybaum S, Mancini D: Alendronate versus calcitriol for the prevention of bone loss after cardiac transplantation. *NEJM* 2004; 350: 767-776
118. Shen V, Dempster DW, Mellish RW, Birchman R, Horbert W, Lindsay R: Effects of combined and separate intermittent administration of low-dose human parathyroid hormone fragment (1-34) and 17 beta-estradiol on bone histomorphometry in ovariectomized rats with established osteopenia. *Calif Tissue Int* 1992; 50: 214-220
119. Shiraishi A, Higashi S, Ohkawa H, Kubodera N, Hirasawa T, Ezawa I, Ikeda K, Ogata E: The advantage of alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1999; 65: 311-316
120. Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E: Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 2000; 15(4): 770-779(4)
121. Sollinger HW, Deierhoi MH, Belzer FO, Diethelm AO, Kauffmann RS: RS-61443-A phase I clinical trial and pilot rescue study. *Transplantation* 1992; 53: 428-432
122. Stempfle HU: Osteoporose nach Herztransplantation - Pathogenese und Therapie. *Dtsch med Wschr* 1996; 36: 1103-1107
123. Stempfle HU: Posttransplantationsosteoporose Workshop Leoni 1997: 1611-1613
124. Stempfle HU, Wehr U, Meiser B, Angermann CE, Rambeck WA, Gärtner R: Rapid trabecular bone loss after cardiac transplantation using FK 506 (Tacrolimus-) based immunosuppression. *Transplant Proc* 1998; 30: 1132-1133
125. Stempfle HU, Werner C, Angermann CE, Theisen K, Gärtner R: Early and long-term effects of FK 506 (Tacrolimus)-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: A prospective longitudinal study. *Transplant Proc* 1998; 30: 1132-1133

126. Stempfle HU: Der Knochenmineralstoffwechsel bei terminaler Herzinsuffizienz und nach orthotoper Herztransplantation: Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Medizinische Habilitation, Ludwig-Maximiliansuniversität München, 1999
127. Stempfle HU, Werner C, Echtler S, Wehr U, Rambeck WA, Siebert U, Überfuhr P, Angermann CE, Theisen K, Gärtner R: Prevention of osteoporosis after cardiac transplantation. A prospective, randomized, double-blind trial with calcitriol. *Transplantation* 1999; 68: 547-552
128. Stempfle HU, Werner C, Siebert U, Assum T, Wehr U, Rambeck WA, Meiser B, Theisen K, Gärtner R: The role of tacrolimus (FK 506)-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-blind trial with calcitriol. *Transplantation* 2002; 73: 547-552
129. Stief J, Sohn HY, Alt A, Überfuhr P, Theisen K, Stempfle HU: Einfluss des Immunsuppressiva-induzierten Hypogonadismus auf den Knochenmetabolismus nach Herztransplantation. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 1674-1678
130. Taylor DO, Ensley RD, Olsen SL, Dunn D, Renlund DG: Mycophenolate mofetil (RS-614439): preclinical, clinical and three-year experience in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 571-582
131. Taylor DO: The use of Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil after cardiac transplantation. *Curr Opin Cardio* 1997; 12: 161-165
132. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Aurora P, Christie J, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI: Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report – 2007. *J Heart Lung Transplant*. 2007 Aug; 26(8):769-81
133. Thomas L: Labor und Diagnose. Marburg: Medizinische Verlagsgesellschaft 1995
134. Van Cleemput J, Daenen W, Geusens P: Prevention of bone loss in cardiac transplant recipients: A comparison of bisphosphonates and vitamin D. *Transplantation* 1996; 61: 1495-1499

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. U. Kreider-Stempfle danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. K. Theisen danke ich für die großzügige Arbeitsmöglichkeit in seiner Abteilung.

Dem emeritierten Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. P. C. Scriba und seinem Nachfolger, dem ärztlichen Direktor Herrn Prof. Dr. med. M. Reinke danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an ihrer Klinik.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. B. Reichart, sowie den Mitarbeitern seiner herzchirurgischen Abteilung, insbesondere Frau Schüpferling, für die Kooperation und die Unterstützung des Osteoporose-Projektes.

Herrn Prof. Dr. med. W. Rambeck, Herrn Dr. med. U. Wehr und Frau Dr. med. C. Martin vom Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Bestimmung der Knochenmarker und die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. med. C. Werner danke ich für die tatkräftige Unterstützung und guten Ratschläge.

Bei den Mitarbeitenden der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich mich für ihre hilfreiche Unterstützung bedanken.

Der Firma Byk-Gulden, Deutschland, danken wir für die großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich mit liebevoller Unterstützung durch alle Phasen der Doktorarbeit begleitet haben, und meinem Bruder, der bei Computerproblemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Mann danke ich ganz herzlich für den täglichen Beistand, sein Verständnis und seine Liebe, durch die die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich wurde.

Zuletzt noch ein großes Dankeschön an meine Kinder, die die endgültige Fertigstellung der Arbeit vorantrieben.