

Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

**Einfluss von Estrogen und Estrogenmetaboliten auf
das Mammakarzinomrisiko**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Birgit Sybille Zimmermann
aus
Schwäbisch Gmünd

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Huober

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Mörike

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht in:

Huober, J., Diesing, D., Zimmermann, B., Seeger, H., Wallwiener, D., Mueck, A.O. Estradiolmetabolite als Risikofaktor des Mammakarzinoms bei postmenopausalen Frauen? *Onkologie*, **26**, Suppl. 2, 94 (2003)

Huober, J., Diesing, D., Zimmermann, B., Mueck, A.O., Wallwiener, D., Duerr, H.P., Seeger, H. Estrogen metabolism via D-ring pathway is associated with a higher susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **82**, Suppl. 1, 116 (2003)

Zimmermann, B., Diesing, D., Seeger, H., Mueck, O.A., Wallwiener, D., Huober, J. Are estrogen metabolites a risk factor for developing breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**, Suppl. 1, 27 (2003)

Auszeichnung:

Verleihung des **Christian Lauritzen Preis** der Deutschen Menopause Gesellschaft e.V. am 18. Juni 2004 in Hamburg - Preis für hervorragende Arbeiten auf dem Gebiet sexualhormonabhängige Gesundheit bei Frauen und Männern in der zweiten Lebenshälfte.

Zimmermann, B. Verhältnis von 2-Hydroxyestron zu 16 α -Hydroxyestron bei Frauen mit und ohne Brustkrebs - Fall-Kontroll-Studie.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Histologie	1
1.1.3 Hormonrezeptoren	2
1.1.4 HER2/neu-Rezeptor	3
1.1.5 Risikofaktoren	3
1.1.5.1 Alter	3
1.1.5.2 Familiäre Belastung	4
1.1.5.3 Hormonelle Situation	4
1.1.5.4 Body Mass Index (BMI)	7
1.1.5.5 Ernährung, Nikotin- und Alkoholkonsum	7
1.2 Estrogen	8
1.2.1 Struktur und Synthese	9
1.2.2 Entstehungsort und Menge	10
1.2.3 Estrogenmetabolismus	12
1.2.3.1 2-Hydroxyestron (2-OHE)	13
1.2.3.2 16 α -Hydroxyestron (16 α -OHE)	14
1.2.3.3 2-Hydroxyestron, 16 α -Hydroxyestron und Brustkrebs	14
1.3 Fragestellung	15
1.4 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Patientenkollektiv	17
2.1.2 Gruppenbildung	18
2.1.3 Erfassung wichtiger Einflussgrößen	23
2.1.3.1 Alter und Menopausenstatus	23
2.1.3.2 Hormoneinnahme	23
2.1.3.3 Rauchen und Alkohol	24
2.1.3.4 BMI	24
2.1.3.5 Nationalität	24
2.1.4 Studiendesign	24

2.2 Methode	26
2.2.1 17 β -Estradiol- und FSH-Bestimmung	26
2.2.2 Enzymimmunoassay	26
2.2.2.1 Vorgehensweise	28
2.2.3 Statistische Auswertung	29
2.2.3.1 Allgemeines	29
2.2.3.2 Tukey-Kramer-Test	30
2.2.3.3 t-Test	30
2.2.3.4 Varianzanalyse	30
3 Ergebnis	31
3.1 Ergebnisse der Merkmalerfassung	31
3.1.1 Altersverteilung	31
3.1.2 Hormoneinnahme	33
3.1.3 Rauchen	33
3.1.4 Alkoholkonsum	34
3.1.5 BMI	35
3.2 Ergebnisse der 2-OHE, 16 α -OHE und E2-Messungen	39
3.3 Homogenitätsprüfungen	42
3.3.1 Kategorie	42
3.3.2 Rezeptorstatus	43
3.3.3 Menopausenstatus	44
3.4 Varianzanalyse	46
3.4.1 Zielvariable „krank/gesund“	46
3.4.1.1 Einfluss des Menopausenstatus auf „krank/gesund“	48
3.4.1.2 Einfluss der log Ratio auf „krank/gesund“	49
3.4.1.3 Einfluss von log BMI auf „krank/gesund“	49
3.4.1.4 Einfluss von Rauchen auf „krank/gesund“	50
3.4.1.5 Einfluss von Hormonen auf „krank/gesund“	50
3.4.2 Zielvariable log Ratio	51
3.4.2.1 Einfluss des Menopausenstatus auf log Ratio	53
3.4.2.2 Einfluss des log E2 auf die log Ratio	53
3.4.2.3 Einfluss des BMI auf die log Ratio	55
3.4.2.4 Einfluss anderer Faktoren	55
3.4.3 Zusammenfassung	57

4 Diskussion	58
4.1 2-OHE/16 α -OHE - Risikofaktor für Brustkrebs?	58
4.2 Menopausenstatus	64
4.3 BMI	65
4.4 Hormone	67
4.5 Rauchen	69
4.6 Estrogen	71
4.7 Enzym polymorphismus	72
5 Zusammenfassung	75
Literaturverzeichnis	77
Anhang	87
Abkürzungsverzeichnis	87
Abbildungsverzeichnis	90
Tabellenverzeichnis	91
Patientenaufklärung und –Einverständnis	92
Einwilligungserklärung	94
Fragebogen	95
Danksagung	96
Lebenslauf	98

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Jede zehnte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. In Deutschland stellt das Mammakarzinom mit rund 50.000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste Krebserkrankung der Frau dar (Schön et al. 2002). Diese Zahl entspricht 26% aller jährlichen Malignomerkrankungen (Schmidt-Matthiesen et al. 2000). Die Inzidenz ist steigend.

Das Mammakarzinom ist vor allem eine Erkrankung postmenopausaler Frauen, so wird die Hälfte aller Fälle erstmalig im Alter über 60 und ein Drittel über 70 Jahren diagnostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63,4 Jahren (Kreienberg et al. 2002). Aber auch junge Frauen erkranken und trotz Rückgang der Sterblichkeit der unter 50-Jährigen führt das Mammakarzinom in der Altersgruppe zwischen 35 und 45 Jahren die Todesursachenstatistik an (Schmidt-Matthiesen 2000). Die Mortalitätsraten der 50- bis 70-Jährigen zeigen sich stabil, für die über 70-Jährigen sind sie leicht ansteigend (Becker et al. 2002).

Pro Jahr sterben in Deutschland 19.000 Frauen an Brustkrebs. Dies entspricht 18% aller Krebstodesfälle bei Frauen (Kreienberg et al. 2002).

In der 5-Jahresüberlebensrate verläuft die relative Überlebensrate beim Mammakarzinom auch zehn Jahre nach der Diagnose noch nicht parallel zur Zeitachse. Erst nach 13 bis 14 Jahren gleicht sich die Sterblichkeit der Normalbevölkerung an. Das bedeutet, dass beim Brustkrebs noch bis zu 15 Jahre nach der Diagnosestellung Todesfälle in Zusammenhang mit der Erkrankung auftreten.

1.1.2 Histologie

80% aller Mammakarzinome sind invasive, duktale Karzinome. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus invasiven und intraduktalen Tumoranteilen.

Typisch ist das bunte Bild aus unterschiedlich großen Tumorzellen. In einem Drittel der Fälle entsteht der Tumor multizentrisch, umgeben von einer duktalem In-situ-Komponente (DCIS). In ca. 3% der Fälle ist gleichzeitig auch die andere Brust betroffen. Das makroskopische und radiologische Erscheinungsbild ist meist durch den Anteil an kollagenen Fasern gekennzeichnet. Tumoren mit sternförmig faserreichem Zentrum und radiären Ausläufern sind oft für die Haut- bzw. Mamillenretraktion verantwortlich (Schmidt-Matthiesen et al. 2000).

Beim invasiv lobulären Karzinom, einem meist kleinzelligen und multizentrischen Karzinom (50%), finden sich oft auch auf der anderen Seite präinvasive Herde. Da die kleinen Tumorzellen bei ihrer Ausbreitung kaum Drüsenparenchym zerstören, ist der Tumor erst sehr spät radiologisch sichtbar (Schmidt-Matthiesen et al. 2000). Darüber hinaus gibt es noch tubuläre, muzinöse (Gallertkarzinome), Mischtumoren, medulläre Mammakarzinome, den Morbus Paget der Mamille und das inflammatorische Mammakarzinom.

1.1.3 Hormonrezeptoren

Estrogen- und Progesteronrezeptoren gehören zur Gruppe der Steroidrezeptoren. Sie haben ihren Sitz im Nucleus und im Zytoplasma und wirken nach Ligandenbindung direkt auf die Genexpression (Miller 1996). Der humane Estrogenrezeptor besteht aus 595 Aminosäuren und besitzt auf seiner Oberfläche zwei verschiedene Bindungsdomänen - eine für den Liganden (LBD) und eine für die Bindung an die DNA (DBD). Bindet der Ligand an den Rezeptor, so findet durch Phosphorylierung eine Konformationsänderung des Rezeptors statt. An der DNA-Bindungsdomäne bilden Cystein und Zink einen Chelatkomplex, den sogenannten "Zinkfinger", der die Bindung an die spezifischen DNA-Sequenzen, die „estrogen response elements“ (ERE) ermöglicht. Anschließend erfolgt die Gentranskription (Jazaeri et al. 1999).

Der Nachweis der Estrogen- und Progesteronrezeptoren im Gewebe erfolgt mit Hilfe eines Enzymimmunoassays oder einer immunhistochemischen Bestimmung - meist wird die immunhistochemische Methode verwendet. In Deutschland hat sich der Immunoreactive-Score (IRS) von Remmele und Stegner durchgesetzt. Hierbei werden die Werte für Färbeintensität (0-3) mit

dem Prozentsatz positiver Zellen (0-4) multipliziert. Erhält man als Ergebnis einen Score >1 , so gilt der Test als positiv. Dies entspricht einem Anteil positiver Zellen von 10 bis 25% (Remmele & Stegner 1987). Für die biochemische/enzymimmunologische Bestimmung gilt ein Wert von ≥ 10 fmol/mg Protein als hormonrezeptorpositiv (Umamura et al. 2004). Ungefähr zwei Drittel der Mammakarzinome sind estrogenrezeptorpositiv (Roodi et al. 1995).

1.1.4 HER2/neu-Rezeptor

Das HER2-Protein ist eine transmembrane Tyrosinkinase, die große Ähnlichkeit zum EGF-Rezeptor hat und vor allem im Brustdrüsengewebe und Herzmuskel vorkommt. Durch eine Genamplifikation des HER2neu-Onkogens kommt es zur Überexpression von HER2. Eine HER2-Überexpression wird mittlerweile als ein prognostisch ungünstiges Zeichen angesehen (Burstein et al. 2001).

Durch immunhistochemische bzw. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-Analyse (FISH) wird die HER2-Expression im Gewebe festgestellt und in verschiedene Schweregrade eingeteilt (3+, 2+, 1+). 3+ oder 2+, in Kombination mit einer positiven FISH-Analyse, entspricht einem positiven Ergebnis und ist Voraussetzung für die Therapie mit dem auf das HER2-Protein spezialisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®).

1.1.5 Risikofaktoren

1.1.5.1 Alter

Das Alter ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung des Mammakarzinoms. Die Inzidenz ist zwischen 50 und 70 Jahren am höchsten und damit um den Faktor 5 höher als im Alter zwischen 35 und 40. Eine 65-jährige Frau hat bereits eine dreimal höhere Wahrscheinlichkeit, in ihrem nächsten Lebensjahr ein Mammakarzinom zu entwickeln, als eine 45-jährige (Kreienberg et al. 2002).

1.1.5.2 Familiäre Belastung

Auf eine familiäre Erkrankung weisen besonders das frühzeitige Auftreten (<40. Lebensjahr) eines Mammakarzinoms bei Verwandten ersten Grades, wie der Mutter oder der Schwester hin (Pfleiderer et al. 1999). Dabei werden nur etwa 5% der Mammakarzinome autosomal-dominant vererbt. Die entscheidenden Erkenntnisse darüber wurden 1994 mit der Entdeckung des BRCA1-Gens (Chromosom 17q21) (Miki et al. 1994) und 1997 mit der des BRCA2-Gens (Chromosom 13q12-13) (Tavtigian et al. 1996) erbracht. Die kumulative Wahrscheinlichkeit mit einer BRCA1-Mutation bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, beträgt ca. 82%. Für das BRCA2-Gen wird ein Mammakarzinom-Risiko von 70% angenommen.

Bei weiteren 10% der betroffenen Frauen treten Brustkrebserkrankungen gehäuft in Familien auf, lassen aber keinen eindeutigen Erbgang erkennen (Kreienberg et al. 2002).

1.1.5.3 Hormonelle Situation

Estrogene spielen aufgrund ihres mitogenen Potentials in der Ätiologie des Mammakarzinoms eine große Rolle. Je länger eine Frau dem Einfluss von Estrogenen ausgesetzt ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit ein Mammakarzinom zu entwickeln. Eine frühe Menarche und eine späte Menopause zählen somit wie eine späte erste Schwangerschaft, Kinderlosigkeit oder kurze Stillzeiten zu den Risikofaktoren (Hankinson 2002).

Synthetische Estrogene müssen von natürlichen Estrogenen unterschieden werden. Das bei der hormonellen Kontrazeption meistbenutzte synthetische Ethinylestradiol zeigte im Tierversuch ein geringeres karzinogenes Potential als natürliche Estrogene. Die Reanalyse der „Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer“ aus dem Jahre 1996 konnte nach Auswertung von 54 epidemiologischen Studien mit 53.297 Brustkrebspatientinnen und 100.239 gesunden Frauen feststellen, dass während und bis zu zehn Jahren nach hormoneller Kontrazeption ein relatives Risiko (RR) für die Entwicklung eines

Mammakarzinoms von bis zu 1,24 ([95% CI 1,15;1,33], $2p < 0,00001$) besteht. Dieses Risiko verliert sich unabhängig vom Präparat nach zehn Jahren. Frauen, die vor dem 20. Lebensjahr mit der Einnahme begannen, hatten gegenüber Frauen, die später begannen, ein erhöhtes Risiko, das bis fünf Jahre nach der Einnahme anhielt. Allerdings bezog sich das Risiko auf eine Gruppe, die eher selten von Brustkrebs betroffen ist und relativiert sich deshalb. Untersuchungen haben ergeben, dass diese Frauen auch zwanzig Jahre danach nicht vermehrt an Brustkrebs erkrankten.

Weiterhin wurde festgestellt, dass Frauen, die unter hormoneller Kontrazeption Brustkrebs entwickelten, eher weniger fortgeschrittene Tumoren besaßen als andere. Ob das an regelmäßigeren gynäkologischen Untersuchungen liegt oder andere Gründe hat, ist noch unklar. Es ist somit von keinem erhöhten genotoxischen Effekt der Ethinylestradiole auszugehen (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997).

Das Thema Hormonersatztherapie (HRT) und Brustkrebs steht seit einer Untersuchung von Bergkvist et al. aus dem Jahre 1989 in ständiger Diskussion (Bergkvist et al. 1989). Die seither unternommen Studien gehen bei einer Therapiedauer von unter fünf Jahren von einem geringen Brustkrebsrisiko aus (z.B. Colditz et al. 1995). Kombinationspräparate aus Estrogen und Progesteron zeigten ein leicht erhöhtes Risiko (RR=1,41) im Vergleich zu reinen Estrogenen. In einer Reanalyse der „Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer“ (1997) wird von einer Zunahme des relativen Risikos bei HRT pro Jahr um dem Faktor 1,023 ausgegangen. Was bei einer 10-15-jährigen Therapie eine Risikozunahme von 35% bedeutet. Eine Normalisierung ist fünf Jahre nach Absetzen des Hormons wieder erreicht.

In der „Million Women Study“ wurden zwischen 1996 und 2001 1.084.110 Frauen aus Großbritannien (Alter: 50 - 64 Jahre) in einer Follow-up Studie untersucht, die Hälfte der Frauen mit HRT. In dieser Zeit traten 9.364 Brustkrebsneuerkrankungen und 637 Todesfälle durch Brustkrebs auf. Frauen, die schon früher eine HRT gemacht hatten, zeigten ein größeres Risiko, Brustkrebs zu entwickeln (RR 1,66 [95% CI 1,58;1,75], $p < 0,0001$) als Frauen,

die noch nie Hormone genommen hatten. Das Risiko an einem Mammakarzinom zu versterben war mit einem relativen Risiko von 1,22 ([95% CI 1,0;1,48], $p=0,05$) nicht signifikant. Eine Differenzierung zwischen den Hormonpräparaten zeigte auch hier, dass die Kombination aus Estrogen und Progesteron (RR 2,0 [95% CI 1,88;2,12], $p<0,0001$) ein größeres Erkrankungsrisiko birgt als Estrogenmonopräparate (RR 1,30 [95% CI 1,21;1,40], $p<0,0001$) (Beral & Million Women Study Collaborators 2003).

Eine weitere aktuelle Studie, die „WHI-Studie“, bisher größte randomisierte placebokontrollierte Doppelblindstudie, musste 2002 vorzeitig nach 5,2 Jahren beendet werden, da die zu Beginn der Studie festgelegte Zahl an Brustkrebs-Neuerkrankungen überschritten wurde. Primäres Ziel war es, das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen, Brust- und Dickdarmkrebs sowie Knochenfrakturen bei kontinuierlicher Kombinationstherapie aus 0,625 mg/d konjugierten equinen Estrogenen plus 2,5 mg/d Medroxyprogesteronacetat (CEE/MPA) bei postmenopausalen Frauen (Alter: 50 - 79 Jahre; $n=8506$) über 8,5 Jahre im Vergleich zu einer Placebogruppe ($n=8102$) zu untersuchen. 290 Fälle von Brustkrebs traten während dieser Zeit auf (RR 1,26 [95% CI 1,00;1,59]). Eine signifikante Risikoerhöhung zeigte sich bei Frauen, die bereits vor der „WHI-Studie“ mit Hormonen substituiert worden waren. Frauen ohne vorherige HRT hatten mit 1,06 ebenso ein erhöhtes relatives Risiko (nicht signifikant, Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Rossouw et al. 2002). In Übereinstimmung mit der Reanalyse von 1997 empfehlen Experten nach den neusten Studien die Indikation für eine HRT in erster Linie zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden und Osteoporose bis zu einer Behandlungsdauer von 5 Jahren (Kuhl & Braendle 2004).

Xenoestrogene (Fremdestrogene) sind nichtsteroidale Verbindungen, die sich wie Estrogene oder Antiestrogene verhalten und ähnliche Effekte auslösen können. Da sie den normalen Hormonhaushalt stören können, werden sie auch als "endogene Disruptoren" oder "hormonell aktive Agenzien - HAA" bezeichnet. Dazu gehören z.B. halogenierte Kohlenwasserstoffe oder Dioxine.

Sie sind besonders stabil und konnten sich deshalb über viele Jahre in unserer Nahrungskette anreichern. Ihre chemischen Eigenschaften bewirken eine geringe Plasmaeiweißbindung, eine hohe Affinität zum Estrogenrezeptor und einen verzögerten Abbau, was trotz geringer estrogener Potenz zu einer unphysiologischen Dauerstimulation im Körper führt. Untersuchungen zeigten außerdem, dass sie sich besonders gut im Fettgewebe, wie der weiblichen Brustdrüse, anreichern (Falck et al. 1992).

Für Dioxine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe gilt, dass sie Isoenzyme P450-1A1 des mikrosomalen Cytochrom P450-Monooxygenasesystems induzieren, was zu genotoxischen Metaboliten führt. In Mammaabladaten wurde eine verstärkte P450-1A1-Aktivität nachgewiesen (Kreienberg et al. 2002)

1.1.5.4 Body Mass Index (BMI)

Das Risiko postmenopausaler Frauen für die Entwicklung eines Mammakarzinoms steigt mit zunehmendem BMI bzw. mit dem Gesamtfettgehalt an (Lahmann et al. 2003). Im menschlichen Fettgewebe werden durch das Enzym Aromatase Androgene zu Estrogenen umgewandelt, was dazu führt, dass bei postmenopausalen adipösen Frauen größte Mengen an Estrogen produziert werden, die auf das Brustgewebe einwirken können (Reed & Purohit 2001).

Bei prämenopausalen Frauen sind die Zusammenhänge noch unklar. Studien haben gezeigt, dass zwischen schweren und großen Frauen differenziert werden muss. Prämenopausale mit hohem BMI scheinen ein geringeres Risiko zu haben (Willet et al. 1985), während große prämenopausale Frauen ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs haben sollen (Stoll et al. 1994).

1.1.5.5 Ernährung, Nikotin- und Alkoholkonsum

Regelmäßig bestätigten Studien, dass eine besonders fettreiche Ernährung ein großer Risikofaktor für das Mammakarzinom darstellt. Gemüse, Obst, Getreide, Phytoöstrogene, Isoflavinoide und Antioxidantien haben dagegen einen

protektiven Einfluss (Rock & Denmark-Wahnefried 2002; Djuric et al. 2002). Regelmäßiger Fleischkonsum soll das Brustkrebsrisiko um 85% erhöhen (Hermann et al. 2002).

Bezüglich des Alkoholkonsums zeigte eine kollaborative Reanalyse von Daten aus 53 epidemiologischen Studien, dass das Risiko für Brustkrebs bereits bei einer täglichen Aufnahme von 10 g Alkohol zu einer Erhöhung des relativen Risikos von 7,1% führt. Ob der kausale Zusammenhang zwischen Alkohol und der Entstehung eines Mammakarzinoms im Anstieg des Prolaktinspiegels nach Alkoholenuss (Ginsburg et al. 1995) oder in der Modulation der Geschlechtshormone ab 30 g Ethanol und der dadurch erhöhten bioverfügbaren Gesamttestrogenmenge zu suchen ist, ist bisher unklar (Ginsburg 1999).

Untersuchungen über das Brustkrebsrisikos bei Zigarettenkonsum zeigten, dass das relative Risiko in einer plausiblen Dosis-Wirkungsbeziehung mit dem täglichen Zigarettenkonsum ansteigt (Morabia et al. 1996). Bei 30 Jahre langem Rauchen stellten Bennicke et al. (1995) eine signifikante Erhöhung des Brustkrebsrisikos fest. Des Weiteren liegt bei Raucherinnen das mittlere Erkrankungsalter (59 Jahre) um acht Jahre unter dem von Nichtraucherinnen (67 Jahre) (Bennicke et al. 1995). Andere wiederum konnten keine relevante Assoziation zwischen Rauchen und der Entstehung von Brustkrebs feststellen (Braga et al. 1996).

1.2 Estrogen

Estrogene sind die weiblichen Geschlechtshormone, die in erster Linie für die Differenzierung des weiblichen äußeren und inneren Genitale sowie für die Fortpflanzung verantwortlich sind. Sie haben Einfluss auf Knochendichte, Elastizität der Haut, Leber, retikulo-endotheliales System, Herz-Kreislaufsystem und das körperliche und seelische Wohlbefinden (Miller 1996, Strowitzki & Von Wolff 2002).

Die wachstumsstimulierende Wirkung von Estrogenen ist schon lange bekannt. 1896 zeigte Beatson, dass Estrogenentzug einen Tumorrückgang bei Patientinnen mit Mammatumoren zur Folge hatte (Beatson 1896). Über die Estrogenmetaboliten ist bisher wenig bekannt. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass bestimmte Estradiolmetabolite bei der Brustkrebsentstehung eine Rolle spielen könnten. So wird dem wichtigsten A-Ringmetaboliten, 2-Hydroxyestron (2-OHE), eine antikanzerogene und dem wichtigsten D-Ringmetaboliten, 16 α -Hydroxyestron (16 α -OHE), eine prokanzerogene Wirkung zugeschrieben.

1.2.1 Struktur und Synthese

Estrogene verfügen wie alle Steroidhormone über ein Sterangerüst und einen konstanten aromatischen Phenolring (A-Ring). Der D-Ring kann sich in den Metaboliten in Konformität und Anzahl der OH-Gruppen verändern. Unter den verschiedenen Estrogenen ist das 17 β -Estradiol (E2) das potenteste natürliche Estrogen und kommt hauptsächlich in prämenopausalen Frauen vor. In der Menopause und bei Männern zirkulieren hauptsächlich Estrone und seine Sulfate. Estriol und Estriolglukuronide treten dagegen verstärkt in der Schwangerschaft auf.

Die Synthese der Estrogene, die vom Cholesterol, einem C27-Sterol, ausgeht, beginnt mit der enzymatischen Abspaltung von sechs Kohlenstoffatomen der D-Ring-Seitenkette (siehe Abb. 1). Hierbei entsteht die Grundstruktur (C21) von Progesteron und Cortisol. Anschließend werden zwei weitere Kohlenstoffatome der Seitenkette durch Hydroxylierung abgetrennt, was zur Struktur der Androgene (C19) führt. Im letzten Schritt kommt es mit Hilfe des Enzyms Aromatase durch mehrfache Hydroxylierung zur Abspaltung der Methylgruppe zwischen dem A- und dem B-Ring. Ein aromatischer A-Ring entsteht. Das bevorzugte Substrat der Aromatase ist das Δ^4 -Androstendion. Sie wandelt aber auch sämtliche andere Androgenformen in Estrogene um. Die zentrale Rolle der Aromatase in der Biosynthese der Estrogene hat zur Entwicklung eines spezifischen Inhibitors für dieses Enzym geführt.

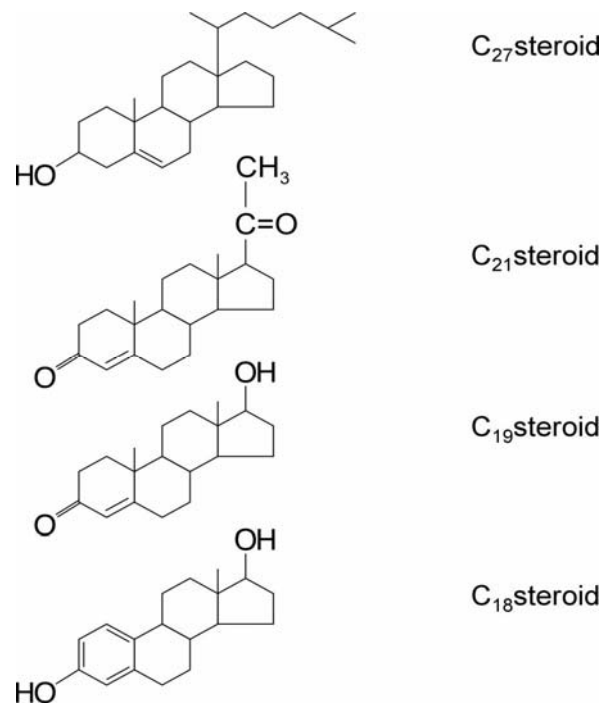


Abb. 1: Estrogenbiosynthese: Durch schrittweise enzymatische Hydroxylierung entstehen ausgehend vom Cholesterin (C₂₇-Steroid) über Progesteron und Cortisol (C₂₁-Steroid) sowie Androgenen (C₁₉-Steroid) schließlich Estrogene (C₁₈-Steroid) (Miller 1996).

1.2.2 Entstehungsort und Menge

Der wichtigste Bildungsort von Estrogenen ist bei der prämenopausalen Frau das Ovar. Abhängig vom Zyklustag werden hier täglich 100-500 µg Estrogen produziert. Sie werden unter LH-Einfluss in den Theca-interna-Zellen über die Vorstufen Cholesterin, Pregnenolon (Pregn-4-en-3,20-Dion) und Androstendion gebildet. Dieses diffundiert in die Granulosazellen, wo es unter dem Einfluss des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) entweder sofort durch die Aromatase in Estron umgewandelt wird oder über einen Zwischenschritt durch die 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase zuerst in Testosteron und anschließend ebenfalls durch die Aromatase in Estradiol überführt wird.

Daneben entstehen Estrogene, bzw. seine androgenen Vorstufen auch im Fettgewebe, in Muskeln, Leber, Nebennierenrinde und bei Schwangeren in der Plazenta. Diese extraglanduläre Estrogensynthese spielt besonders bei der postmenopausalen Frau, deren Ovarien atrophisch sind, eine wichtige Rolle. So

werden aus der Nebennierenrinde freigesetzte Androgene, wie Androstendion und Dehydroepiandrosteron (DHEA), im peripheren Gewebe, wie der Muskulatur und dem Fettgewebe, mit Hilfe der Aromatase zu Estrogenen umgewandelt und in den Körperkreislauf gebracht. Verschiedene Faktoren wie Stress, Übergewicht und Alter beeinflussen sowohl die Produktion von Androgenen in der Nebennierenrinde als auch die Höhe der Aromatase und somit die Höhe der entstehenden Estrogene. Die postmenopausale Frau hat annähernd die gleiche Produktionsrate an Estron wie prämenopausale Frauen in der folliculären Phase (60 μ g/24h zu 70 μ g/24h). Die Estradiolmenge ist hingegen geringer als bei der prämenopausalen Frau (Miller 1996).

	Produktionsrate μ g/24h	Menge ng/100ml
Estradiol		
Prämenopausal		
Follikelphase	65	5.0
Zyklusmitte	400	30.0
Lutealphase	250	17.0
Postmenopausal	15	1.7
Estron		
Prämenopausal		
Follikelphase	70	5.0
Zyklusmitte	250	17.0
Lutealphase	180	11.3
Postmenopausal	60	6.5

Tab. 1: Estradiol- und Estronproduktion. Produktionsrate in μ g/24 h und Menge in ng/100 ml von Estradiol und Estron bei prämenopausalen (differenziert nach Zyklusphasen) und postmenopausalen Frauen (Miller 1996).

Estradiol zirkuliert im Blut meist unkonjugiert, während Estron hauptsächlich als Sulfat vorkommt. Alle Estrogene sind größtenteils an Plasmaproteine wie Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) oder Albumin gebunden und in gebundener Form biologisch inaktiv (Miller 1996). Ihre Ausscheidung erfolgt fast nur konjugiert über die Niere. 65% der Estrogene erscheinen im Urin, 10% werden über die Galle und anschließend über den Stuhl ausgeschieden. Der Rest wird

über den entero-hepatischen Kreislauf wieder ins Blut aufgenommen. (Miller 1996)

1.2.3 Estrogenmetabolismus

Der Estrogenabbau erfolgt hauptsächlich über Oxidation. Ausgehend vom prämenopausal vorherrschenden 17β -Estradiol entsteht durch Oxidation an Position C17 reversibel Estron (siehe Abb. 2). Bei postmenopausalen Frauen und bei Männern ist Estron die dominierende Substanz (Lippert et al. 1999a). Der weitere Abbau verläuft mit unterschiedlichen Enzymsystemen, vorwiegend Cytochrom P450-Enzymen, entweder über die Hydroxylierung des A-Rings oder des D-Rings (Martucci & Fishman 1993). Ob beide Wege kompetitiv zueinander verlaufen, konnte bisher nicht festgestellt werden. Gesichert ist hingegen, dass der A-Ringmetabolismus leichter durch externe Faktoren wie z.B. Sport und Ernährung zu stimulieren ist, während der Abbauweg über den D-Ring schwer beeinflussbar scheint (Lippert et al. 2000). Die Entstehung der Katecholestrogene des A-Ringstoffwechsels, 2-Hydroxyestron und 4-Hydroxyestron, ist ebenso wie die der Hauptmetaboliten des D-Ringmetabolismus, 16α -Hydroxyestron und 16-Estriol, irreversibel. Die weiteren fünf aus dem A-Ring entstehenden, sowie elf zusätzliche D-Ringmetaboliten, spielen mengenmäßig eine eher untergeordnete Rolle (Zhu & Conney 1998). Auch über den B- und C-Ring findet eine Verstoffwechslung statt. Insgesamt entstehen zwanzig verschiedene Metaboliten.

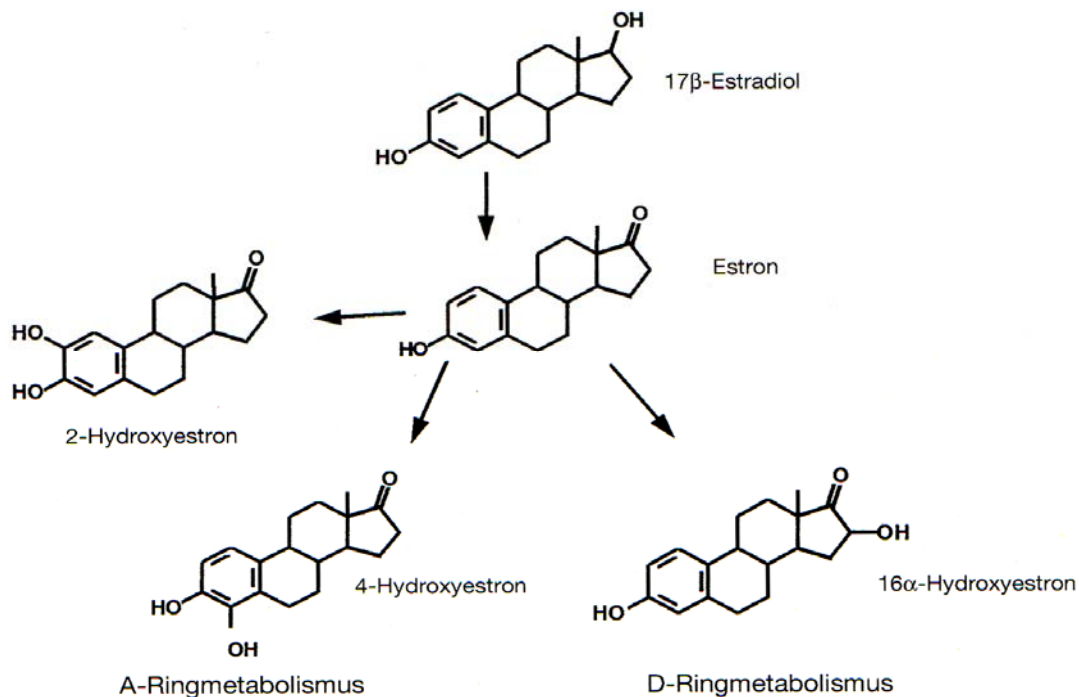


Abb. 2: Estrogenmetabolismus. Darstellung des Estrogenstoffwechsels mit seinen vier Hauptmetaboliten. A-Ringmetaboliten: 2-OHE und 4-OHE. D-Ringmetaboliten: 16α-OHE und 16-Estriol (Lippert et al. 1999b).

1.2.3.1 2-Hydroxyestron (2-OHE)

Studien der 2-OHE-Kinetik haben gezeigt, dass 2-OHE eine Substanz ist, die sehr schnell durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) der Erythrozyten methyliert wird und somit schneller als andere Steroide wieder aus dem Blut verschwindet (Merriam et al. 1980). Die Vermutung liegt daher nahe, dass es sich bei 2-OHE um einen biologisch sehr aktiven Stoff handelt. Demethyliert zeigt es, durch nur geringe Affinität an den Estrogenrezeptor, starke antiestrogene Eigenschaften (Schumacher & Neuhaus 2001). Es wirkt antiproliferativ und verhindert die Angiogenese (Fotsis et al. 1994, Schneider et al. 1984, Seeger et al. 1998). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, bei denen es auf Fibroblasten des Herzens proliferationssteigernd wirkte (Grohe et al. 1996). Diese widersprüchlichen Aussagen könnten darin begründet sein, dass es äußerst schwierig ist, das Methylierungsenzym COMT, das in allen Geweben vorkommt, bei Versuchen, gänzlich außer Kraft zu setzen. Dennoch kommen im Urin wieder größere Mengen an 2-OHE vor, so dass entweder nicht

das gesamte 2-OHE methyliert wird oder vor der Ausscheidung wieder Demethylierungsprozesse stattfinden (Longcope et al. 1983).

Bei in-vitro Versuchen konnte in Zellen durch Zugabe von Omega-3-Fettsäuren, Indol-3-Carbinol, Estron und Tamoxifen ein Anstieg von 2-OHE verzeichnet werden. In vivo führten eine fleischarme, vermehrt auf Gemüse und Getreide basierende Ernährung sowie Sport zu einer Verschiebung zugunsten des A-Ring-Estrogenmetabolismus (Lippert et al. 2000).

1.2.3.2 16 α -Hydroxyestron (16 α -OHE)

16 α -OHE erscheint in etwa der gleichen Größenordnung im Urin wie Estriol. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften zeigt es ein interessantes Bindungsvermögen und hat dadurch gewisse Vorteile gegenüber anderen Estrogenen. Es bindet stabil an Albumin und Erythrozyten. Weniger gut dagegen an SHBG. Dies hat zur Folge, dass 16 α -OHE vermehrt frei und somit in wirksameren Zustand vorkommt als Estradiol (Bucala et al. 1984). Bei Versuchen mit ovariectomierten Mäusen zeigte es eine stärkere estrogene Wirkung als Estradiol (Fishman & Martucci 1980).

Bei Versuchen mit Mamma-Epithelzellen wurde in Primärkulturen von Terminal Duct Lobular Unit (TDLU) Bestimmungen von 16 α -OHE in Niedrig- und Hochrisikopatientinnen durchgeführt, was zum Ergebnis hatte, dass 16 α -OHE bei Hochrisikopatientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe stark erhöht war. Bereits tumorartig veränderte Zellen zeigten ebenso einen starken Anstieg der C16-Hydroxylation (Lippert et al. 1999a).

Diese in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass ein vermehrter Estrogenstoffwechsel über den D-Ring und somit eine vermehrte Bildung von 16 α -OHE, mit einem Tumorwachstum assoziiert ist (Lippert et al. 1999b).

1.2.3.3 2-Hydroxyestron, 16 α -Hydroxyestron und Brustkrebs

Von verschiedenen Arbeitsgruppen, die sich mit der Bedeutung der Estrogenmetaboliten beschäftigen, wurde aufgrund dieser Daten die Hypothese

aufgestellt, dass 2-OHE (A-Ringmetabolismus) das tumorprotektiv wirkende Estrogen und 16 α -OHE (D-Ringmetabolismus) das tumorfördernde Estrogen ist und dass dem Verhältnis dieser beiden Metaboliten ein prädiktiver Wert hinsichtlich estrogen-abhängiger Tumoren zukommen könnte (Bradlow et al. 1996).

In Untersuchungen über beide Hauptabbauwege wurden im Urin von Mammakarzinompatientinnen, im Vergleich zu gesunden Frauen, vermehrt Metaboliten des D-Ringstoffwechsels gefunden. Die Menge an 2-OHE war hingegen erniedrigt. Das gebildete Verhältnis der beiden Metaboliten 2-OHE zu 16 α -OHE war vor allem bei postmenopausalen Frauen zugunsten des 16 α -OHE signifikant verschoben und führte zur Hypothese, dass die vermehrte Verstoffwechslung über den D-Ring und somit die Verkleinerung der Ratio 2-OHE/16 α -OHE zur Karzinomentstehung führen könnte (Kabat et al. 1997). Auch bei Hochrisikopatientinnen (Frauen mit Verwandten ersten Grades mit Brustkrebs) wurden im Brustdrüsengewebe vermehrt 16 α -hydroxylierte Metaboliten gefunden (Osborne et al. 1993).

Die Verschiebung der beiden Abbauwege zugunsten des D-Ringstoffwechsels könnte somit als biologischer Marker für das Krebswachstum vermutet werden.

1.3 Fragestellung

Vor diesem Hintergrund werden in der vorliegenden Studie die Rolle der Estrogenmetaboliten und ihre Bedeutung auf eine Mammakarzinomentstehung untersucht. Während die wachstumsstimulierende Wirkung von Estrogenen schon lange bekannt ist und als therapeutische Konsequenz zu einer antiestrogenen Therapie geführt hat, ist die Bedeutung der Estrogenmetaboliten bei der Krebsentstehung unklar. Als gesichert gilt, dass der Hauptmetabolit aus dem A-Ringstoffwechsel, 2-Hydroxyestron (2-OHE), antiproliferativ wirkt und ihm damit eine tumorprotektive Wirkung zugeschrieben wird (Vanderwalle & Lefebre 1989), während 16 α -Hydroxyestron (16 α -OHE) aus dem D-Ringmetabolismus eine sehr starke wachstumsstimulierende Wirkung hat (Fishmann & Martucci 1980). Eine vermehrte Bildung von 16 α -OHE könnte

begünstigend auf das Zellwachstum wirken. Wenige bisher vorliegende Studien über den Zusammenhang zwischen der Entstehung eines Mammakarzinoms und einer übermäßigen Produktion von 16α -Hydroxyestron zeigten konträre Ergebnisse.

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine Verschiebung des Estrogenmetabolismus zugunsten des D-Ringmetabolismus mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko assoziiert ist. Zusätzlich soll geklärt werden, ob die Ratio $2\text{-OHE}/16\alpha\text{-OHE}$ von externen Faktoren wie dem Menopausenstatus, dem BMI, Rauchen, Hormonen und der Höhe des Estradiols beeinflusst werden kann, bzw. ob diese potentiellen Einflussfaktoren maßgeblich im Zusammenhang mit einer Erniedrigung der Ratio $2\text{-OHE}/16\alpha\text{-OHE}$ stehen.

Hierzu wurde an der Universitätsfrauenklinik Tübingen von Oktober 2001 bis Januar 2003 eine nicht randomisierte Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, bei der das Verhältnis der beiden Estrogenhauptmetaboliten 2-OHE zu $16\alpha\text{-OHE}$ im Urin von Frauen mit gutartigen gynäkologischen Erkrankungen und Frauen mit Mammakarzinom gemessen und miteinander verglichen wurden. Zusätzlich wurden mögliche Einflussfaktoren mittels Fragebogen erfasst und in Bezug auf eine Assoziation mit der Ratio $2\text{-OHE}/16\alpha\text{-OHE}$ getestet. Die Untersuchung umfasste insgesamt 477 Frauen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Zwischen Oktober 2001 und Januar 2003 nahmen insgesamt 477 Frauen an der Tübinger Estrogenmetabolitenstudie teil. Alle Frauen wurden im Rahmen eines stationären Aufenthalts in der Universitätsfrauenklinik Tübingen rekrutiert. Sie wurden schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt und mussten durch Unterschrift ihr informiertes Einverständnis zur Studienteilnahme leisten. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor Studienbeginn vor.

Mit Hilfe eines Fragebogens wurden für die Studie wichtige anamnestische Daten der Teilnehmerinnen erhoben, wie Name, Geburtsjahr, Nationalität, Tag der letzten Regel, Hormon- und Medikamenteneinnahme, Zigaretten- und Alkoholkonsum pro Tag, sowie die Frage nach Stoffwechsel- und anderen Erkrankungen.

Teilnehmen konnten Frauen mit histologisch gesicherter Erstdiagnose eines Mammakarzinoms und Frauen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen. Ausschlusskriterien waren Rezidive oder Zustand nach neoadjuvanter Therapie eines Mammakarzinoms, sowie andere maligne gynäkologische und nichtgynäkologische Vorerkrankungen.

Weitere Ausschlusskriterien waren die dauerhafte Einnahme von Präparaten, die den Estrogenstoffwechsel beeinflussen. So wurden alle Frauen, die regelmäßig Glukokortikoide einnehmen, von der Studie ausgeschlossen. Glukokortikoide und Estrogene verwenden beim Abbau die gleichen Enzymkomplexe, es sind somit unerwünschte Wechselwirkungen zu erwarten. Zudem können bei dauerhafter Einnahme Leberschäden nicht ausgeschlossen werden, so dass nicht von einem normalen Stoffwechsel auszugehen ist. Des Weiteren waren Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 und 2, chronisch entzündliche Erkrankungen sowie System- und Autoimmunerkrankungen Ausschlusskriterien.

Um einen normalen Estrogenstoffwechsel voraussetzen zu können, durften Frauen mit Leberschäden (z.B. Leberzirrhose) und Frauen mit chronischen Nierenerkrankungen ebenfalls nicht an der Studie teilnehmen.

Die regelmäßige Einnahme von Thyroxin bei Hypothyreose war kein Ausschlusskriterium, da bei normaler Thyroxin-Dosierung nicht mit einer Interaktion mit dem Estrogenstoffwechsel zu rechnen ist (Michnovicz & Galbraith 1990).

Es durften keine Schwangeren, sowie Frauen in Stimulationsbehandlung zur Follikelreifung an der Studie teilnehmen.

Erlaubt war die Einnahme von Hormonen als Verhütungsmittel oder als Ersatztherapie peri- bzw. postmenopausal, denn wie aus früheren Studien bekannt, beeinflusst die Menge an Estrogen nicht die Ausscheidung eines bestimmten Estrogenendprodukts, sondern nur deren Gesamtmenge (Lippert et al. 1998)

2.1.2 Gruppenbildung

Es wurden zwei Gruppen gebildet. In der „Karzinomgruppe“ wurden 156 Frauen mit malignen Brustkrankungen (invasiv lobulärem, duktalem oder tubulärem Mammakarzinom und deren Vorstufen CLIS und DCIS) zusammengefasst und mit 321 Frauen mit benignen gynäkologischen Diagnosen („Kontrollgruppe“) verglichen. Die Vielzahl der benignen Diagnosen musste nochmals, aufgrund ihrer unterschiedlichen Genese, in Untergruppen (Kategorien) eingeteilt werden. So kam es zur Differenzierung der benignen Diagnosen in drei Kategorien - estrogenabhängige, estrogenunabhängige und benigne Brustkrankungen, die dem Ziel dienen sollte, die Kategorien getrennt bezüglich ihrer Estrogenmetaboliten zu vergleichen. Würden sich die Kategorien untereinander bezüglich der Menge an 2-OHE und 16 α -OHE unterscheiden, müssten sie jeweils getrennt mit der Karzinomgruppe verglichen werden.

Estrogenabhängig	Estrogenunabhängig	Benigne Brusterkrankungen
Uterus myomatosus 76 Endometriose 19 Endometriumhyperplasie 6	Altersentspr. Uterus 38 Ovarialzysten 31 Corpuspolyp 18 CIN 1,2,3 12 Stressinkontinenz 17 Leukoplakie der Vagina 2 Descensus uteri 16 Ovarialfibrom 3 Primäre Sterilität 3 Sekundäre Sterilität 3 Cervixschleimhautpolyp 5 Verwachsungsbauch 7 Peritoneale Zyste 3 Abszess 3 Vaginalzyste 2	Fibrös-zyst. Mastopathie 34 Fibroadenom 14 Duktale Hyperplasie 3 Milchgangspapillom 3 Fibrose der Haut 3

Tab. 2: Diagnosen Kontrollgruppe. Benigne Diagnosen der Kontrollgruppe aufgeteilt in drei Kategorien.

Art des Karzinoms	Differenzierung und Karzinomanzahl
Invasiv duktales Karzinome	Invasiv duktal 52 Invasiv duktal + DCIS 22 Invasiv duktal + DCIS + CLIS 1
Invasiv lobuläre Karzinome	Invasiv lobulär 30 Invasiv lobulär + CLIS 3 Invasiv lobulär + DCIS 4 Invasiv lobulär + CLIS + DCIS 1
Invasiv tubuläre Karzinome	Invasiv tubulo-lobulär 2 Invasiv tubulär + DCIS 2 Invasiv tubulär 1
Invasiv duktulo-lobuläre Karzinome	Invasiv duktulo-lobulär 13 Invasiv duktulo-lobulär + DCIS 3
Verschiedene Karzinome	Mucinöses Karzinom 1 Medulläres Karzinom 2 Granulatzelltumor 1
Carcinoma in situ	DCIS 15 CLIS 1 DCIS + CLIS 1 DCIS + M. Paget 1

Tab. 3: Diagnosen Karzinomgruppe. Darstellung der nach histologischen Gesichtspunkten differenzierten Mammakarzinome innerhalb der Karzinomgruppe.

Gemäß der Stadieneinteilung von malignen Tumoren TNM der „Union International Contre le Cancer“ (UICC 1993) wird die Ausdehnung des Primärtumors T, das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen N und Fernmetastasen M beschrieben. Durch Hinzufügen von Zahlen wird die anatomische Ausdehnung des malignen Prozesses angegeben.

T-Primärtumor:

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden.

T0 Kein Anhalt für Primärtumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung

T1a 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung

T1b >0,5 cm bis max. 1 cm in größter Ausdehnung

T1c >1 cm bis max. 2 cm in größter Ausdehnung

T2 Tumor >2 cm bis max. 5 cm in größter Ausdehnung

T3 Tumor >5 cm in größter Ausdehnung

T4 Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand (Rippen, Interkostalmuskeln, Serratusmuskel, nicht jedoch die Pectoralismuskulatur) oder Haut (UICC 1993)

Tumorgröße	pTis	pT1a	pT1b	pT1c	pT2	pT3	pT4	pTx
Anzahl	18	10	22	51	43	3	2	1

Tab. 4: Tumorgröße. Tumorstadien innerhalb der Kontrollgruppe dargestellt anhand der Ausdehnung des Primärtumors gemäß der TNM-Klassifikation

Achtzehn Frauen zeigten pathologisch ein In-Situ-Karzinom (11,5%). 6,4% der Erkrankten hatten einen Tumor <0,5 cm. Bei 14,1% besaß der Tumor eine Größe zwischen 0,6 und 1,0 cm. Die meisten Tumoren (32,7%) wurden mit einer Größe zwischen 1,1 und 2,0 cm diagnostiziert. Bei 27,6% hatte der Tumor bereits eine Größe bis max. 5 cm. Bei nur 3,2% der Frauen zeigte der Tumor eine Ausdehnung von >5,1 cm oder war bereits in umliegende Strukturen eingewachsen. Bei 4,5% der Frauen war die Ausdehnung des Primärtumors unklar.

Bei 88 Karzinompatientinnen waren die regionären Lymphknoten frei von Tumorzellen (pN0). 48 Frauen wiesen einen oder mehrere befallene Lymphknoten auf (pN1-pN3). Bei zwanzig Frauen war der Lymphknotenbefall unklar.

Das Grading dient der Differenzierung von Tumoren bezüglich ihrer Malignität. Es erfolgt mikroskopisch am formalinfixierten Gewebe. Dabei werden tubuläre Differenzierung, Zellkernpolymorphie und Mitoseanzahl beurteilt und gemäß einem Punktesystem in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Die Summe der Punkte ergibt drei Gradingkategorien: gut differenziertes Karzinom G1, mäßig differenziertes Karzinom G2, wenig differenziertes Karzinom G3 (Elston & Ellis 1991). In der vorliegenden Studie waren rund zwei Drittel der Karzinome mäßig differenziert. Die Anzahl der schlecht differenzierten Karzinome war dreimal so hoch wie die der gut differenzierten.

Grading	1	2	3	unbekannt
Anzahl	9	109	26	12

Tab. 5: Grading. Zahl der Karzinome, differenziert in drei unterschiedliche Schweregrade (in zwölf Fällen war das Grading unbekannt).

Nach immunhistochemischer Untersuchung zeigte sich, dass 80% der Karzinome einen positiven Hormonrezeptorstatus aufwiesen. Dies bedeutet, dass entweder der Estrogenrezeptor (ER+PR-), der Progesteronrezeptor (ER-PR+) oder beide (ER+PR+) im Tumor vorhanden sind. In 23 Fällen waren beide Hormonrezeptoren negativ (ER-PR-). In acht Fällen war der Hormonrezeptorstatus nicht ermittelbar.

Eine Überexpression (3+) des HER2/neu-Rezeptors fand sich in 32 Karzinomen. Sechs zeigten immunhistochemisch eine Expression vom Schweregrad 2+. Die Ergebnisse der anschließenden FISH-Analyse standen zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht fest. In 109 Fällen konnte keine Überexpression (neg.) von HER2/neu nachgewiesen werden. Bei neun Karzinomen war der HER2/neu-Rezeptorstatus nicht ermittelbar.

Hormonrezeptor	ER+PR+	ER+PR-	ER-PR+	ER-PR-	unbekannt
Anzahl	98	21	6	23	8
HER2/neu	3+	Neg.	2+	unbekannt	
Anzahl	32	109	6	9	

Tab. 6: Rezeptorstatus. Eigenschaften (+/=pos./neg.) der Karzinome bzgl. der Estrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) sowie Vorhandensein (3+) und Fehlen (neg.) bzw. unvollständiger Analyse (2+ ohne FISH-Analyse) des HER2/neu-Rezeptors.

2.1.3 Erfassung wichtiger Einflussgrößen

2.1.3.1 Alter und Menopausenstatus

Das mittlere Alter der Brustkrebspatientinnen betrug 58 Jahre (Range 29 - 87), das der Kontrollpatientinnen 47 Jahre (Range 18 - 78). Aufgrund der Angaben im Fragebogen bezüglich des Datums der letzten Regel, wurden die Frauen gemäß ihres Menopausenstatus in prä- und postmenopausale Frauen eingeteilt. Bei unklaren Angaben bezüglich der Regel bei perimenopausalen Frauen wurde aus dem Serum der Frauen das FSH im Labor mittels Enzymimmunoassay bestimmt. War dies über 40 U/ml erhöht, wurde die Frau entsprechend als postmenopausal kategorisiert. Darüber hinaus wurden Frauen ab dem 56. Lebensjahr generell als postmenopausal angesehen. Die Anzahl der postmenopausalen Frauen waren in der Karzinomgruppe (n=115) und der Kontrollgruppe (n=110) annähernd ausgeglichen. Prämenopausale Frauen gab es in der Karzinomgruppe 41 und in der gesunden Vergleichsgruppe 211.

2.1.3.2 Hormoneinnahme

Die Frauen wurden nach regelmäßiger Hormoneinnahme während der letzten drei Monate befragt. Es sollte die Art des Präparats, sowie die Einnahmedauer und die Dosierung angegeben werden. Da Einnahmedauer und Dosierung zwei sehr heterogen zu beantwortende Faktoren sind, konnten sie nicht mit in die

Auswertung einfließen. Die gewonnenen Informationen reduzieren sich somit auf die Hormoneinnahme im Allgemeinen und die Art des Präparats.

2.1.3.3 Rauchen und Alkohol

Ebenso wurden mittels Fragebogen die Rauch- und Trinkgewohnheiten der Patientinnen erfasst. Die Fragen nach Häufigkeit der Alkoholkonsums (täglich, wöchentlich oder monatlich) und nach der Anzahl der Zigaretten (täglich) waren offen formuliert. Frauen mit einem täglichen Alkoholkonsum von mehr als 40 g wurden von der Studie ausgeschlossen.

Bei der Erfassung der Rauchgewohnheiten wurde zwischen starken und weniger starken Rauchern unterschieden. Schwache Raucher wurden bis zehn Zigaretten/Tag definiert. Starke Raucher ab mehr als zehn Zigaretten/Tag.

2.1.3.4 BMI

Der BMI wurde aufgrund von Größe und Gewicht der Patientinnen berechnet.

2.1.3.5 Nationalität

Das Patientenkollektiv bestand fast ausschließlich aus Kaukasierinnen. Ausnahmen bildeten zwei Frauen aus Ostasien und eine Brasilianerin.

2.1.4 Studiendesign

Bei der stationären Aufnahme der Patientinnen wurde ihnen mit der routinemäßigen Blutabnahme zusätzlich 7,5 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen abgenommen. Anschließend wurde das Blut zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20 °C eingefroren. Das Serum diente der Bestimmung von 17 β -Estradiol (E2) und FSH.

Für die Bestimmung der Estrogenmetaboliten musste jede Frau präoperativ 20 ml Morgenurin (Mittelstrahl) abgeben. Um die Metaboliten zu stabilisieren, wurde innerhalb von zwei Stunden nach Probengewinnung 1 mg

Ascarbonsäure pro 1 ml Urin zugesetzt und anschließend bei -20 °C eingefroren.

Eine zusätzliche Untersuchung der Frauen musste nicht durchgeführt werden. Mit der Anamnese, dem Ausfüllen des Fragebogens und der unterschriebenen Einwilligung waren sämtliche Bedingungen zur Teilnahme an der Studie erfüllt. Ziel war es, eine 150 Frauen umfassende Karzinomgruppe mit doppelt so vielen gesunden Kontrollpatientinnen zu vergleichen. Dies wurde innerhalb von fünfzehn Monaten erreicht.

2.2 Methode

Die Messung sämtlicher Parameter erfolgte im Labor der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie und Menopausenforschung der Universitätsfrauenklinik in Tübingen.

2.2.1 17 β -Estradiol- und FSH-Bestimmung

17 β -Estradiol und FSH wurden im Rahmen des Routinelabors mittels Enzymimmunoassay bestimmt.

2.2.2 Enzymimmunoassay

Die gesammelten Urinproben wurden mit dem ESTRAMETTM Urinary Estrogen Metabolite Kit, einem speziellen Enzymimmunoassay für 2- und 16 α -Hydroxyestron, der IMMUNA CARE Corporation (Bethlehem, PA 18015 USA), gemessen (IMMUNA CARE Corporation 2002).

Bei diesem kompetitiv einphasigen Enzymimmunoassay (EIA) ist der Antikörper an die feste Phase gebunden, während das Antigen (Estrogenmetabolit) an ein Enzym gekoppelt ist. Im Test wird das Binden des Antikörpers an das Antigen-Enzym-Gemisch durch freies Antigen verhindert. Da nur eine begrenzte Anzahl an antikörperbindenden Stellen verfügbar ist, ist die Enzymaktivität, die an die feste Phase gebunden ist, bei Vorhandensein von freiem Antigen erniedrigt.

Wird Enzym-Substrat zur gewaschenen flüssigen Phase dazugegeben, ist die Enzymproduktkonzentration umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Antigens.

In den derzeitigen Assay Kits werden monoklonale Antikörper der Estrogenmetaboliten direkt an die feste Phase gebunden. Die Estrogenmetaboliten werden mit dem Enzym „alkalische Phosphatase“ konjugiert.

Die Phase II-Metaboliten von 2-OHE und 16 α -OHE, die im Urin vorkommen, sind hauptsächlich 3-Glukuronide und 3- oder 3,16 α -Glukuronide. Um von den monoklonalen Antikörpern im EIA Kit erkannt zu werden, müssen die

Glukuronide von Zucker und Sulfaten befreit werden. Diese Dekonjugation geschieht mit Hilfe eines Enzymgemisches aus β -Glukuronidase und Arylsulphatase, die aus der Schnecke „*Helix pomatio*“ isoliert wurden. Anschließend wird das Enzymverdaute neutralisiert und kann direkt für den Assay verwendet werden.

Diese neue Methode bringt wesentlich genauere Ergebnisse als die bisherige Methode der Gaschromatographie mit Massenspektroskopie (GC/MS) (Adlercreutz et al. 1975).

Die Sensitivität der 2-OHE und 16 α -OHE Assays beträgt nach einer Verdünnung des Urins von 1:40 ca. 0,20 ng/ml von im Urin vorhandenem 2-OHE bzw. 16 α -OHE. Die Inkubationszeit des Assays beträgt ca. drei Stunden, so dass von einer Gesamtdauer des Tests von sechs Stunden ausgegangen werden kann.

Urinproben von prämenopausalen Frauen müssen vor dem Assaystart auf 1:4 verdünnt werden. Anschließend multipliziert man das Ergebnis wieder mit vier, um den unverdünnten Wert zu erhalten.

In der folgenden Tabelle sind die Normwerte von prämenopausalen Frauen, die keine hormonelle Kontrazeption betreiben in ng/ml Kreatinin des Urins und von postmenopausalen Frauen mit und ohne HRT angegeben.

Prämenopausal	Alter	2-OHE/16 α -OHE-Ratio
follikulär	25,1	1,65
ovulatorisch	24,5	1,67
luteal	15,4	1,45
Postmenopausal		
ohne HRT	43,5	15,3
mit HRT	58,8	2,77

Tab. 7: Zusammenfassung von 2/16 α -OHE-Messungen unabhängiger Forschungslabors, differenziert nach unterschiedlichen Zyklusstadien innerhalb einer Gruppe prämenopausaler und nach HRT bzw. ohne HRT innerhalb einer Gruppe postmenopausaler Frauen, jeweils mit Angabe des Altersmedians (IMMUNA CARE Corporation 2002).

2.2.2.1 Vorgehensweise

- ✓ die mit Ascarbonsäure bearbeiteten und eingefrorenen Urinproben werden bei Raumtemperatur aufgetaut, nochmals gemischt und zentrifugiert, so dass man gleichmäßig klare Proben erhält.
- ✓ Proben prämenopausaler Frauen werden 1:4 (ein Teil Urin und drei Teile spezielle Verdünnungslösung) verdünnt.
- ✓ Anschließend werden die verschiedenen Standards (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10 und 15 ng/ml) von 2-OHE und 16 α -OHE und die Urinproben in die vorbereiteten Eppendorfgefäße pipettiert.
- ✓ Dann werden in jedes Gefäß 190 μ l der dekonjugierenden Enzyme gegeben und sorgfältig gemischt. Somit entstehen 1:20 Verdünnungen der Standards und der Proben.
- ✓ Die versiegelten Proben werden nun bei Raumtemperatur (20-22° C) für zwei Stunden inkubiert. Dabei ist wichtig, dass konstant die gleiche Temperatur vorherrscht.
- ✓ Nach zwei Stunden werden die nun dekonjugierten Proben durch Hinzufügen von 200 μ l eines Neutralisationspuffers in jedes Gefäß neutralisiert. Mischen der Proben und falls die sofortige Weiterverarbeitung nicht möglich ist, müssen die Gefäße wieder versiegelt werden. Proben und Standards sind nun in einem Verhältnis von 1:40 verdünnt. Innerhalb einer halben Stunde sollten die Proben weiterverarbeitet werden.
- ✓ Es folgt das mindestens sechsmalige Waschen der 2-OHE und 16 α -OHE-Platten mit Trispuffer Saline (TBS) pH 7,4 und 0,05% Tween 20. TBS Puffer besteht aus 10 mM Tris pH 7,4 und 150 mM NaCl.
- ✓ Anschließend werden 7,5 μ l der neutralisierten und 1:40 verdünnten Standards und Proben in die entsprechenden Wells der gewaschenen 2-OHE und 16 α -OHE-Platten pipettiert.
- ✓ Vorbereitung von 2-OHE: Alkalische Phosphatase wird gemäß den Angaben in der Gebrauchsanweisung mit 2-OHE konjugierter Pufferlösung gemischt und sofort auf die 2-OHE-Platten gegeben. Eine Minute lang mischen.

- ✓ Somit erhält jedes 75 µl dekonjugiertes und neutralisiertes 2-OHE-enthaltende Gefäß zusätzlich 75 µl alkalische Phosphatase.
- ✓ Vorbereitung von 16α-OHE: Alkalische Phosphatase wird gemäß den Anweisungen der Gebrauchsanweisung mit 16α-OHE-Pufferlösung verdünnt.
- ✓ Anschließend werden 75 µl der alkalischen Phosphatase in die bereits 75 µl 16α-OHE enthaltenden Gefäße gebracht und anschließend gemischt.
- ✓ Die Platten werden nun wieder für drei Stunden verschlossen und bei Raumtemperatur (20-22 °C) inkubiert.
- ✓ Nach drei Stunden werden die Platten sechsmal mit TBS (pH 7,4)/0,05% Tween 20 gewaschen, abgeschüttet und getrocknet.
- ✓ Als letzter Schritt werden den gewaschenen Platten 100 µl AP-Enzymsubstratlösung (pNPP, Paranitrophenyl Phosphat) so schnell wie möglich zugegeben.
- ✓ Auswertung: Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde, Bestimmung der Extinktion mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm (IMMUNA CARE Corporation 2002).

2.2.3 Statistische Auswertung

2.2.3.1 Allgemeines

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms JMP 5.0 und wurde am Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen durchgeführt.

Logarithmieren des Quotienten 2-OHE/16α-OHE erzielte normal verteilte Daten und ermöglichte die im Anschluss beschriebenen Tests. Das Signifikanzniveau betrug 0,05.

2.2.3.2 Tukey-Kramer-Test

Anhand des Tukey-Kramer-Tests wird geprüft, ob sich verschiedene Untergruppen bezüglich eines Merkmals differenzieren. In dieser Studie wird er bei der Untersuchung der drei Kategorien (estrogenabhängige, estrogenunabhängige Erkrankungen und benigne Brusterkrankungen) sowie bei der Untersuchung des Verhaltens von Karzinomen mit unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus in Bezug auf die log Ratio angewandt. Stellen sich im Tukey-Kramer-Test keine Unterschiede zwischen den Gruppen heraus, deutet dies auf Homogenität der Gruppen bezüglich des Merkmals hin.

2.2.3.3 t-Test

Dieser Test dient der Überprüfung, ob sich zwei Gruppen bezüglich eines stetigen Merkmals voneinander unterscheiden, z.B. Karzinome mit unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus hinsichtlich ihrer log Ratio. Ist dies nicht der Fall, können sie als eine bezüglich der log Ratio homogene Gruppe betrachtet werden.

Unterscheiden sich die zu untersuchenden Gruppen in ihrer Varianz, so verwendet man stattdessen einen Welch-Test.

2.2.3.4 Varianzanalyse

Für die eigentliche statistische Auswertung werden Varianzanalysen eingesetzt, so genannte multiple Regressionsanalysen.

Die Komplexität der Estrogenmetabolitenstudie fordert ein mehrdimensionales Modell, bei dem alle Einflussfaktoren gleichberechtigt in Bezug auf eine Zielvariable berücksichtigt werden. Bei sechs Einflussgrößen, wie es bei unserer Untersuchung der Fall ist, gibt es kein darstellbares Äquivalent zu einer Geraden bei zwei Ordinaten oder einer Ebene bei drei Ordinaten. Das Programm berechnet deshalb Schätzwerte für die log Ratio; eine Rücktransformation durch Delogarithmieren ist möglich. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine genaue Differenzierung zwischen den verschiedenen Einflussfaktoren und wird deshalb gerne bei solcher Art Studien angewandt.

3 Ergebnis

3.1 Ergebnisse der Merkmalerfassung

3.1.1 Altersverteilung

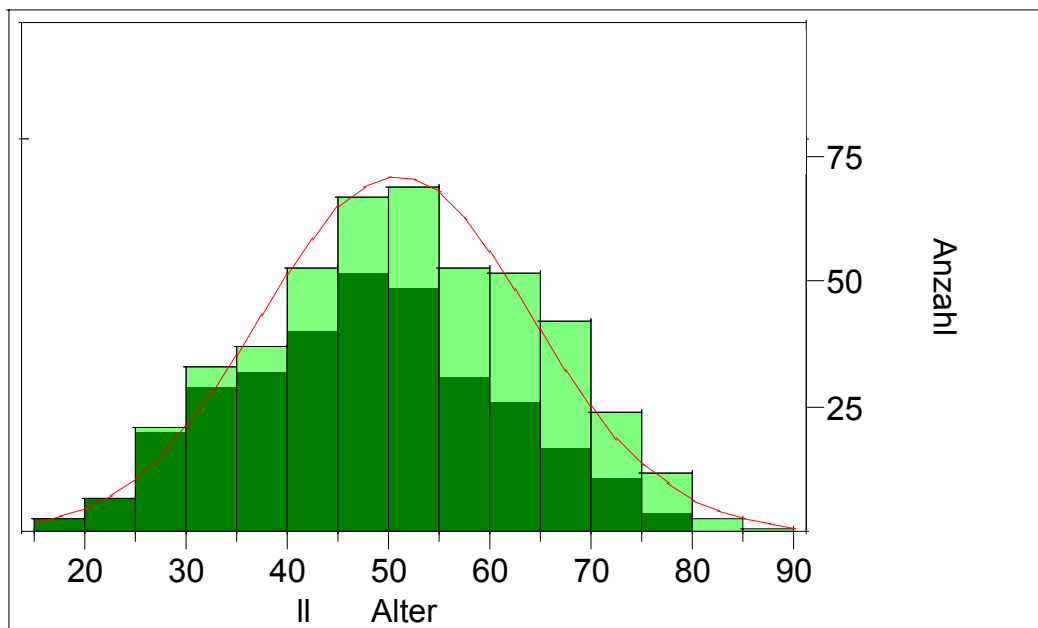


Abb. 3: Altersverteilung der teilnehmenden Frauen: Kontrollgruppe (dunkelgrün), Karzinomgruppe (hellgrün) (Max.: 87, Min.: 18, Median: 51, arithmetischer Mittelwert: 50,8).

Das Altersmittel der teilnehmenden Frauen beträgt 50,8 Jahre (95% CI [49,6; 52,0]). Abbildung 3 zeigt das Verhältnis von Karzinompatientinnen (hellgrün) und Kontrollgruppe (dunkelgrün) bezogen auf das Alter, welches in 5-Jahresaltersgruppen dargestellt ist. Es verdeutlicht, dass im untersuchten Kollektiv ab einem Alter von ungefähr 60 Jahren die Anzahl der Karzinompatientinnen die der Kontrollgruppe übersteigt.

Auch Abbildung 4 macht deutlich, wie sich der Anteil der Karzinompatientinnen gegenüber der Kontrollgruppe innerhalb der Studiengruppe mit dem Alter verändert und ab ca. 60 Jahren stetig zunimmt.

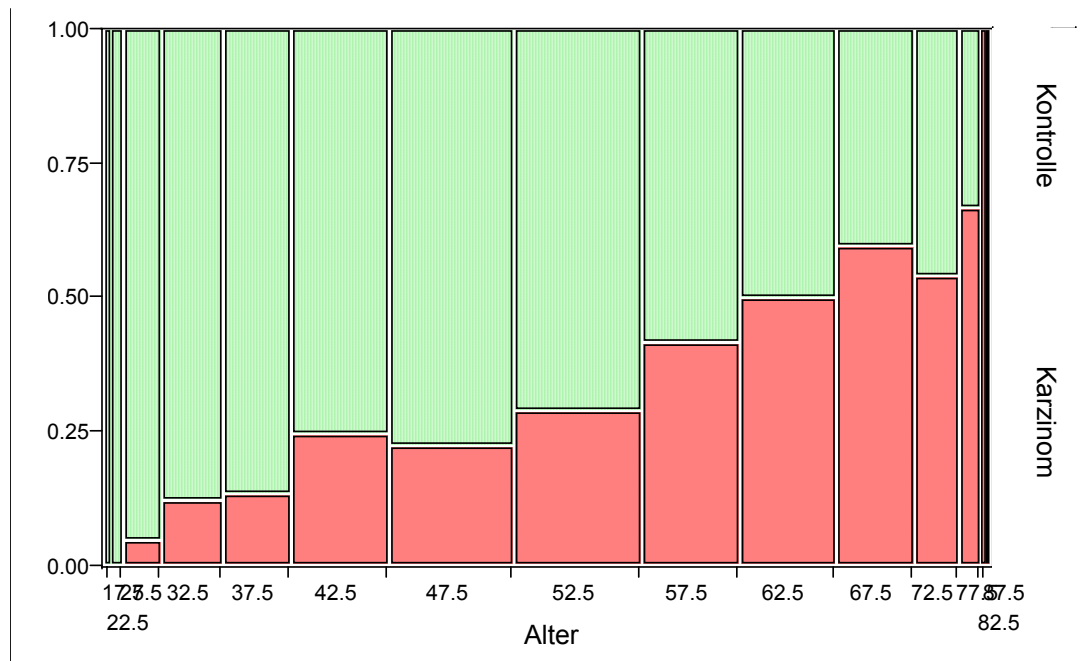


Abb. 4: Verhältnis von Karzinom- (rot) zu Kontrollgruppe (grün) bezogen auf das Alter der Teilnehmenden, dargestellt anhand einer Einteilung in 5-Jahresaltersgruppen.

Altersgruppe	Karzinom	Kontrolle	Gesamt
17,5	0	3	3
22,5	0	7	7
27,5	1	20	21
32,5	4	29	33
37,5	5	32	37
42,5	13	40	53
47,5	15	52	67
52,2	20	49	69
57,5	22	31	53
62,5	26	26	52
67,5	25	17	42
72,5	13	11	24
77,5	8	4	12
82,5	3	0	3
87,5	1	0	1
Gesamt	156	321	477

Tab. 8: Anzahl Karzinomgruppe und Kontrollgruppe dargestellt in 5-Jahresaltersgruppen.

3.1.2 Hormoneinnahme

Die Frage nach regelmäßiger Hormoneinnahme während der letzten vier Wochen bejahten insgesamt 171 Frauen (61 Karzinompatientinnen und 110 Kontrollfrauen). In der Karzinomgruppe dominierte, aufgrund der Altersstruktur der Patientinnen, die Einnahme von Hormonersatzpräparaten (n=52) gegenüber der hormonellen Verhütung (n=9), während in der Kontrollgruppe der Einsatz von hormoneller Kontrazeption (n=45) und Hormonersatztherapie (n=65) ungefähr ausgeglichen war.

	Hormoneinnahme gesamt	Kontrazeptiva	HRT
Kontrolle (n=321)	110 (34%)	45 (14%)	65 (20%)
Karzinom (n=156)	61 (40%)	9 (5,8%)	52 (33%)
Gesamt (n=477)	171 (35%)	54 (11%)	116 (24%)

Tab. 9: Hormoneinnahme. Anzahl der Teilnehmerinnen, die regelmäßig Hormone einnehmen, differenziert nach Kontrazeptiva und HRT mit prozentualen Angaben, bezogen auf die Gesamtzahl bzw. die Anzahl der Kontroll- und Karzinompatientinnen.

3.1.3 Rauchen

Ein Viertel der Studienteilnehmerinnen (24,9%) raucht regelmäßig. Die Differenzierung nach starken (mindestens zehn Zigaretten/Tag) und weniger starken Raucherinnen (ab einer Zigarette/Tag) ergab, dass 87 Frauen täglich mehr als zehn Zigaretten rauchten. Nur 32 blieben mit ihrem Verbrauch unter zehn Zigaretten/Tag.

	Raucher gesamt	starke Raucher ab 10 Zig./Tag	schwache Raucher ab 1 Zig./Tag
Kontrolle (n=321)	93 (29%)	66 (21%)	27 (8,4%)
Karzinom (n=156)	26 (17%)	21 (14%)	5 (3,2%)
Gesamt (n=477)	119 (25%)	87 (18%)	32 (6,7%)

Tab. 10: Rauchen. Anzahl der Raucherinnen, differenziert nach starken und schwachen mit prozentualen Angaben bezogen auf die Gesamtteilnehmerzahl bzw. auf Kontroll- und Karzinompatientinnen.

Da davon auszugehen ist, dass selbst geringste Mengen an Nikotin und Tabakbestandteilen den Stoffwechsel beeinflussen können, wurde bei der statistischen Auswertung keine Differenzierung in Untergruppen bezüglich der Zigarettenmenge angestellt, sondern alle Raucher in eine Gruppe zusammengefasst. Die Bedingung für diesen Einflussfaktor lautete also nur noch „Rauchen - ja oder nein“.

3.1.4 Alkoholkonsum

In Tabelle 11 wird der Alkoholkonsum der Studienteilnehmerinnen dargestellt. Die Beurteilung des Alkoholkonsums gestaltet sich immer sehr schwierig, da es den Befragten meist schwer fällt, ihn in ein regelmäßiges Schema einzuordnen. Ebenso schwierig stellt sich die epidemiologische und statistische Auswertung aufgrund der vielfältigen Trinkgewohnheiten dar, weshalb beschlossen wurde, Alkohol als Einflussfaktor in die Auswertung nicht einfließen zu lassen.

Alkoholkonsum	Kontrollgruppe	Karzinomgruppe	Gesamt
1x tgl.	32	16	48
2 Gl. Wein tgl.	6	4	10
5x/Woche	2	1	3
4x/Woche	14	2	16
3x/Woche	15	9	24
2x/Woche	30	10	40
1x/Woche	30	16	46
2x/Monat u. weniger	32	8	40
gelegentlich	18	15	33

Tab. 11: Alkoholkonsum der Studienteilnehmerinnen differenziert nach verschiedenen Regelmäßigkeiten.

3.1.5 BMI

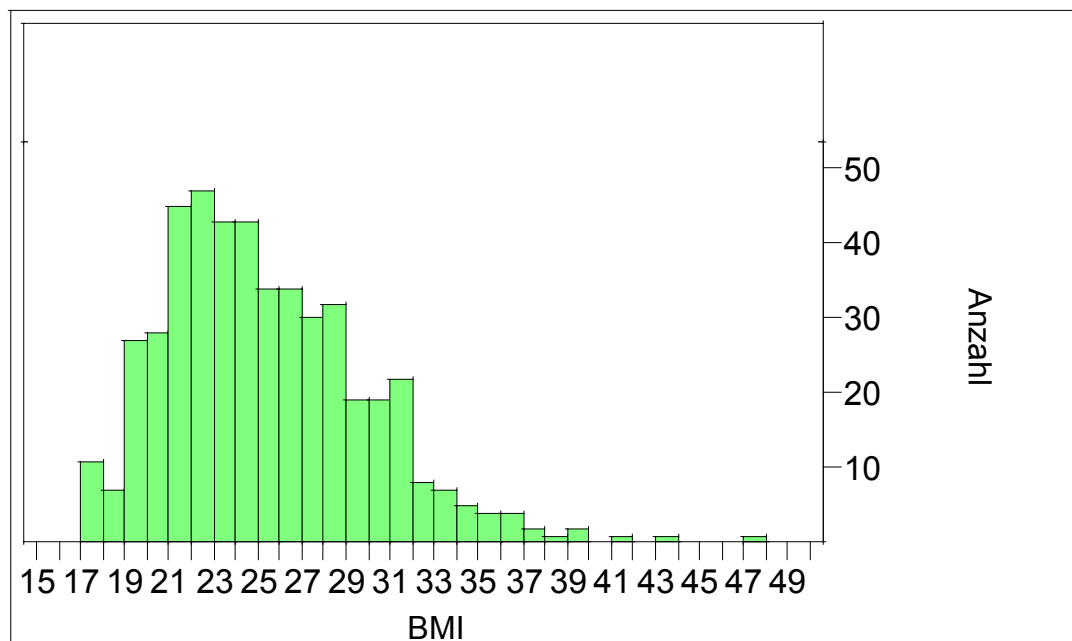


Abb. 5: BMI-Verteilung der Studienteilnehmerinnen (Median: 24,80, Mittelwert: 25,42).

Der Body Mass Index (BMI) dient indirekt zur Abschätzung der Fettmasse. Laut Gewichtsklassifikation der WHO besteht bei einem BMI zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2 Normalgewicht. Übergewicht entspricht einem BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$. Bis 29,9 kg/m^2 besteht Präadipositas, zwischen 30,0 und 34,9 kg/m^2 Adipositas Grad I, bis 39,9 kg/m^2 Grad II und ab einem BMI von 40 kg/m^2 Adipositas Grad III. Bei einem Mittelwert von 25,42 kg/m^2 kann man sagen, dass es sich bei unserem Studienkollektiv um Normalgewichtige handelt. Ein Großteil der Frauen befindet sich im BMI-Bereich von 21 und 29 kg/m^2 .

Logarithmieren des BMIs erzielte keine Normalverteilung. Die Vermutung liegt nahe, dass die zwei Gipfel, dargestellt in Abbildung 6, zwei Gruppen entsprechen, die sich bezüglich des BMI unterschiedlich verhalten.

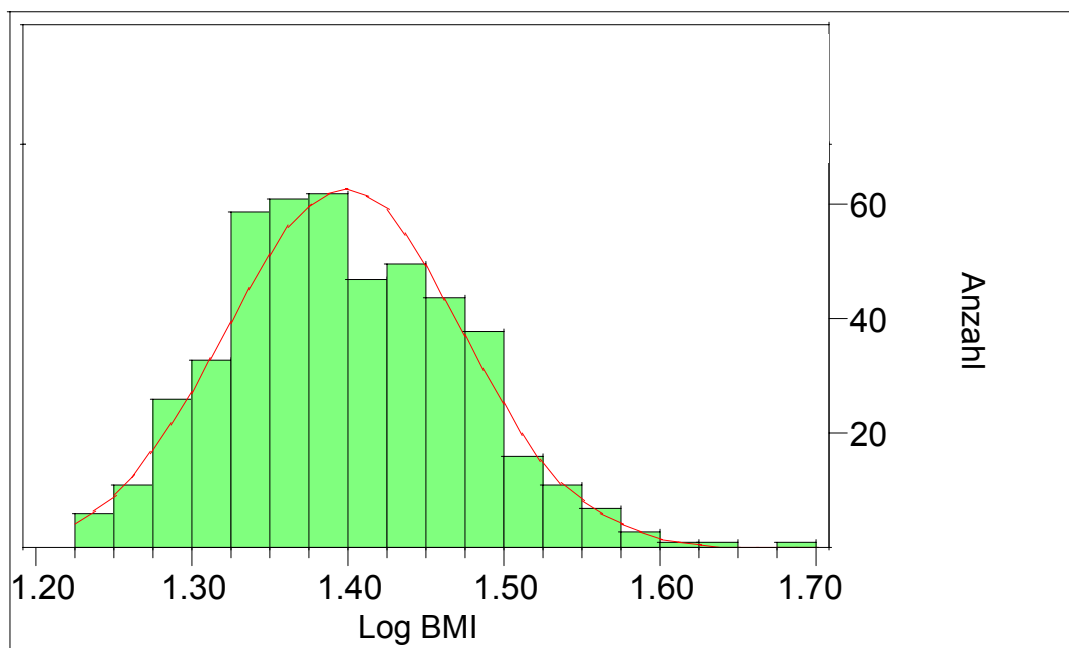


Abb. 6: Verteilung des log BMI der Studienteilnehmerinnen. Mittelwert: 1,398 (95% CI [0,01007;-0,01898]).

Betrachtet man mit Hilfe eines Welch-Tests prä- und postmenopausale Frauen bezüglich des BMI getrennt voneinander (Abb. 7), so zeigt sich, dass postmenopausale einen signifikant ($p < 0.0001$) erhöhten BMI im Vergleich zu prämenopausalen aufweisen. Dies könnte die Zweigipfligkeit der Kurve in Abbildung 6 erklären.

	Mittel log BMI (BMI)	SE	95% CI
Prä	1,38 (23,99 kg/m ²)	0,0046	1,37;1,39
Post	1,42 (26,12 kg/m ²)	0,0049	1,41;1,43

Tab. 12: BMI. Mittlerer log BMI (BMI) mit Standardfehler (SE) und 95% CI bei prä- und postmenopausalen Frauen.

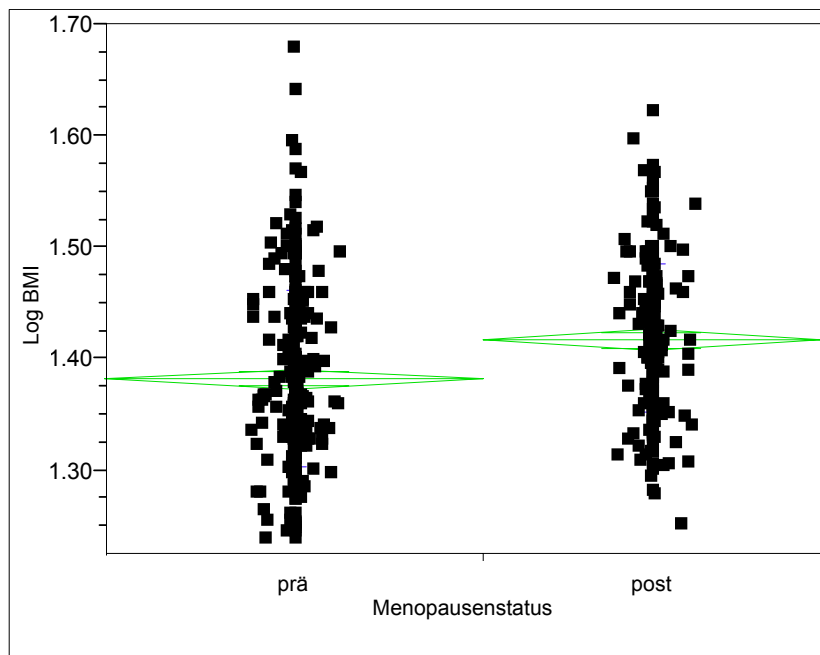


Abb. 7: Log BMI differenziert nach Menopausenstatus. Darstellung eines t-Tests zwischen prämenopausalen (Mittelwert: 1,38 [95% CI 1,37;1,39]) und postmenopausalen Frauen (Mittelwert: 1,42 [95% CI 1,41;1,43]) bzgl. des log BMI.

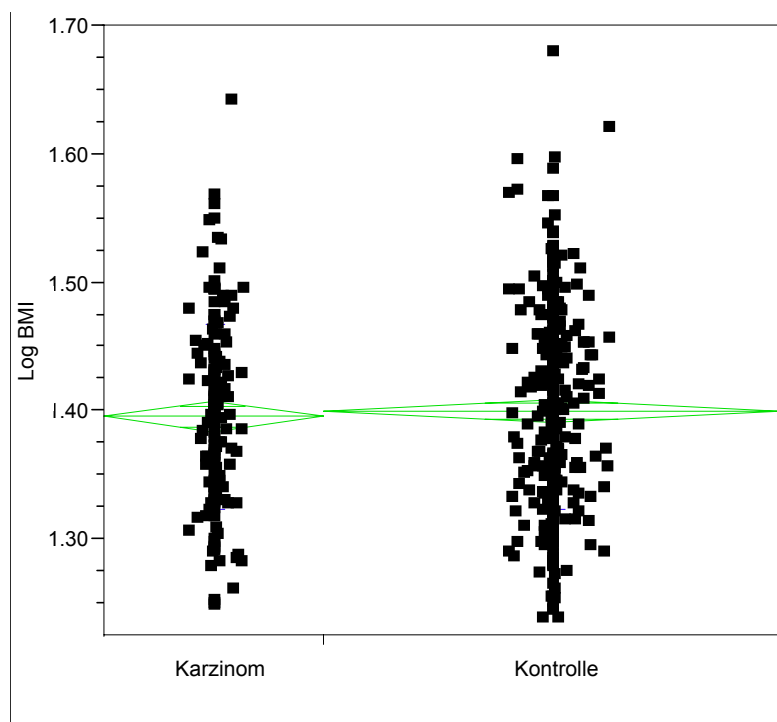


Abb. 8: Log BMI differenziert nach Karzinom/Kontrolle. Darstellung eines t-Tests zwischen Mammakarzinom- (Mittelwert: 1,39549 [95% CI 1,38; 1,41]) und Kontrollpatientinnen (Mittelwert: 1,39995 [95% CI 1,39; 1,41]) bezogen auf log BMI.

Hingegen unterscheiden sich Mammakarzinom- und Kontrollpatientinnen in Bezug auf log BMI, wie Abbildung 8 zeigt, nicht voneinander.

Setzt man jedoch das Alter sowie die Karzinom- und Kontrollgruppe in Bezug zum log BMI, stellt man fest, dass Karzinompatientinnen einen niedrigeren log BMI haben als Frauen der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Kontrollen (o) stellt sich als schwarze Linie dar, die gestrichelten Linien markieren das 95% CI. Der Mittelwert der Karzinompatientinnen (+), in Abb. 9 als rote Linie mit 95% CI gekennzeichnet, verläuft unterhalb der schwarzen. Dieses Ergebnis ist signifikant $p < 0.0001$.

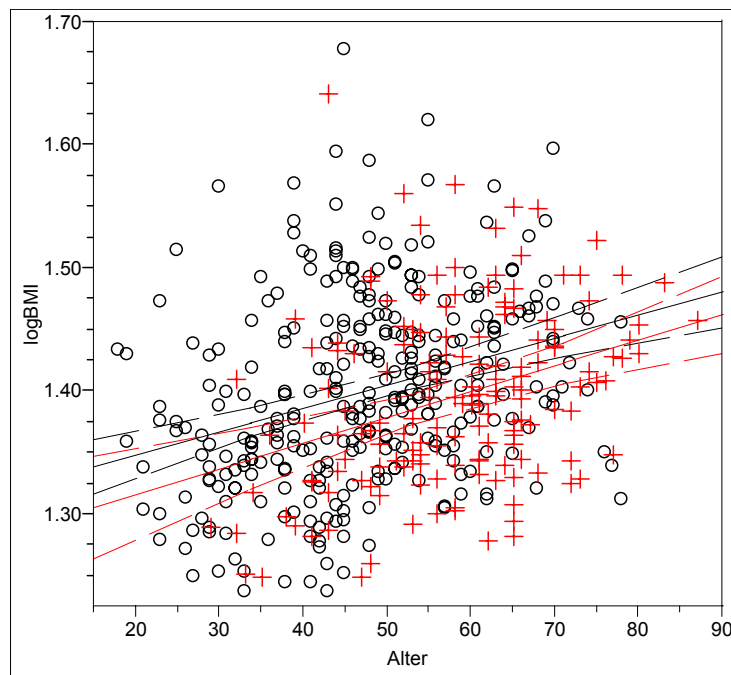


Abb. 9: Regressionsgeraden des log BMI. Darstellung des log BMI anhand einer Regressionsgeraden mit 95 % CI für die Karzinom- (+) und Kontrollgruppe (o), abhängig vom Alter.

3.2 Ergebnisse der 2-OHE, 16 α -OHE und E2-Messungen

Vor Beginn der Estrogenmetabolitenstudie in Tübingen wurden eigene Voruntersuchungen zur Methodik durchgeführt, die zeigten, dass zur Beurteilung des Estrogenstoffwechsels durch die Stoffwechselendprodukte 2-OHE und 16 α -OHE kein Sammelurin nötig ist. Die Menge der Estrogenendprodukte im Einmalurin entsprach prozentual der Menge an 2-OHE und 16 α -OHE im 24-Stunden-Sammelurin.

	Mittel 2-OHE (ng/ml)	Mittel 16 α - OHE (ng/ml)	Mittel 2/16 α - OHE (ng/ml)	Mittel log 2/16 α -OHE	Mittel E2 (ng/ml)
Kontrolle	22,71	12,48	2,22	0,24	58,2
prä	22,79	12,19	2,16	0,24	70
post	22,55	13,3	2,35	0,24	37,9
Karzinom	12,43	7,53	1,79	0,15	41,9
prä	18,54	10,05	2,22	0,21	89,2
post	10,26	6,64	1,63	0,12	25,1

Tab.13: Messung verschiedener Estrogene. Mittelwerte der 2-OHE, 16 α -OHE und E2-Messungen in ng/ml, sowie Berechnungen der Ratio 2/16 α -OHE und der log Ratio 2/16 α -OHE, differenziert nach gesunder Kontrollgruppe und Mammakarzinompatientinnen, sowie nach Menopausenstatus. Inter- und Intraassayvariationen waren $12,5 \pm 4,8 \%$ und $9,9 \pm 2,9 \%$ für 2-OHE bzw. $13,3 \pm 3,8 \%$ und $8,8 \pm 2,4 \%$ für 16 α -OHE.

Der mittlere Wert für 2-OHE \pm SE betrug in der Kontrollgruppe $22,7 \pm 25,4$ ng/ml und in der Karzinomgruppe $12,4 \pm 16,5$ ng/ml. Dieser Unterschied war signifikant. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied fand sich für die 16 α -OHE-Werte: die mittleren Werte \pm SE betragen in der Kontrollgruppe $12,5 \pm 15,9$ ng/ml bzw. $7,5 \pm 7,1$ ng/ml bei den Frauen mit Mammakarzinom.

Im Blickpunkt dieser Arbeit steht das Verhältnis von 2-OHE zu 16 α -OHE. Diese Werte finden sich differenziert nach Frauen mit und Frauen ohne Mammakarzinom sowie aufgeteilt nach Menopausenstatus ebenfalls in Tabelle 13 aufgeführt. Ein erniedrigter 2-OHE/16 α -OHE-Quotient entspricht einer vermehrten Bildung des tumorfördernden D-Ringmetaboliten 16 α -OHE, während eine Erhöhung des Quotienten für eine überwiegende Ausscheidung des tumorprotektiven A-Ringmetaboliten 2-OHE spricht. Man könnte somit postulieren, dass die Frauen mit Mammakarzinom relativ mehr 16 α -OHE ausscheiden als Frauen der Kontrollgruppe.

Logarithmiert man die Ratio 2-OHE/16 α -OHE (log Ratio) so zeigen sich die Werte gemäß einer Normalverteilung.

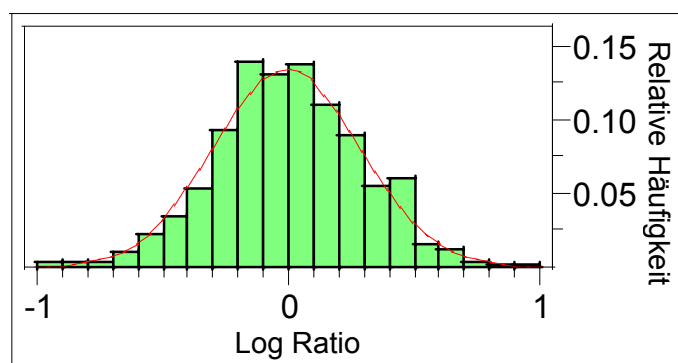


Abb. 10: Verteilung der log Ratio aller Studienteilnehmerinnen. Median -0,0027 (95% CI -0,19;0,19).

Wie in Abbildung 11 ersichtlich ist, unterscheiden sich Frauen mit einem Mammakarzinom in Bezug auf ihre log Ratio signifikant von den Frauen aus der Kontrollgruppe ($p=0,001$). Der Wert lag bei 0,24 ng/ml (95% CI 0,21;0,27) für die Kontrollgruppe und bei 0,15 ng/ml (95% CI 0,09;0,19) für die Karzinomgruppe.

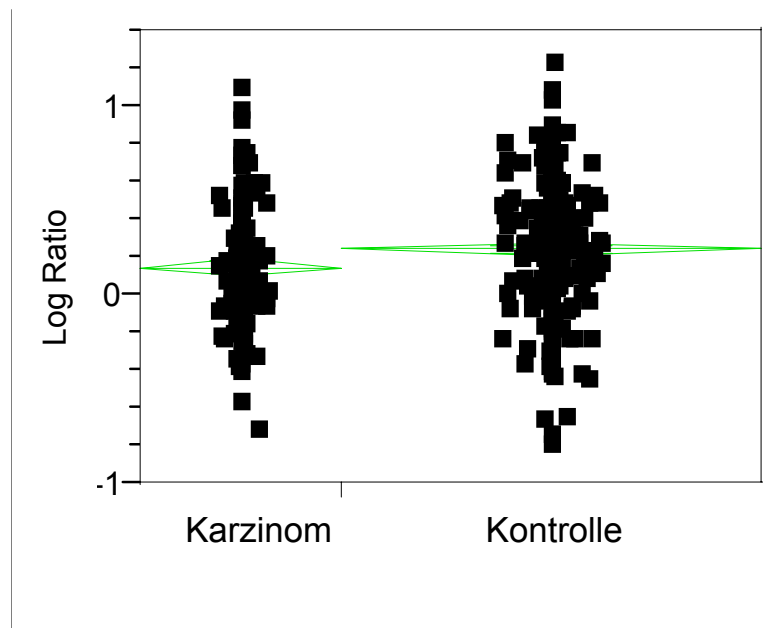


Abb. 11: Log Ratio differenziert nach Karzinom/Kontrolle. Log Ratio von 2-OHE zu 16α-OHE (Mittelwert: 0,15 [95% CI 0,09;0,19]) bei Frauen mit Mammakarzinom $n=156$ und Frauen der Kontrollgruppe ohne Mammakarzinom (Mittelwert: 0,24 [0,21;0,27]) $n=321$.

Die Stratifizierung nach Menopausenstatus ergab nur bei den postmenopausalen Frauen einen signifikanten Unterschied zwischen der log Ratio 2/16α-OHE. Die log Ratio-Werte \pm SE ergaben $0,23 \pm 0,028$ ng/ml für die Kontrollgruppe und $0,12 \pm 0,028$ ng/ml für die Karzinomgruppe.

3.3 Homogenitätsprüfungen

3.3.1 Kategorie

Die Heterogenität der Diagnosen innerhalb der Kontrollgruppe könnte zur Annahme führen, dass sich die Gruppen bezüglich des Estrogenmetabolismus unterscheiden. Ein Vergleich zwischen Frauen mit und Frauen ohne Mammakarzinom wäre somit erschwert. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssten die drei Kontroll-Untergruppen (Kategorie) getrennt gegenüber den Karzinompatientinnen verglichen werden. Um dieses Problem auszuschließen, wurde eine Homogenitätsprüfung innerhalb des Merkmals „Kategorie“ mit Hilfe des Tukey-Kramer-Tests durchgeführt. Dieser Test vergleicht die Untergruppen der Kontrollgruppe, also estrogenabhängige und -unabhängige Erkrankungen sowie benigne Brusterkrankungen bezüglich ihrer log Ratio-Werte miteinander. Das Ergebnis dieses Tests, welches in Tabelle 14 dargestellt ist, erlaubt die Aussage, dass sich die log Ratio-Werte der drei Kontrolluntergruppen nicht voneinander unterscheiden und deshalb als eine gemeinsame Gruppe betrachtet werden dürfen.

Kategorie	Mittelwert	95% CI
estrogenabhängige Erkrankungen	0,251	0,2;0,29
estrogenunabhängige Erkrankungen	0,246	0,19;0,31
benigne Brusterkrankungen	0,209	0,13;0,29

Tab. 14: Homogenität der Kategorien. Log Ratio-Mittelwerte der Kontroll-Untergruppen (Kategorien), estrogenabhängige, estrogenunabhängige und benigner (Brust-)erkrankungen mit 95% Konfidenzintervall (CI).

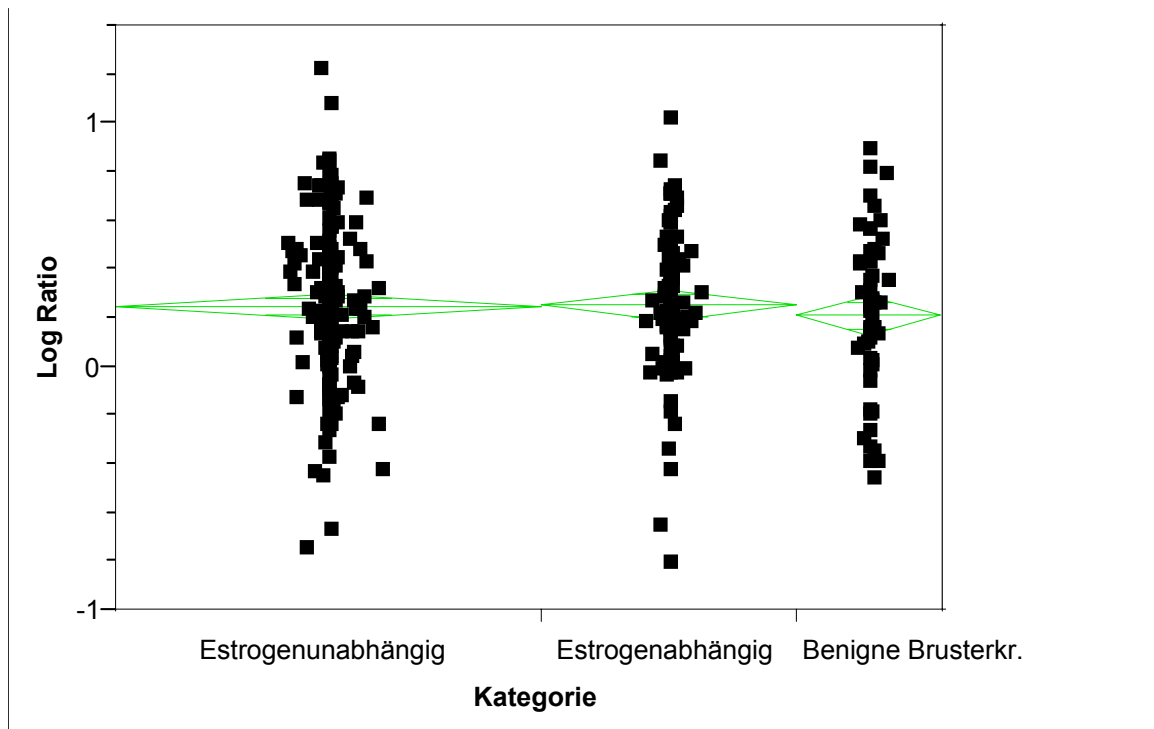


Abb. 12: Homogenitätsprüfung der Kategorien. Tukey-Kramer-Test bzgl. der log Ratio der Kategorien estrogenunabhängige und estrogenabhängige Erkrankungen sowie benigne Brusterkrankungen. Die grüne Raute veranschaulicht den Mittelwert mit dem zugehörigen 95% CI. Die Rautenbreite ist proportional dem Stichprobenumfang.

3.3.2 Rezeptorstatus

Des Weiteren interessiert die Frage, ob sich hormonrezeptorpositive und -rezeptornegative Karzinome bezüglich ihrer log Ratio voneinander unterscheiden. Unabhängig vom klinischen Gesichtspunkt, bei dem für den Einsatz einer antihormonelle Therapie nur relevant ist, ob einer der beiden Hormonrezeptoren, Estrogen oder Progesteron, vorhanden ist, werden hier sämtliche Kombinationsmöglichkeiten an Rezeptorprävalenz bei Karzinomen miteinander in Bezug auf die log Ratio getestet. Auch hierbei wird der Tukey-Kramer Test verwendet. Abbildung 13 zeigt die Verteilung der log Ratio innerhalb der unterschiedlichen Rezeptorengruppen: Karzinome, bei denen keiner von beiden Rezeptoren vorhanden ist (ER-PR-), haben einen Mittelwert von 0,16. Beim Vorhandensein des Estrogenrezeptors in Abwesenheit des Progesteronrezeptors (ER+PR-) zeigt sich ein log Ratio Mittel von 0,16. Ist nur der Progesteronrezeptor vorhanden (ER-PR+), beträgt der Mittelwert 0,096. Sind beide Rezeptoren vorhanden (ER+PR+), ergibt sich ein Mittelwert der log

Ratio von 0,135. Die in Bezug auf ihre Hormonrezeptorsituation unterschiedlichen Karzinome unterscheiden sich somit hinsichtlich der log Ratio nicht.

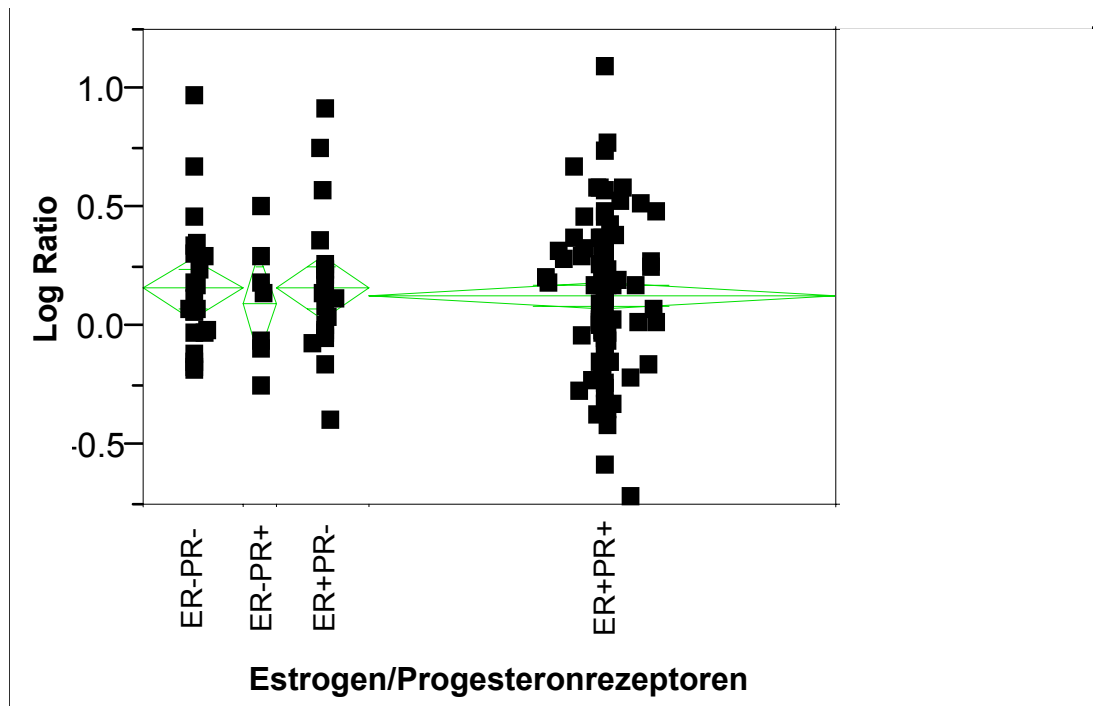


Abb. 13: Homogenitätsprüfung des Rezeptorstatus. Log Ratio-Werte und deren Mittelwerte mit 95% CI (grün) bei verschiedenen Estrogen- und Progesteronrezeptorkombinationen

Die Frage, ob Karzinome mit einem übermäßigen Angebot an hormonsensitiven Rezeptoren Estrogen anders verstoffwechseln und möglicherweise mehr 16α -OHE bilden, kann deshalb verneint werden.

3.3.3 Menopausenstatus

Das Mammakarzinom ist eine Erkrankung, die hauptsächlich postmenopausale Frauen betrifft. In der vorliegenden Untersuchung stehen 115 postmenopausalen Frauen 41 prämenopausale gegenüber. Interessant, im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen log Ratio und dem Mammakarzinom, ist die Frage, ob sich die log Ratio bei post- und

prämenopausalen Frauen, unabhängig davon, ob sie ein Mammakarzinom haben oder nicht, unterscheidet.

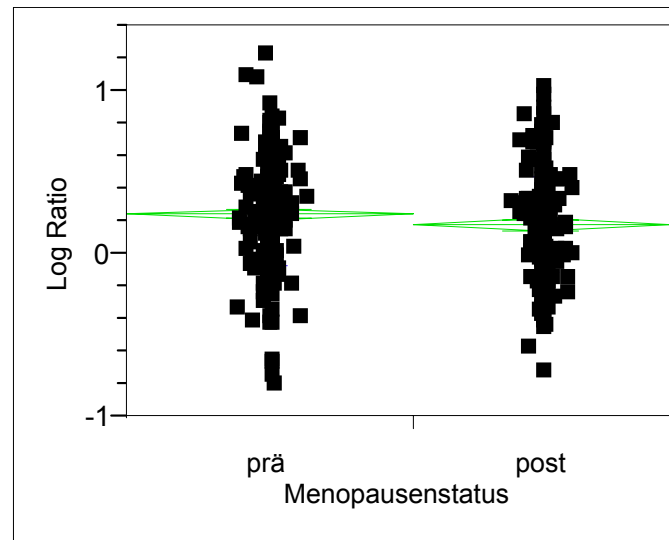


Abb. 14: Log Ratio differenziert nach Menopausenstatus. Log Ratio und deren Mittelwerte mit 95% CI (grüne Raute) prä- und postmenopausaler Frauen im Vergleich.

Ein t-Test, der 252 Prämenopausale und 225 Postmenopausale bezüglich ihrer log Ratio-Werte miteinander vergleicht, ergibt einen signifikanten Unterschied ($p=0,02$) zwischen beiden Kollektiven (siehe Abb. 14 und Tab. 15).

	Anzahl	Log Ratio-Mittelwert	95% CI
Prämenopausal	252	0,241	0,203;0,279
Postmenopausal	225	0,175	0,135;0,215

Tab. 15: log Ratio. Mittelwerte und 95% CI von prä- und postmenopausalen Frauen im Vergleich.

Postmenopausale Frauen haben eine im Mittel um 0,07 (Differenz) niedrigere log Ratio als prämenopausale Frauen. Dies würde die Annahme stützen, dass postmenopausale Frauen Estrogene vermehrt über den D-Ring metabolisieren, was zu einem höheren Mammakarzinomrisiko führen könnte. Dieser t-Test deutet somit darauf hin, dass die log Ratio in Zusammenhang mit der Karzinogenese stehen könnte, jedoch ist ihr Umfang durch mögliche Überlagerungen verschiedenster Faktoren nicht genau zu erfassen. Um diese

Fehler auszuschließen, muss ein anderes statistisches Verfahren angewendet werden.

3.4 Varianzanalyse

Die Zusammenhänge der Studie sind zu komplex als dass sie sich mit einem t-Test erklären lassen - zu viele Faktoren müssen sowohl gleichwertig als auch gleichzeitig berücksichtigt werden. Um den Einfluss der Estrogenmetaboliten auf das Mammakarzinom genauer verifizieren zu können und dabei die bei der Studie erfassten Einflussgrößen mitbetrachten zu können, wird für die eigentliche statistische Auswertung eine multiple Regressionsanalyse gewählt. Diese ermöglicht die mehrdimensionale Betrachtung verschiedener Faktoren und stellt vorhandene Beziehungen unterschiedlicher Einflussfaktoren auf eine Zielvariable dar.

In der folgenden Ergebnisdarstellung werden die Frauen mit Mammakarzinom kurz als „krank“ und die Kontrollgruppe der Frauen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen als „gesund“ bezeichnet. Ebenso beschreiben die Begriffe Zielvariable bzw. Merkmal „krank/gesund“ die beiden Untersuchungsgruppen, Frauen mit und Frauen ohne Mammakarzinom (Karzinom und Kontrolle). Dementsprechend wird der Begriff „Wahrscheinlichkeit, gesund zu sein“ im Sinne „Wahrscheinlichkeit, kein Mammakarzinom zu haben“ verwendet.

3.4.1 Zielvariable „krank/gesund“

Unsere Annahme, die log Ratio 2-OHE/16 α -OHE (log Ratio) beeinflusst das Mammakarzinomrisiko, muss in einem ersten Schritt verifiziert werden. Mit Hilfe einer schrittweisen Variablenselektion werden alle zur Verfügung stehenden Merkmale der Frauen in Bezug auf eine Assoziation mit dem Merkmal „krank/gesund“ getestet. Das Merkmal „krank/gesund“ wird somit zur Zielvariablen, um die Frage zu klären: "Welche der erfassten Größen hat Einfluss auf krank/gesund?"

Da es sich bei „krank/gesund“ um ein dichotomes Merkmal handelt, ist die durchzuführende Untersuchung eine multiple logistische Regression. Die Merkmale Menopausenstatus, log E2, log Ratio, log BMI, Zigaretten und Hormone, sowie ihre zweifachen Wechselwirkungen werden in einem ersten Selektionsverfahren auf die Assoziation mit dem Merkmal „krank/gesund“ vorwärts und rückwärts getestet. Aus den dabei entstehenden 21 Möglichkeiten werden gemäß den Kriterien „Einschluss: $p < 0,25$ “ und „Ausschluss: $p > 0,1$ “ die relevantesten ausgewählt, wobei das Testen vorwärts und rückwärts die gleichen Ergebnisse brachte.

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Merkmale, die mit der Zielvariablen „krank/gesund“ assoziiert sind. Der Schätzwert (Estimate), die Odds Ratio (Chancen Quotient) mit 95% CI und der p-Wert geben Aufschluss über das Risiko bestimmter Merkmalsträger, krank zu sein. Güte der Anpassung $r^2 = 0,16$.

	Estimate	Odds Ratio	95% CI	p-Wert
Menopausenstatus [prä]	-0,987	0,139	0,083;0,225	<.0001
Log Ratio	-1,743	0,030	0,004;0,217	0,001
Log BMI	-5,409	0,092	0,022;0,368	0,001
Intercept	6,914	-	-	0,002
Log Ratio*Zig [n]	1,192	11,144	1,456;99,971	0,025
Hormone [n]	0,255	1,667	1,033;2,729	0,039
Menopausenstatus [prä]*log Ratio	0,691	4,049	0,908;18,757	0,069
Zig [n]	0,061	1,130	0,661;1,972	0,659

Tab. 16: Multiple logistische Regression bzgl. der Wahrscheinlichkeit gesund zu sein - Variablenselektion. Ergebnisse der wichtigsten Einflussgrößen nach Variablenselektion bzgl. des Risikos krank zu sein.

Die log Ratio steht mit einem p-Wert von 0,001 ebenso wie der Menopausenstatus ($p < 0,0001$) und der log BMI ($p = 0,001$) am stärksten in Beziehung zu „krank/gesund“. Hormone zeigen nur eine grenzwertige Signifikanz ($p = 0,039$). Unwichtig scheint das Rauchen zu sein ($p = 0,659$).

Für eine korrekte Interpretation der Einflüsse der verschiedenen Faktoren auf die Wahrscheinlichkeit gesund zu sein bzw. kein Mammakarzinom zu haben, müssen auch die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Einflussfaktoren betrachtet werden. Diese sind in Abbildung 15 dargestellt.

3.4.1.1 Einfluss des Menopausenstatus auf „krank/gesund“

Der Menopausenstatus scheint mit dem Mammakarzinom in Beziehung zu stehen. Dies wird durch den hochsignifikanten p-Wert von $p < 0.0001$ sowie durch die Odds Ratio, die zeigt, dass prämenopausale Frauen ein 0,14-fach niedrigeres Brustkrebsrisiko als postmenopausale Frauen haben, ausgedrückt.

Die Grafiken in Spalte 1 der Abbildung 15 stellen den Einfluss des Menopausenstatus (x-Achse) auf die Wahrscheinlichkeit, kein Mammakarzinom zu haben (y-Achse) in Abhängigkeit der verschiedenen Einflussgrößen, wie der log Ratio (Zeile 2), des BMI (Zeile 3), des Rauchens (Zeile 4) und der Hormoneinnahme (Zeile 5) dar.

Betrachtet man Spalte 1, so wird deutlich, dass postmenopausale Frauen, unabhängig von anderen Einflussfaktoren, fast immer ein höheres Risiko haben, ein Mammakarzinom zu entwickeln als prämenopausale Frauen. Rauchen (Bild 16), sowie Hormoneinnahme (Bild 21) ändern an dieser Aussage nichts.

Interessant sind die Wechselwirkungen mit der log Ratio und dem BMI. In Bild 6 stellt sich die Wahrscheinlichkeit gesund zu sein in Abhängigkeit vom Menopausenstatus und getrennt nach hohen und niedrigen log Ratio-Werten dar. Hierbei fällt auf, dass prä- und postmenopausale Frauen mit höchsten log Ratio-Werten annähernd die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, kein Mammakarzinom zu entwickeln. Eine hohe log Ratio hebt also den großen Risikofaktor der Postmenopause fast vollständig auf. Dem gegenüber zeigt sich, dass sich prämenopausale Frauen mit niedriger log Ratio annähernd gleich verhalten wie gleichaltrige Frauen mit hoher log Ratio, während postmenopausale Frauen mit niedrigster log Ratio ein extrem hohes Risiko für eine Mammakarzinom haben.

Der Einfluss des Menopausenstatus auf die Wahrscheinlichkeit gesund zu sein ist somit entscheidend von der Höhe der log Ratio abhängig. Dies wirkt sich vor allem bei postmenopausalen Frauen aus.

3.4.1.2 Einfluss der log Ratio auf „krank/gesund“

Die Wahrscheinlichkeit, ein Mammakarzinom zu entwickeln ist für Frauen mit hoher log Ratio 0,03-mal (Odds Ratio) geringer als für Frauen mit niedriger log Ratio. Dieser aus den Berechnungen ersichtliche Einfluss der log Ratio auf die Zielvariable „krank/gesund“, spiegelt sich in einem hochsignifikanten p-Wert von 0,001 und graphisch, unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren, in den Abbildungen der Spalte 2 der Abbildung 15 wider. Je niedriger die log Ratio, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit ein Mammakarzinom zu haben. Dies zeigt sich in annähernd allen Wechselwirkungsbeziehungen. Unsere Vermutung einer Korrelation zwischen dem Brustkrebsrisiko und der log Ratio hat sich somit bestätigt. In Bild 2 fällt, wie in Bild 6 bereits beschrieben, die von der log Ratio unabhängige, fast gleichbleibende Wahrscheinlichkeit der Prämenopausalen gesund zu sein auf. Während die postmenopausalen Frauen sehr stark von der Höhe der log Ratio abhängig sind.

Interessant ist die Überkreuzung der Kurven von Raucherinnen und Nichtraucherinnen in Bild 17 als Ausdruck einer Wechselwirkung ($p=0,025$, siehe Tabelle 16). Demnach haben rauchende Frauen mit niedriger log Ratio ein höheres Risiko ein Mammakarzinom zu bekommen als Nichtraucherinnen mit niedriger log Ratio. Umgekehrt dazu profitieren Frauen mit hoher log Ratio wenn sie rauchen. Sie haben eine größere Wahrscheinlichkeit gesund zu sein als Nichtraucherinnen mit hoher log Ratio.

3.4.1.3 Einfluss von log BMI auf „krank/gesund“

Log BMI zeigt in unserer Untersuchung eine signifikante Assoziation mit der Zielvariablen „krank/gesund“ ($p=0,001$). Die Wahrscheinlichkeit ein Mammakarzinom zu haben, ist für Frauen mit hohem BMI 0,09-fach geringer

als für Frauen mit niedrigem BMI. Bei prämenopausalen Frauen hat der BMI keinen Einfluss auf das Mammakarzinomrisiko (Bild 3, Abb. 15).

3.4.1.4 Einfluss von Rauchen auf „krank/gesund“

Anhand des p-Werts von 0,666 wird deutlich, dass Rauchen keinen Einfluss auf „krank/gesund“ zu haben scheint. Auch in der Darstellung der Wechselwirkungen zeigt sich keine Assoziation zwischen Rauchen und der Wahrscheinlichkeit gesund zu sein (Spalte 4).

3.4.1.5 Einfluss von Hormonen auf „krank/gesund“

Hormone, ohne Miteinbeziehung von Einnahmedauer und Präparat scheinen keinen wichtigen Einflussfaktor bzgl. des Mammakarzinomrisikos darzustellen, wie man anhand der konstanten Geraden in Spalte 5 sieht.

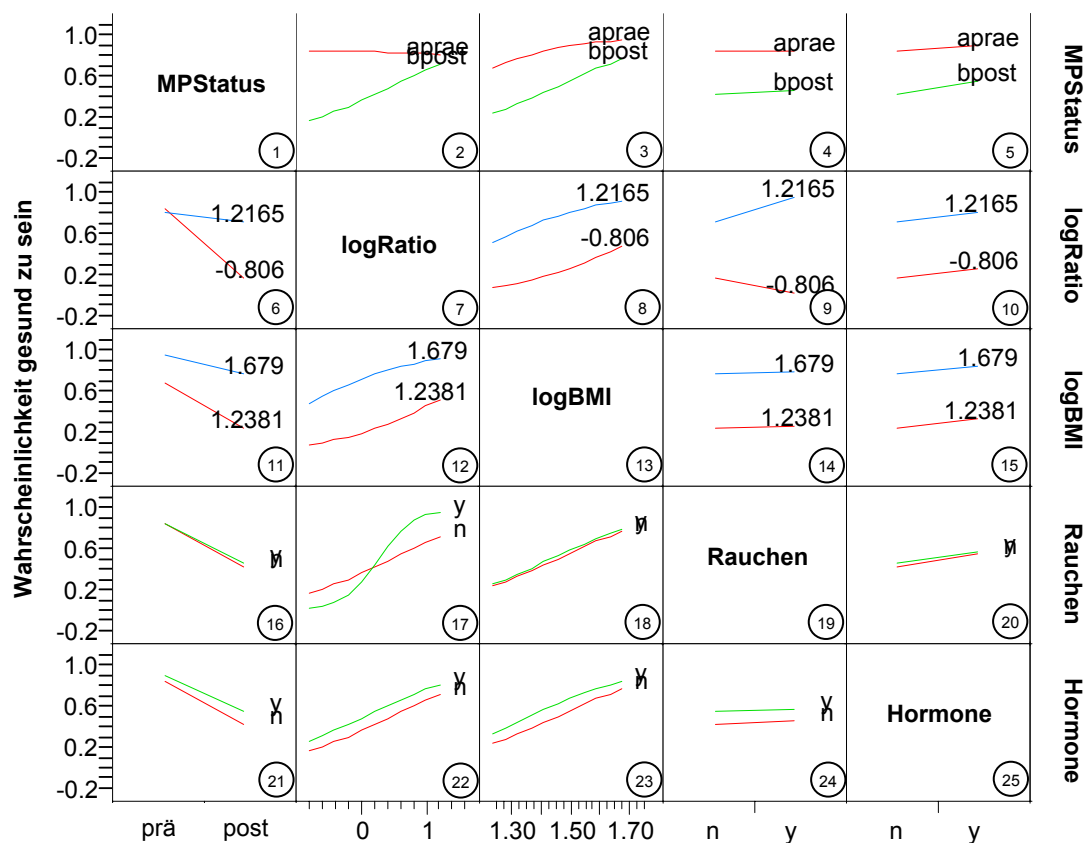


Abb. 15: Ergebnis der multiplen logistischen Regression – Wechselwirkung der Einflussfaktoren auf die Wahrscheinlichkeit gesund zu sein. Darstellung der Einflussfaktoren (x-Achse): Menopausenstatus (MPStatus, aprae= prä, bpost= post), log Ratio, log BMI, Rauchen (n= Nichtraucherinnen, y= Raucherinnen) und Hormone (n= keine Hormoneinnahme, y= Hormoneinnahme) auf die „Wahrscheinlichkeit gesund zu sein“ (Y-Achse) mit ihren 2-fachen Wechselwirkungen (y'-Achse). Die Zahlen innerhalb der Zeilen log Ratio und log BMI stellen den jeweils entsprechenden höchsten und niedrigsten Wert dar.

3.4.2 Zielvariable log Ratio

Die hochsignifikante Assoziation zwischen der log Ratio und dem Mammakarzinomrisiko wurde in der Variablenanalyse dargelegt. Weiteres Ziel der Studie war es, potentielle Einflussfaktoren auf die log Ratio zu identifizieren. Dazu wird log Ratio als neue Zielvariable definiert. Alle anderen Merkmale, außer „krank/gesund“, werden erneut in einer schrittweisen Variablenselektion (multiple Regressionsanalyse) auf die Beziehung zur log Ratio getestet. Wie in der vorhergehenden Untersuchung erfolgt auch hier eine Auswertung ihrer zweifachen Wechselwirkungen. Aus fünfzehn verschiedenen Möglichkeiten werden die relevantesten ausgewählt. Im Gegensatz zum ersten Variablenentest

zeigten sich dieses Mal Unterschiede beim Vorwärts- und Rückwärtsselektieren. Die Entscheidung für die vorwärts gerichtete Selektion ergab sich aus den hierbei dargestellten sinnvolleren Wechselwirkungen. Die Ergebnisse der acht ausgewählten Faktoren mit dem Regressionskoeffizienten $r^2 = 0,08$ sind in Tabelle 17 dargestellt. Die Beurteilung der Daten muss vor dem Hintergrund multiplen Testens nach Bonferroni erfolgen (Bland & Altman 1995).

	Estimate der log Ratio	Standardfehler	p-Wert
Log E2	0,122	0,037	0,001
Log BMI	-0,480	0,223	0,032
Intercept	0,680	0,315	0,032
Menopausenstatus [prä]*log E2	0,065	0,038	0,087
Log BMI*Zig [n]	-0,362	0,213	0,089
Menopausenstatus [prä]*log BMI	0,371	0,226	0,101
Zig [n]	0,024	0,016	0,128
Log E2*log BMI	-0,560	0,543	0,303
Menopausenstatus [prä]	0,002	0,016	0,916

Tab. 17: Regressionsanalyse bezüglich der log Ratio. Darstellung der wichtigsten Einflussgrößen auf die log Ratio nach Variablenselektion

Anhand der p-Werte ist ersichtlich, dass log E2 ($p=0,001$) und log BMI ($p=0,032$) relevante Einflussfaktoren auf die log Ratio 2-OHE/16 α -OHE sind. Alle anderen Einflussfaktoren bzw. deren Kombinationen sind nicht signifikant. Die Ergebniserläuterung findet anhand der Abbildung 16 unter Berücksichtigung der gegenseitigen Wechselwirkungen aller Einflussfaktoren statt. Auf der x-Achse sind wiederum die Einflussfaktoren Menopausenstatus, log E2, log BMI und Rauchen dargestellt. Diese werden mit den log Ratio-Werten auf der y-Achse in Beziehung gesetzt.

3.4.2.1 Einfluss des Menopausenstatus auf die log Ratio

Betrachtet man die erste Spalte in Abbildung 16, so lässt sich keine eindeutige Tendenz des Menopausenstatus in Bezug auf die log Ratio abzeichnen. Bild 5 stellt den Einfluss des Menopausenstatus auf die log Ratio, aufgetrennt nach hohen und niedrigen log E2-Werten, dar. Es zeigt sich, dass ein hohes log E2 eine höhere log Ratio mit sich bringt als ein niedriges log E2. Betrachtet man die Gruppe der prämenopausalen Frauen, so erkennt man, dass es große Unterschiede zwischen Frauen mit hohem log E2 und niedrigem log E2 gibt. Prämenopausale Frauen mit hohen E2-Werten haben auch eine hohe log Ratio, während diejenigen mit niedrigem E2 eine niedrige log Ratio haben. Diese log Ratio-Werte liegen sogar noch unter denen der postmenopausalen Frauen mit niedrigstem log E2. Bei den Postmenopausalen gehen die log Ratio-Werte hinsichtlich unterschiedlich hoher log E2-Werte nicht so gravierend auseinander. Hohe Estrogenwerte zeigen in der Postmenopause höhere log Ratio-Werte als niedriges Estrogen.

Bild 9, in welchem der Menopausenstatus mit Wechselwirkungen des log BMI zur log Ratio dargestellt wird, zeigt, dass der BMI prämenopausal keine große Rolle in Bezug auf die log Ratio spielt. Prämenopausale Frauen mit höchsten und niedrigsten log BMI-Werte haben die gleiche log Ratio. In der Postmenopause jedoch gehen die Frauen mit höchstem und niedrigstem BMI weit auseinander. Adipöse postmenopausale Frauen haben eine niedrigere log Ratio als leichte Frauen.

Rauchen in Kombination mit dem Menopausenstatus bewirkt hinsichtlich der log Ratio keine Veränderungen (Bild 13, Abb. 16).

3.4.2.2 Einfluss des log E2 auf die log Ratio

Log E2, welches auf das Merkmal „krank/gesund“ keine relevanten Auswirkungen zeigte, scheint als Einflussfaktor für die log Ratio qualitativ sehr wichtig zu sein ($p=0,001$). Spalte 2 in Abbildung 16 zeigt das Verhalten von log E2 zur log Ratio unter Einfluss von Menopausenstatus, log BMI und Rauchen.

Die Estrogenwerte von prä- und postmenopausalen Frauen unterscheiden sich, wie in Bild 2 deutlich wird, grundlegend voneinander. Abbildung 17 zeigt dieses Verhalten nochmals deutlicher dargestellt. Dabei fällt auf, dass ein Anstieg von E2 bei den prämenopausalen Frauen (grün) zu einem Anstieg der Ratio führt. Bei den postmenopausalen Frauen (rot) ist dies nicht der Fall. Die log Ratio-Werte bleiben, unabhängig von log E2, auf ungefähr dem gleichen Niveau.

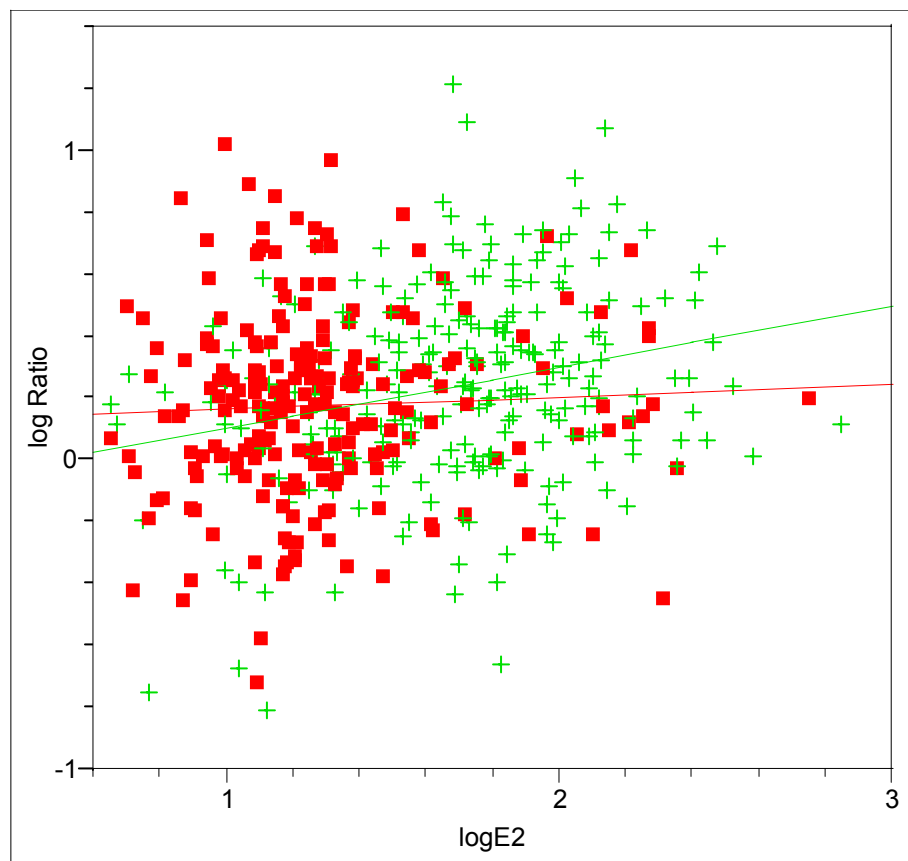


Abb. 17: Einfluss von log E2 auf die log Ratio unter Berücksichtigung des Menopausenstatus (rot= post, grün= prä)

Prämenopausale mit niedrigen Estrogenspiegeln haben eine niedrigere log Ratio als Postmenopausale mit gleichem E2. Somit sind nur prämenopausale Frauen von der Höhe des E2 abhängig.

Die Zusammenhänge zwischen log E2, log BMI und log Ratio werden in Bild 10 (Abb. 16) dargestellt. Hier fällt auf, dass sich mit Anstieg des log E2 Frauen mit hohem und niedrigem log BMI immer weiter voneinander unterscheiden. Frauen mit niedrigstem BMI und höchsten E2-Werten erreichen hohe log Ratio-Werte,

während sich adipöse und dünne Frauen mit einem log E2 bis ca. 1,5 kaum unterscheiden. Die Gruppe der Frauen mit höchsten BMI-Werten werden in Bezug auf die log Ratio durch die ansteigenden E2-Werte kaum beeinflusst. Dennoch besteht eine leichte Tendenz dahingehend, dass Frauen mit höchstem BMI und hohem E2 eine niedrigere log Ratio haben als adipöse Frauen mit niedrigem log E2.

Rauchen beeinflusst die Auswirkungen unterschiedlicher log E2-Werte auf die log Ratio nicht (Bild 14).

3.4.2.3 Einfluss des BMI auf die log Ratio

Als zweite Einflussgröße auf die log Ratio wurde der log BMI ermittelt. Mit einem p-Wert von 0,042 deutet sich hier eine Assoziation mit der log Ratio in der Weise an, dass hohe log BMI-Werte zu einer niedrigen log Ratio führen (Tabelle 17). Dies ist allerdings, interpretiert man Bild 3 in Abbildung 16, nur bei postmenopausalen Frauen der Fall. Bei Prämenopausalen ändert sich bei steigendem BMI die log Ratio nicht.

Ähnliches zeigt sich bei der Differenzierung zwischen höchsten und niedrigsten log E2-Werten (Bild 7). Frauen mit niedrigen Estrogenspiegeln zeigen unabhängig von der Höhe des BMI eine konstante log Ratio. Frauen mit höchsten log E2-Werten profitieren dagegen von einem niedrigen BMI. Dies führt zu einem Anstieg der log Ratio. Bei Steigerung des BMI rutschen diese Frauen unter das log Ratio-Niveau der Frauen mit niedrigem log E2.

Ein hoher BMI in Kombination mit einem hohen log E2 scheint in einem Absinken der log Ratio zu resultieren.

3.4.2.4 Einfluss anderer Faktoren

Der Menopausenstatus ($p=0,83$) alleine ist genauso wie Rauchen ($p=0,13$) (Spalte 4 in Abb. 16) oder eine Hormoneinnahme ($p=0,27$) nicht signifikant mit der log Ratio in Beziehung zu bringen. Lediglich die Wechselwirkungen mit starken Faktoren wie z.B. Menopausenstatus kombiniert mit log E2 ($p=0,07$) oder log BMI kombiniert mit Rauchen ($p=0,09$) lassen eine gewisse Relevanz

vermuten, die allerdings nicht signifikant ist und wahrscheinlich nichts mit dem Rauchen an sich zu tun hat, sondern nur vom eindeutigen Ergebnis des log E2- und des log BMI-Einflusses herrührt.

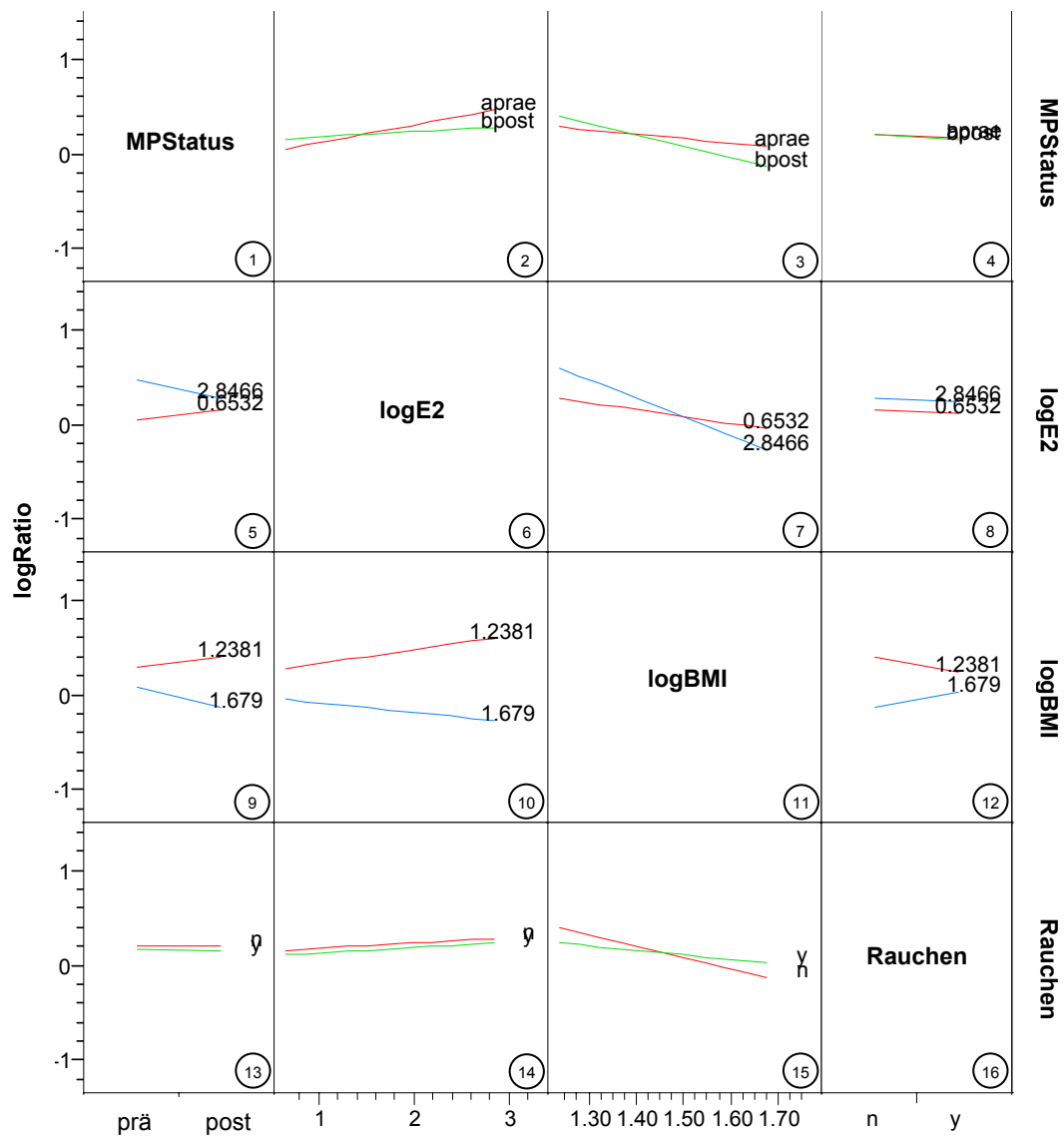


Abb. 16: Ergebnis der Regressionsanalyse – Wechselwirkungen verschiedener Einflussfaktoren auf log Ratio. Darstellung der Einflussfaktoren (x-Achse) Menopausenstatus (MPStatus, aprae= prä, bpost= post), log E2, log BMI und Rauchen (n= Nichtraucherinnen, y= Raucherinnen) auf die log Ratio (y-Achse) und ihre 2-fachen Wechselwirkungen (y'-Achse). Die Zahlen innerhalb der Zeilen log E2 und log BMI stellen den jeweils entsprechenden höchsten und niedrigsten Wert dar.

3.4.3 Zusammenfassung

Die Hypothese, die log Ratio aus 2-OHE und 16 α -OHE könnte eine Rolle bei der Mammakarzinomentstehung spielen, konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Frauen mit Brustkrebs haben eine signifikant erniedrigte log Ratio gegenüber gesunden Frauen ($p=0,001$), was für ein Überwiegen des tumorfördernden Metaboliten 16 α -OHE bei Mammakarzinompatientinnen spricht. Unter Miteinbeziehung von weiteren Faktoren, wie dem Menopausenstatus, log BMI, Rauchen und Hormoneinnahme, konnte gezeigt werden, dass dies nur bei postmenopausalen Frauen der Fall ist (siehe Abb. 15, Bild 2). Alle anderen Faktoren hatten keinen Einfluss auf die Beziehung zwischen log Ratio und dem Mammakarzinomrisiko. Darüber hinaus zeigte der Menopausenstatus mit $p<0,0001$ ebenfalls eine signifikante Beziehung zum Merkmal „krank/gesund“. Ein sehr stabiler Faktor, der kaum durch andere Faktoren beeinflusst wird, außer durch die oben genannte Interaktion mit der log Ratio. Frauen mit hoher log Ratio zeigten unabhängig vom Menopausenstatus ein geringeres Risiko ein Mammakarzinom zu haben.

Der BMI steht ebenso mit dem Mammakarzinomrisiko in Zusammenhang, während Rauchen und Hormone keinen signifikanten Einfluss auf „krank/gesund“ haben.

Bei der anschließenden Untersuchung der Einflussfaktoren auf die log Ratio zeigten sich log E2 ($p=0,001$) und log BMI ($p=0,032$) als signifikante Größen. Unter Berücksichtigung der 2-fachen Wechselwirkungen stellte sich weiterhin heraus, dass die Höhe des log E2 nur bei Prämenopausalen zu einer Veränderung der log Ratio führt.

Die Höhe von log BMI hatte besonders bei postmenopausalen Frauen Auswirkungen auf die log Ratio. Je höher der BMI, desto niedriger ist die log Ratio, was mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko einhergeht. Bei Prämenopausalen steht der BMI in keiner Beziehung zur log Ratio.

Rauchen hatte keinen Einfluss auf den Metabolitenquotienten 2-OHE/16 α -OHE.

4 Diskussion

4.1 2-OHE/16 α -OHE - Risikofaktor für Brustkrebs?

Nach den ersten Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen Estrogenmetaboliten und Brustkrebs, welche eine Vermehrung des D-Ringmetabolismus zeigten (Zumoff et al. 1966, Fishman & Martucci 1980, Schneider et al. 1982), wurden in vitro Versuche durchgeführt, um die molekularbiologischen Eigenschaften des 16 α -OHE zu erforschen. Zellbiologische Versuche zeigten 1980 eine biologische Aktivität des D-Ringmetaboliten 16 α -OHE sowie eine Verbindung zwischen der Tumorentwicklung und der Menge an Estrogen im Gewebe (Fishman & Martucci 1980).

Fishman et al. stellten 1995 fest, dass 16 α -OHE genotoxische Eigenschaften aufweist. Ist 16 α -OHE einmal an den ER gebunden, bleibt es dort im Gegensatz zu Estradiol irreversibel. Da 16 α -OHE ein normaler Metabolit des Estrogens ist, bleibt noch herauszufinden, unter welchen Bedingungen diese extreme Bindung an den ER und die genotoxische Wirkung zustande kommen. (Fishman et al. 1995). Auch im Brustgewebe, genauer gesagt in den „terminal duct lobular units“ (TDLU), wurde vermehrtes, um das 4,5-fach erhöhte 16 α -OHE im Gegensatz zu gesundem Brustgewebe festgestellt (Osborne et al. 1993).

Demgegenüber zeigte 2-Hydroxyestron (2-OHE) antiöstrogene Wirkungen wobei es das Wachstum der Brustkrebszelllinie MCF-7 unterdrückte (Schneider et al. 1984). Unklar ist, ob dies eine Eigenwirkung von 2-Hydroxyestron ist oder ob dies durch das methylierte Abbauprodukt 2-Methoxyestron bzw. -estradiol verursacht wird. Da das Methylierungsenzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) praktisch in fast allen Geweben vorkommt, ist es schwer einzuschätzen, ob die berichteten Untersuchungsergebnisse von der zugegebenen Substanz oder von der methylierten Form herrühren.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde aufgrund dieser Daten die Hypothese aufgestellt, dass 2-OHE ein eher protektives Estrogen und 16 α -OHE das eher tumorfördernde Estrogen sei und dass dem Verhältnis dieser beiden Metabolite ein prädiktiver Wert hinsichtlich estrogenabhängiger Tumoren zukommen könnte (Bradlow et al. 1996).

Die Auswertung unserer Untersuchung ergab, dass postmenopausale Frauen mit Mammakarzinom im Gegensatz zu Frauen mit benignen gynäkologischen Erkrankungen eine Erhöhung des tumorfördernden 16 α -OHE aufwiesen. Die Verringerung des Metabolitenquotienten log Ratio 2-OHE/16 α -OHE war mit $p=0,001$ signifikant. Dieses Ergebnis, welches unter Betrachtung verschiedener Einflussgrößen erzielt wurde, bestätigt das Ergebnis einer vorhergehenden Studie aus dem Jahre 1998. Hier wurde ebenfalls der Vorhersagewert der log Ratio für das Auftreten von Brustkrebs sowie die beeinflussenden Faktoren für die log Ratio untersucht. In einer Variablenanalyse wurden Alter, Menopausenstatus, Schwangerschaften, Kontrazeptiva, BMI, Serumspiegel des Insulin-like growth factor-I und IGF-binding protein zusammen mit der Inzidenz von Brustkrebs untersucht und zwischen 65 Mammakarzinompatientinnen und 36 Kontrollen verglichen. Ergebnis dieser Studie war, dass 2-OHE und die 2-OHE/16 α -OHE-Ratio bei Frauen mit Mammakarzinom signifikant erniedrigt ($p<0.05$) waren, während 16 α -OHE erhöht war ($p<0.01$). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Estrogenmetaboliten durch die Zahl der Schwangerschaften beeinflusst werden und die IGF-bindenden Proteine positiv mit der Ratio korrelieren ($p=0,03$). Auch hier wurde mittels multipler linearer Regression gezeigt, dass die 2-OHE/16 α -OHE-Ratio der wichtigste Parameter bei der Vorhersage von Brustkrebs war. Die Odds Ratio für Frauen mit hoher 2-OHE/16 α -OHE-Ratio war dagegen 0,10 (CI 95% 0,03;0,38). Die Autoren dieser Studie postulierten, dass die Ratio 2-OHE/16 α -OHE ein Biomarker für Brustkrebs ist (Ho et al. 1998).

Bereits 1997 wurden in einer Untersuchung von Kabat die 2-OHE/16 α -OHE-Ratio von 42 Mammakarzinompatientinnen und 64 Kontrollen ähnlichen Alters (mittleres Alter Karzinomgruppe 53,8 \pm 15,1 Jahre vs. Kontrolle 54,2 \pm 10,4 Jahre) miteinander verglichen. Die mittlere 2-OHE/16 α -OHE Ratio der Frauen war hierbei nicht signifikant mit Brustkrebs in Verbindung zu bringen (Karzinom vs. Kontrolle [Mittelwert \pm SE] 1,67 \pm 0,80 vs. 1,72 \pm 0,66; p=0,7). Postmenopausale Frauen mit Mammakarzinom zeigten jedoch eine signifikant erniedrigte Ratio im Vergleich zu postmenopausalen gesunden Kontrollen (1,41 \pm 0,73 vs. 1,81 \pm 0,71; p=0,05). Ein multivarianter Odds Ratio-Test zwischen den höchsten und niedrigsten Ratios postmenopausaler Frauen war mit p=0,003 hochsignifikant, deshalb schließt auch Kabat, dass 16 α -OHE als ein starker Risikofaktor für Brustkrebs angesehen werden muss. Bei der anschließenden Suche nach Einflussfaktoren auf die Ratio konnte keine Verbindung zwischen Alter, Rasse, Alter bei der ersten Geburt, Zahl der Schwangerschaften, BMI, familiärer Brustkrebshäufung, Rauchen oder Alkohol hergestellt werden (Kabat et al. 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie decken sich auch mit den Resultaten der ersten prospektiven Studie über den Zusammenhang zwischen den Estrogenmetaboliten 2-OHE/16 α -OHE und Brustkrebs, der Guernsey III follow-up Studie. Hierbei wurden zwischen 1977 und 1985 5.104 gesunde Frauen im Alter von 35 Jahren in die Studie aufgenommen und kontinuierlich bezüglich der Entstehung von Brustkrebs beobachtet. Es zeigte sich, dass postmenopausale Frauen, die innerhalb von 19 Jahren Brustkrebs entwickelten, bis zu 15% erniedrigte 2-OHE/16 α -OHE-Werte im Vergleich zu gesunden Frauen aufwiesen. Frauen mit höchster log Ratio hatten ein bis zu 30% niedrigeres Risiko an Brustkrebs zu erkranken als Frauen in den unteren log Ratio-Dritteln. Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant (OR=0,71 [95% CI 0,29;1,75]) (Meilahn et al. 1998).

Die Ergebnisse der „Hormones and diet in the etiology of breast cancer“ Studie, eine ebenfalls prospektive Fall-Kontroll-Studie über die Assoziation von 2-OHE/16 α -OHE und Brustkrebs, die zwischen 1987 und 1992 in Italien durchgeführt wurde, wurden 2000 von Muti veröffentlicht. Nach ungefähr 5,5 Jahren traten bei 144 der 10.786 Frauen (Alter: 35-69 Jahre) Mammakarzinome auf. Eine erkrankte Frau wurde mit jeweils vier gesunden Frauen verglichen. Es zeigte sich, dass bei prämenopausalen Frauen eine höhere 2-OHE/16 α -OHE Ratio mit einem reduzierten Brustkrebsrisiko assoziiert war. Frauen mit höchster Ratio hatten eine Odds Ratio für Brustkrebs von 0,58 (95% CI 0,25;1,34). Die korrespondierende Odds Ratio postmenopausaler Frauen lag bei 1,29 (95% CI 0,53;3,10). Aufgrund dieser Ergebnisse kommen die Autoren zu dem Schluss, dass eine Erhöhung der 2-OHE-Fraktion im Estrogenmetabolismus bei prämenopausalen Frauen mit einem erniedrigten Risiko für Brustkrebs verbunden ist (Muti et al. 2000).

Die neueste randomisierte Fall-Kontroll-Studie zu diesem Thema, durchgeführt an in Shanghai lebenden Chinesinnen, zeigte ähnliche Ergebnisse wie unsere Studie. Es wurden 110 gesunde Frauen und 110 Frauen mit Mammakarzinom bezüglich ihrer Estrogenmetaboliten miteinander verglichen (Alter: 25 - 65 Jahre). Dabei wurden bei 78 Fall-Kontroll-Paaren präoperativ bzw. vor Therapie Urinproben gesammelt und die Estrogenmetaboliten gemessen, bei 32 Paaren im Vergleich dazu postoperativ (Median 130 Tage danach, Range 0 - 327 Tage). Dabei zeigte sich, dass Frauen ohne vorhergehende Therapie, unabhängig vom Menopausenstatus, mit hoher Ratio weniger häufig an Brustkrebs erkrankten als Frauen mit niedriger Ratio (OR=0,5 [95% CI 0,2;1,1]). Im Gegensatz dazu konnte in der Gruppe der Frauen mit vorhergehender Therapie eine Assoziation von erhöhter 2-OHE/16 α -OHE-Ratio mit Brustkrebs festgestellt werden (OR=8,7 [95%CI 1,6;47,1]). Des Weiteren zeigte diese Studie, dass Frauen mit Mammakarzinom gegenüber gesunden Frauen einen erhöhten BMI hatten und weniger sportlich aktiv waren. Beide Untersuchungsgruppen hatten eine ähnliche Zahl an Kindern, während jedoch das Alter bei der ersten Geburt bei Frauen mit Brustkrebs höher war als bei

gesunden Kontrollfrauen. Aus dieser Studie ergibt sich, dass eine erniedrigte 2-OHE/16 α -OHE-Ratio mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko bei prä- und postmenopausalen Chinesinnen einhergeht (Fowke et al. 2003).

Zu anderen Ergebnissen kommt allerdings eine Studie von Ursin (Ursin et al. 1997). Bei der Untersuchung 48 postmenopausaler Frauen (25 Frauen mit Mammakarzinom und 23 gesunde Frauen) zeigte sich, dass Brustkrebspatientinnen eine um 12% erniedrigte 2-OHE/16 α -OHE-Ratio hatten als gesunde Kontrollen ($p=0,58$). Alle anderen gemessenen Estrogene waren jedoch bei den Frauen mit Mammakarzinom um 22% ($p=0,16$) erhöht. E1 zeigte sich um 30% ($p=0,10$), E2 um 58% ($p=0,07$) und E3 um 15% ($p=0,48$) erhöht. Ursin veröffentlichte 1999 erneut Daten postmenopausaler Frauen aus der „Breast Cancer Case-Control Study“. 66 Mammakarzinompatientinnen wurden wiederum bezüglich ihrer Estrogene und deren Metaboliten mit 76 gesunden Kontrollen verglichen. Hierbei wurden die Ergebnisse von 1997 bestätigt. Alle gemessenen Estrogene waren bei den Mammakarzinompatientinnen höher als bei den Kontrollen. Der Mittelwert von 2-OHE war um 13,8% ($p=0,20$) höher als bei den Kontrollen. 16 α -OHE war um 12,1% ($p=0,23$), Estron um 20,9% ($p=0,14$) und E2 um 12% ($p=0,36$) höher. Auch die 2-OHE/16 α -OHE-Ratio war entgegen der Hypothese um 1,1% höher als bei den gesunden Kontrollen ($p=0,84$). Frauen mit niedrigsten 2-OHE/16 α -OHE Ratio-Werten hatten ein um das 1,13-fach nichtsignifikant höheres Brustkrebsrisiko. Auch diese Studie konnte somit die Hypothese des Einflusses von 16 α -OHE auf Brustkrebs nicht unterstützen (Ursin et al. 1999).

In einer weiteren Studie (Ursin et al. 2001) sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Höhe des Estrogens und seiner Metaboliten zwischen 58 amerikanischen Frauen („Hawaii/Los Angeles Multiethnic Cohort Study“), die bekanntlich häufiger an Brustkrebs erkranken, und 67 Frauen aus Singapur (randomisiert aus der „Singapore Chinese Health Study“) gibt. Als Ergebnis zeigte sich, dass die mittleren 2-OHE-Werte der Frauen aus Singapur um 23% höher waren als die der Amerikanerinnen ($p=0,03$). Keinen signifikanten Unterschied ergab die Messung des 16 α -OHE und die Berechnung der 2-

OHE/16 α -OHE-Ratio ($p=0,41$). Frauen aus Singapur hatten eine mittlere Ratio von 1,63, Amerikanerinnen von 1,48. Dagegen waren die E2-Werte der Amerikanerinnen um 15,2% höher als bei den Frauen aus Singapur ($p<0,0001$). Ähnlich erhöht zeigten sich E1 ($p=0,0001$) und E3 ($p=0,0009$). Diese Daten deuten darauf hin, dass die höhere Inzidenz von Brustkrebs in den USA mit erhöhten Estrogenwerten der Amerikanerinnen in Zusammenhang steht und nicht mit der log Ratio.

Gesunde prämenopausale Frauen wurden in einer weiteren Untersuchung aufgrund unterschiedlicher familiärer Brustkrebsbelastung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen eingeteilt und ihre Estrogenmetaboliten miteinander verglichen. In der Hochrisikogruppe befanden sich Frauen mit an Brustkrebs erkrankten Verwandten ersten Grades, in der Niedrigrisikogruppe Frauen ohne Brustkrebserkrankungen in der Familiengeschichte (Ursin et al. 2002). Es zeigte sich, dass bei Hochrisikofrauen Estrogen bzw. seine Metaboliten nicht erhöht waren. Stattdessen beobachtete man eine statistisch signifikante Erniedrigung der E2-, 2-OHE- und 16 α -OHE-Werte im Gegensatz zu Frauen mit niedrigem Mammakarzinomrisiko. Der Quotient 2-OHE/16 α -OHE war bei beiden Gruppen identisch. Prämenopausale Frauen mit positiver Familienanamnese unterschieden sich somit hinsichtlich der Höhe der Estrogene und der 2-OHE/16 α -OHE-Ratio nicht von Frauen ohne familiäre Mammakarzinom-Fälle. Die Autoren vertreten daher die Ansicht, dass 2-OHE/16 α -OHE nicht in Verbindung mit einer Brustkrebserkrankung steht.

Auch die Untersuchung von Cauley konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Mammakarzinomrisiko und einer Erniedrigung der log Ratio feststellen. Bei dieser Follow-up-Studie wurden 272 Frauen, die nach einem mittleren Zeitraum von 8,7 Jahren an Brustkrebs erkrankten, mit gesunden Frauen verglichen. Beide Estrogenmetaboliten, 2-OHE und 16 α -OHE, zeigten sich bei den erkrankten Frauen im Vergleich zu gesunden um 3 - 4% erhöht (2-OHE-Mittelwerte krank vs. gesund: 176 pg/ml vs. 169 pg/ml; 16 α -OHE-Mittelwerte krank vs. gesund: 233 pg/ml vs. 226 pg/ml). Es gab keine Unterschiede in der

Ratio. Das Risiko von Frauen mit höchsten Ratio-Werten bezogen auf Frauen mit niedrigster Ratio betrug 1,17 (95% CI 0,71;1,87) (Cauley et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse unserer Studie mit dem Großteil der zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen übereinstimmen. Die meisten Studien bestätigen einen Zusammenhang zwischen einer Erniedrigung der 2-OHE/16 α -OHE Ratio und der Inzidenz von Mammakarzinomen. Dabei ist zu betonen, dass unsere Studie, abgesehen von den großen multizentrischen Studien, mit insgesamt 477 Frauen eines der größten Patientenkollektive vorzuweisen hatte. Auch die Differenzierung, dass vor allem postmenopausale Mammakarzinompatientinnen eine erniedrigte log Ratio aufweisen, stimmt mit dem Mehrzahl der international veröffentlichten Studien überein.

4.2 Menopausenstatus

Als weiteres Ergebnis der vorliegenden Studie ist zu verzeichnen, dass postmenopausale Frauen häufiger an Brustkrebs erkranken als Prämenopausale. Abbildung 4 zeigt, wie im Studienkollektiv mit steigendem Alter der Anteil der Kranken den der Gesunden übersteigt. Zusätzlich wurde mit multipler logistischer Regression erörtert, dass der Menopausenstatus unabhängig vom Rauchen, der Höhe des Gewichts oder der Hormoneinnahme einen wichtigen Faktor im Zusammenhang mit dem Auftreten von Brustkrebs darstellt. Diese Resultate entsprechen den bekannten epidemiologischen Daten und bestätigen, dass das Alter der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung des Mammakarzinoms ist. „So liegt die altersspezifische Inzidenz zwischen 50 und 70 Jahren um den Faktor 5 höher als im Alter zwischen 35 und 40 Jahren“ (Kreienberg et al. 2002).

In Verbindung mit hohen log Ratio-Werten scheint jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen das Risiko des Alters aufgehoben zu werden. Postmenopausale Frauen mit höchsten log Ratio-Werten und somit einem Überwiegen des protektiven Metaboliten 2-OHE haben ein geringeres

Mammakarzinomrisiko. Dies wurde in den oben bereits erwähnten Studien von Kabat (Kabat et al. 1997) und Meilahn (Meilahn et al. 1998) ebenfalls gezeigt.

4.3 BMI

Gemäß unserer Auswertungen korreliert ein hoher BMI mit einer Erniedrigung des Brustkrebsrisikos. Dieses Resultat ist praktisch unabhängig von anderen Einflussfaktoren. Einzig die Berücksichtigung des Menopausenstatus zeigt, dass prämenopausale Frauen unabhängig von der Höhe des log BMI ein geringeres Brustkrebsrisiko haben.

Dieses Ergebnis ist nicht zu erklären. Gehört doch ein hoher BMI postmenopausal normalerweise zu den Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs (Stoll et al. 1994, Van den Brandt et al. 2000). Die Zusammenhänge sind noch unklar, doch scheint die mit steigendem BMI verbundene Steigerung der Estrogenproduktion durch das im Fettgewebe befindliche Enzym Aromatase wesentlich an der Karzinogenese beteiligt zu sein (Reed & Purohit 2001, Bianchini et al. 2002).

In einer neueren Metaanalyse zeigte sich in sechs von acht Studien ein erhöhter mittlerer BMI bei Frauen mit Brustkrebs ($26,5 \text{ kg/m}^2 \pm \text{SE } 4,6$) im Vergleich zu gesunden Kontrollfrauen ($25,8 \text{ kg/m}^2 \pm \text{SE } 4,4$). Ein BMI-Anstieg von 5 kg/m^2 war mit einem Anstieg des Brustkrebsrisikos von 18% verbunden („Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group“ 2002).

Eine Follow-up-Studie beobachtete 73.542 prämenopausale und 103.344 postmenopausale Frauen aus neun europäischen Staaten bezüglich der Entstehung von Brustkrebs und der Höhe des BMI über 4,7 Jahre. In dieser Zeit traten 1.879 Fälle von invasivem Brustkrebs auf. Brustkrebs und BMI waren signifikant miteinander assoziiert ($p < 0,002$). Frauen mit einem BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$ hatten ein um 31% erhöhtes Brustkrebsrisiko im Vergleich zu Frauen mit einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$. Prämenopausalen Frauen zeigten keine Assoziation zwischen BMI und dem Risiko Brustkrebs zu entwickeln (Lahmann et al. 2004). Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen der Tübinger Studie überein.

Zusammenhänge zwischen Brustkrebsentwicklung und BMI werden bei postmenopausalen Frauen hauptsächlich mit steigendem freiem Estrogen im Serum erklärt. Möglich wäre auch ein durch den BMI veränderter Estrogenmetabolismus - Hinweise darauf ergeben sich aus unserer Studie. Bei Betrachtung der Einflussfaktoren auf die signifikant mit Mammakarzinomen in Beziehung stehende 2-OHE/16 α -OHE Ratio zeigte sich der BMI als wichtige Einflussgröße mit einer Signifikanz von $p=0,032$. Differenzierung mittels multipler logistischer Regression machte deutlich, dass ein hoher BMI bei postmenopausalen Frauen zu einer Erniedrigung der log Ratio führt. In ähnlichen vorhergehenden Studien wurden nur in der Studie von Kabat Einflussfaktoren auf die log Ratio untersucht. Der BMI stellte sich hierbei als nicht entscheidend für die Höhe der log Ratio heraus (Kabat et al. 1997). In den anderen Fall-Kontroll-Studien zum Thema Mammakarzinom und log Ratio wurden der Einfluss des BMI auf die log Ratio nicht untersucht.

Bei prämenopausalen Frauen hatte der BMI in unserer Untersuchung keinen Einfluss auf die log Ratio. Andere Studien zeigten, dass viel Fettgewebe bei jungen Frauen zu einer Reduzierung der C2-Hydroxylierung bei gleich bleibender 16 α -Hydroxylierung führte. Dieser veränderte Estrogenstoffwechsel führt zu einem hyperestrogenen Zustand, welcher im weiteren Zusammenspiel mit der Umwandlung von Androstendionen durch die Aromatase zu Estron sowie dem Absinken des SHBG-Spiegels und der Zunahme an Estronsulfat im Plasma zu hormoneller und reproduktiver Dysfunktion führt (Schneider et al. 1982). Anovulatorische Zyklen könnten die Folge sein und damit könnte das Risiko für Brustkrebs bei adipösen prämenopausalen Frauen sinken.

Ein weiterer Grund weshalb sich adipöse prämenopausale und adipöse postmenopausale Frauen unterschiedlich in Bezug auf die Brustkrebsprävalenz unterscheiden, könnte in der Fettverteilung im Körper liegen. Eine Studie aus dem Jahr 2001 zeigte, dass prämenopausale im Vergleich zu postmenopausalen Frauen einen signifikant ($p<0,05$) erniedrigten abdominalen Fettanteil hatten. Abdominelles Fett wird als ein Prädiktor für die Cholesterin- und HDL-Konzentration gesehen und könnte somit vermehrt, im Gegensatz zu

Hüftfett, welches häufiger bei prämenopausalen Frauen vorkommt, mit Brustkrebs in Beziehung stehen (Kanaley et al. 2001).

Die vermehrte Bildung von 16α -OHE bei postmenopausalen Frauen mit Mammakarzinom könnte auch in einer im Vergleich zu gesunden Frauen unterschiedlichen Lebensweise, wie sportliche Aktivität und Ernährungsweise, begründet sein (Kreienberg et al. 2002). Studien stellten bei Sportlerinnen einen Anstieg des 2-OHE sowie aller methylierten Katecholestrogene fest (De Cree 1997). Ebenso zeigte eine prospektive Studie, in der 74.171 postmenopausale Frauen zwischen 50 und 79 Jahren über einen mittleren Zeitraum von 4,7 Jahren in Bezug auf ihre sportliche Aktivität und die Entwicklung von Brustkrebs beobachtet wurden, dass Frauen, die ab einem Alter von 35 Jahren regelmäßig Sport machten, ein um 14% niedrigeres Brustkrebsrisiko hatten als Untrainierte (McTiernan et al. 2003).

Eine weitere Untersuchung zeigte, dass Frauen, die sportlich aktiv sind, trotz hohen BMIs eine höhere log Ratio aufwiesen als gleich schwere Frauen, die sich in ihrer Freizeit nicht sportlich betätigten. Die Autoren gehen deshalb davon aus, dass Sport den Estrogenmetabolismus beeinflussen kann - auch bei Frauen mit hohem BMI (Matthews et al. 2004). In unserer Untersuchung floss die sportliche Aktivität der Studienteilnehmerinnen nicht mit ein.

4.4 Hormone

In unserer Untersuchung hatten die Frauen mit Hormoneinnahme ein eher niedriges Mammakarzinomrisiko. Allerdings war die Signifikanz grenzwertig ($p=0,037$). Da die Hormoneinnahme eine HRT als auch eine kontrazeptive Therapie beinhalten kann, erwies sich die Interpretation als sehr schwierig. Die Daten sollten daher sehr vorsichtig betrachtet werden. Auch lagen Informationen zur Art der Hormontherapie und der Therapiedauer nicht vor.

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Studien über den Einfluss einer Hormoneinnahme auf die Entwicklung von Brustkrebs. Die in Großbritannien durchgeführte „Million-Women-Study“ zeigte, dass die dauerhafte Einnahme

von Hormonen bei Frauen zwischen 50 und 64 Jahren im Vergleich zu Frauen, die noch nie Hormone zu sich genommen hatten, mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Zusammenhang steht (RR 1,66 [95% CI 1,58;1,75], $p < 0,0001$) (Beral & Million Women Study Collaborators 2003). Dabei zeigte sich auch, dass Estrogen alleine weniger risikoreich ist als Estrogen-Progesteron-Kombinationspräparate. Zudem stellte sich die Brustkrebssterblichkeit bei Frauen mit HRT gegenüber Frauen, die nie Hormone genommen hatten, mit einem relativen Risiko von 1,22 als nicht signifikant erhöht dar ([95 %CI 1,0;1,48], $p = 0,05$) (Beral & Million Women Study Collaborators 2003). Dies war bereits bei vorhergehenden Untersuchungen festgestellt worden (Nanda et al. 2002).

Die ähnlich aufgebaute amerikanische „WHI-Studie“ zeigte bei postmenopausalen Frauen, die vorher noch nie Hormone eingenommen hatten, unter Gabe von 0,625 mg/d konjugierten equinen Estrogenen plus 2,5 mg/d Medroxyprogesteronacetat (CEE/MPA) im Vergleich zu einer Placebogruppe mit 1,06 kein signifikant erhöhtes relatives Risiko. Ein erhöhtes Risiko hatten hingegen Frauen, die bereits zuvor mit Hormonen behandelt worden waren. Da die Zunahme von Mammakarzinomen während der HRT erst nach durchschnittlich vier Jahren in Erscheinung trat, geht man davon aus, dass ein längerer Zeitraum notwendig ist, um nachweisbare Einflüsse der HRT bezüglich der Karzinomentstehung annehmen zu können (Rossouw et al. 2002).

Bei Untersuchung der Einflussfaktoren auf die log Ratio zeigte sich in unserer Studie, dass Hormone keinerlei Einfluss auf die log Ratio hatten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den wenigen zu diesem Thema erschienenen Arbeiten. Eine Studie, die verschiedene Kontrazeptiva bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Ratio 2-OHE/16 α -OHE untersuchte, zeigte, dass Präparate, die Norethisteronacetat, Dienogest oder Levonorgestrel enthielten, die log Ratio nach drei Zyklen nicht signifikant veränderte. Die Autoren postulieren daher, dass diese Substanzen keine Änderung im Estrogenstoffwechsel in Richtung

einer vermehrten Metabolisierung über den D-Ring bewirken (Mueck et al. 2004).

Zu anderen Ergebnissen kam eine schwedische Studiengruppe, die die 2-OHE/16 α -OHE-Ratio bei 513 prämenopausalen Nullipara (Alter: 17 - 35 Jahre) unter Einfluss oraler Kontrazeptiva (Estrogen/Progesteron) untersuchte. Es zeigte sich, dass Frauen mit oraler Kontrazeption eine signifikant erniedrigte Ratio im Vergleich zu Frauen ohne Kontrazeption hatten (Jernstrom et al. 2003).

Alvarez-Vasquez et al. gehen davon aus, dass eine HRT keinen Einfluss auf die 2-OHE/16 α -OHE-Ratio hat. Sie verglichen die Estrogenmetaboliten von 34 gesunden Frauen ohne HRT mit 19 Frauen, die regelmäßig Hormone einnehmen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der 2-OHE/16 α -OHE Ratio (mit HRT [Mittelwert \pm SE] $2,82 \pm 0,92$ vs. ohne HRT $2,71 \pm 0,84$). Des Weiteren untersuchten sie vier Frauen mit Brustkrebs und verglichen deren Metabolitenratio mit denen von Frauen mit HRT. Hierbei zeigten die Frauen mit Brustkrebs im Vergleich zu gesunden, hormoneinnehmenden Frauen eine mit $p < 0,0001$ signifikant erniedrigte Ratio ($1,35 \pm 0,13$ vs. $2,71 \pm 0,84$) (Alvarez-Vasquez et al. 2003).

Untersuchungen zwischen transdormaler und oraler Estradiol- bzw. Estradiol-/Norethisteronacetatgabe zeigten weder signifikante Unterschiede in der Estrogenmetabolisierung noch eine signifikante Veränderung der 2-OHE/16 α -OHE-Ratio (Seeger et al. 2000).

4.5 Rauchen

Rauchen hatte in der vorliegenden Untersuchung keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Mammakarzinomrisiko ($p=0,66$). Darüber hinaus konnte keine Wechselwirkung des Rauchens mit anderen Faktoren wie dem Menopausenstatus, dem log BMI oder der Hormoneinnahme festgestellt werden (Abb. 13).

Es gibt zahlreiche Arbeiten zu diesem Thema. Eine Studie aus Dänemark untersuchte mittels multipler logistischer Regression den Zusammenhang

zwischen Rauchen und der Prävalenz von Mammakarzinomen an 3.240 Frauen. Es konnte gezeigt werden, dass Frauen, die länger als 30 Jahre geraucht hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs hatten. Ebenso war das Erkrankungsalter bei Raucherinnen signifikant ($p < 0,01$) gegenüber Nichtraucherinnen erniedrigt (Bennicke et al. 1995). Eine große Reanalyse von 54 epidemiologischen Studien aus dem Jahre 2002 zeigte keinen Zusammenhang zwischen Rauchen und Brustkrebs (Hamajima et al. 2002).

Bei der Prüfung der Einflussfaktoren auf die log Ratio stellte sich das Merkmal „Rauchen“ in unserer Untersuchung als kein relevanter Faktor heraus ($p = 0,128$).

Zu anderen Ergebnissen kam eine Arbeitsgruppe, die den Einfluss von Zigarettenrauchen auf die 2-Hydroxylierung des Estrogens untersuchte. Hierbei kam es bei Raucherinnen zu einer signifikanten Zunahme des 2-OHE ($p < 0,001$; [Mittelwerte (ng/ml) \pm SE] $53,6 \pm 2,2$ vs. $35,1 \pm 1,8$) (Michnovicz et al. 1986).

Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Rauchen und Brustkrebs könnte das Vorkommen von Polymorphismen der nikotinmetabolisierenden Enzyme, NAT1 und NAT2 sein (Smith et al. 1995). NAT2 entgiftet oder aktiviert aromatische Amine, die z.B. im Tabak vorkommen (Ambrosone et al. 1996). Frauen mit hoher NAT2-Aktivität können Kanzerogene besser azetylieren als Frauen mit eingeschränkter NAT2-Aktivität. Eine Studie postmenopausaler Frauen (185 Fälle und 213 Kontrollen) zeigte ein erhöhtes Brustkrebsrisiko für langsame Azetylierer, im Gegensatz zu Frauen, die über eine ausreichende Zahl von NAT2 verfügten (Ambrosone et al. 1996).

Die Existenz von solchen niedrig penetranten genetischen Polymorphismen könnte ein Grund dafür sein, dass manche Frauen sensitiver als andere auf Estrogene und Karzinogene der Umwelt reagieren (Smith et al. 1995, Ambrosone et al. 1995).

4.6 Estrogen

Estrogene wirken als Promotoren im Rahmen der Karzinogenese. Als starker, die Zellproliferation stimulierender Faktor, wird Estrogen weithin als Risikofaktor für das Mammakarzinom gesehen. Die durch Estrogen geförderten Zellteilungen bergen aufgrund nicht in ausreichendem Maße vorhandener Reparaturmöglichkeiten das Risiko von vermehrten Mutationen und als Folge Malignomentstehung (Preston-Martin et al. 1990, Mitrunen & Hirvonen 2003). Dies bestätigte eine Reanalyse von neun prospektiven Studien aus dem Jahr 2002, bei der Daten von 663 Brustkrebspatientinnen und 1.765 gesunden Frauen im Alter zwischen 58,1 und 71,8 Jahren ausgewertet wurden. Der mittlere BMI lag zwischen 22,3 und 26,7 kg/m². Ergebnis der Reanalyse war, dass alle gemessenen Hormone (E2, freies E2, Non-SHBG-binding Estradiol, Estron, Estronsulfat, Androstendion, DHEA, DHEAS, Testosteron, SHBG) statistisch signifikant mit einer Zunahme des Brustkrebsrisikos in Verbindung standen. Das RR von Frauen mit hohen Estradiolspiegeln (im oberen Fünftel) war 2,00 (95% CI 1,47;2,71) im Vergleich zu Frauen mit niedrigem Estradiol. Das höchste RR bestand für Frauen mit höchsten Werten von freiem Estradiol (RR=2,85 [95% CI 1,76;3,78]) und für nicht an SHBG gebundenes Estradiol (RR=2,39 [95% CI 1,62;3,54]). Alle Ergebnisse dieser Studie waren statistisch signifikant (Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group 2002).

Die Höhe des Estradiolspiegels im Blut hatte in unserer Untersuchung keinen eindeutigen Effekt auf das Mammakarzinomrisiko (keine erhöhten E2-Werte bei Frauen mit Mammakarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollpatientinnen). Erklärungsmöglichkeit für die divergenten Ergebnisse in unserer Untersuchung könnte die zu niedrige Fallzahl sein. Weiterhin könnten bei prämenopausalen Frauen die unterschiedlichen E2-Werte, die abhängig von den verschiedenen Zyklusphasen sind, dazu geführt haben, dass insgesamt das Kollektiv sehr inhomogen war.

Allerdings zeigte sich in unserer Untersuchung, dass log E2 ein signifikanter Einflussfaktor auf das Verhältnis der Estrogenmetaboliten 2-OHE/16 α -OHE ist.

Nach Stratifizierung bezüglich des Menopausenstatus wurde deutlich, dass ein steigendes log E2 jedoch nur bei prämenopausalen Frauen zu einem Anstieg der log Ratio führt. Postmenopausale Frauen blieben, unabhängig von der Höhe des log E2, in weitgehend konstanten log Ratio-Bereichen.

4.7 Enzympolymorphismus

Die Ergebnisse unserer Studie müssen abschließend kurz in Zusammenhang mit der Bedeutung unterschiedlicher Enzympolymorphismen betrachtet werden. Diese haben möglicherweise erheblichen Einfluss darauf, wie der menschliche Organismus mit Karzinogenen umgeht.

Die untersuchten Gene, die im Verdacht stehen, bei der Brustkrebsentstehung beteiligt zu sein, werden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. Gene, die für Proteine des Steroidhormonmetabolismus kodieren, Gene, die für die Bildung karzinogenmetabolisierender Enzyme verantwortlich sind und Allele von Genen, die mittels Familienstudien mit Brustkrebs assoziiert wurden wie TP53 und BRCA1 (Dunning et al. 1999).

Für unsere Untersuchung sind Gene, die für die Metabolisierung von Steroidhormonen verantwortlich sind, interessant. Ihr Einfluss auf den Stoffwechsel von Sexualhormonen könnte die Produktion von potenten Estrogenen wie Estradiol oder aber auch die Bildung von 16α -OHE und anderer Katecholestrogene, wie beispielsweise dem 4-Hydroxyestron erhöhen. Hierfür verantwortliche Gene sind: CYP 1B1, CYP 17, CYP 19 und die Gene für die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2. Das CYP17, ein Gen, welches für das Cytochrom P450-Enzym codiert und am Estrogenmetabolismus beteiligt ist, wurde bei Frauen mit früher Menarche und einem steigenden Brustkrebsrisiko in Beziehung gebracht (Feigelson et al. 1997). Ebenso wichtig scheinen Polymorphismen des Phase-II-Enzyms Catechol-O-Methyltransferase (COMT), welches einen suffizienten Schutzfaktor gegen Katecholestrogene bildet und deren Ausscheidung fördert, zu sein. Sowohl die membrangebundene als auch

die zytosolisch vorkommende COMT-Form weisen Polymorphismen auf, die mit Unterschieden in ihrer Methylierungsaktivität einhergehen (Dunning et al. 1999). Die Erforschung dieser Enzym polymorphismen befindet sich noch in einem sehr frühen Stadium, dennoch lassen sich wahrscheinlich in Zukunft Frauen definieren, die aufgrund ihrer Enzymausstattung bezüglich des Estrogenstoffwechsels ein größeres Mammakarzinomrisiko haben als andere Frauen (Emons 2003).

Auch andere Aspekte dieser Arbeit, wie die Einflussfaktoren auf das Mammakarzinomrisiko und auf die 2-OHE/16 α -OHE Ratio, können vor dem Hintergrund von Polymorphismen betrachtet werden. So steht der Einfluss des Rauchens wie auch der Hormoneinnahme in Bezug auf das Mammakarzinomrisiko höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der Enzymausstattung der Frau. Diese ist dafür verantwortlich, wie auf Umweltkarzinogene oder exogene Estrogene reagiert werden kann (Coughlin & Piper 1999a). Polymorphismen der Phase-I-Enzyme CYP1A1 und CYP2D6 werden durch Karzinogene des Zigarettenrauchs induziert und reagieren auf diese. Beide weisen polymorphologische Unterschiede in ihrer Induzierbarkeit und Aktivität auf (Hunter & Willett 1996). In einer 466 Paare umfassenden Fall-Kontroll-Studie über den Zusammenhang zwischen CYP1A1 und Brustkrebs zeigte sich eine positive Relation zwischen Msp1 oder Ile-Val Polymorphismen und dem Auftreten von Mammakarzinomen. Das Risiko war für Raucherinnen, die diese Polymorphismen trugen, größer als für Nichtraucherinnen (Ishibe et al. 1998). Auch Ambrosone bestätigte einen Zusammenhang zwischen Brustkrebs, Rauchen und dem CYP1A1 Polymorphismus (Ambrosone et al. 1995).

Phase-II-Enzyme wie GSTM1 und GSTT1 entgiften Karzinogene und deren reaktive Produkte. Ein hoher Prozentsatz von Kaukasierinnen ist homozygot negativ für GSTM1 und GSTT1. DNA-Addukte, Schwesterchromatidaustausch und somatische Genmutationen könnten in GSTM1 und GSTT1 negativen Genotyp-Trägern erhöht sein (Rebbeck 1997).

Die N-Acetyltransferasen NAT1 und NAT2 sind ebenfalls Phase-II-Enzyme. Sie nehmen an der Detoxifikation wichtiger Karzinogenkomponenten des Zigarettenrauchs teil (Badawi et al. 1995).

Obwohl die Forschung hinsichtlich der vielen verschiedenen Polymorphismen erst begonnen hat, wird die Zahl der Brustkrebsfälle, die solchen Polymorphismen zugeschrieben werden kann, als weit höher angenommen, als die hereditären Fälle, die durch eine Mutation der Gene BRCA1 und TP53 hervorgerufen werden (Coughlin et al. 1999b).

5 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Estradiol ein bedeutender Faktor bei der Mammakarzinomentstehung ist, wobei dies eher im Sinne der Promotion als der Initiierung zu verstehen ist. Weiterhin zeigte sich in In-Vitro-Untersuchungen, dass unterschiedliche Estrogenmetaboliten entweder tumorfördernde, wie z.B. 16α -OHE (16α -Hydroxyestron), oder tumorprotektive, wie z.B. 2-OHE (2-Hydroxyestron), Eigenschaften haben können. Nicht nur die Höhe des Estradiolspiegels könnte daher ein Risikofaktor für die Entstehung eines Mammakarzinoms sein, sondern auch die unterschiedliche Metabolisierung von Estradiol zu diesen verschiedenen Stoffwechselprodukten mit unterschiedlicher biologischer Wirkung könnte von Bedeutung sein. Bisher durchgeführte Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse zur Bedeutung der Estrogenmetaboliten für das Risiko eines Mammakarzinoms.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wurde an der Universitätsfrauenklinik Tübingen eine Fall/Kontrollstudie initiiert. In dieser Untersuchung wurden im Zeitraum von 2001 - 2002 die Estrogenmetaboliten 2-OHE und 16α -OHE bei 156 Mammakarzinompatientinnen und 321 Patientinnen mit gutartigen gynäkologischen Erkrankungen (Kontrollgruppe) präoperativ im Urin bestimmt und der metabolische Quotient (2-OHE zu 16α -OHE) berechnet (log Ratio). Zusätzlich wurden die Parameter Menopausenstatus, Body Mass Index (BMI), Rauchen, Hormoneinnahme und die Estradiolserumspiegel im Blut bei allen Patientinnen erhoben und der Einfluss dieser unterschiedlichen Faktoren auf den metabolischen Quotienten mittels multipler logistischer Regression untersucht.

In unserer Untersuchung zeigte sich, dass der metabolische Quotient bei Patientinnen mit Mammakarzinom im Vergleich zu unserer Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war, was für ein Überwiegen des tumorfördernden Metaboliten 16α -OHE bei Mammakarzinompatientinnen spricht.

Bei der Analyse der Einflussfaktoren auf diese log Ratio bei Patientinnen mit Brustkrebs zeigte sich, dass bei prämenopausalen Patientinnen ein erhöhter Estradiolspiegel im Blut eine erhöhte log Ratio bedingte. Bei postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen konnte jedoch dieser Einfluss der Estradiolspiegel im Blut auf die log Ratio nicht beobachtet werden. Estradiolwerte sind bei prämenopausalen Frauen allerdings zyklusabhängig mit unterschiedlichen Gestagenkonzentrationen schwankend, was im Vergleich zur postmenopausalen Frau ein deutlich unterschiedliches hormonelles Milieu darstellt. Auch der BMI zeigte einen Einfluss auf die log Ratio, wobei ein erhöhter BMI eine erniedrigte log Ratio zur Folge hatte und damit zu einem weiteren Überwiegen der tumorfördernden Metaboliten führte. Diese Beobachtung war hauptsächlich bei den postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen festzustellen. Rauchen, von dem man weiß, dass es Metabolisierungsprozesse in der Leber beeinflussen kann, hatte in unserer Untersuchung keinen Einfluss auf die log Ratio. Auch die anderen untersuchten Faktoren zeigten keinen Einfluss auf den Quotienten 2-OHE/16 α -OHE.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse unserer Fall/Kontrollstudie darauf hindeuten, dass die unterschiedliche Metabolisierung von Estradiol bei der Mammakarzinomentstehung eine Rolle spielen könnte. Gleichzeitig zeigte sich, dass diese genetisch determinierten Metabolisierungsmuster durch exogene Faktoren wie den BMI als auch den Estradiolspiegel im Blut beeinflusst werden können. Da es deutliche Unterschiede zwischen Estradiolspiegeln im Blut und Estradiolkonzentrationen im Mammagewebe gibt (ca. Faktor 10) und auch zu vermuten ist, dass die Konzentrationen der Metaboliten im Gewebe von der im Urin gemessenen unterschiedlich sind, ist geplant in weiteren Untersuchungen die Konzentration dieser Metaboliten auch im Gewebe abzuklären.

Literaturverzeichnis

- Adlercreutz, H., Martin, F., Wahlgross, O., Soini, E. Mass spectrometric and mass fragmentographic determination of natural and synthetic steroids in biological fluids. *J. Steroid Biochem.*, **6**, 247-259 (1975)
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T. Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens in urine of women various habitual diets. *J. Steroid Biochem.*, **25**, 791-797 (1986)
- Alvarez-Vasquez, R.B., Axelrod, D., Frenkel, K., Newman, M.C., Sepkovic, D.W., Bradlow, H.L., Zumoff, B. Influence of postmenopausal hormone replacement therapy on an estrogen metabolite biomarker of risk for breast cancer. *Horm. Metab. Res.*, **35**, 358-361 (2003)
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Graham, S., Marshall, J.R., Vena, J.E., Brasure, J.R., Laughlin, R., Nemoto, T., Michalek, A.M., Harrington, A. et al. Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res.*, **55**, 3483-3485 (1995)
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Graham, S., Marshall, J.R., Vena, J.E., Brasure, J.R., Michalek, A.M., Laughlin, R., Nemoto, T., Gillenwater, K.A., Shields, P.G. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *JAMA*, **276**, 1494-1501 (1996)
- Badawi, A.F., Hirvonen, A., Bell, D.A., Lang, N.P., Kadlubar, F.F. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res.*, **55**, 5230-5237 (1995)
- Beatson G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*, **2**, 104 (1896)
- Becker, N., Wahrendorf, J., Holzmeier, S. *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*. 3. Aufl., Springer, Berlin (2002)
- Bennicke, K., Conrad, C., Sabroe, S., Sorensen, H. T. Cigarette smoking and breast cancer. *BMJ*, **310**, 1431-1433 (1995)
- Beral, V., Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, **362**, 419-427 (2003)

- Bergkvist, L., Adami, H.O., Persson, I., Hoover, R., Schairer, C. The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 293-297 (1989)
- Berstein, L.M., Tsyrlina, E.V., Kolesnik, O.S., Gamajunova, V.B., Adlercreutz, H. Catecholestrogens excretion in smoking and non-smoking postmenopausal women receiving estrogen replacement therapy. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **72**, 143-147 (2000)
- Bianchini, F., Kaaks, R., Vainio, H. Overweight, obesity, and cancer risk. *The Lancet Oncol.*, **3**, 565-574 (2002)
- Bland, J.M., Altman, D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*, **310**, 170 (1995)
- Bradlow, H.L., Telang, N.T., Sepkovic, D.W., Osborne, M.P. 2-Hydroxyestrone: the "good" estrogen. *J. Endocrinology*, **150**, 259-265 (1996)
- Braga, C., Negri, E., La Vecchia, C., Filiberti, R., Franceschi, S. Cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, **5**, 159-164 (1996)
- Bucala, R., Fishman, J., Cerami, A. The reaction for 16 α -hydroxyestrone with erythrocytes in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.*, **140**, 593-598 (1984)
- Burstein, H.J., Kuter, I., Campos, S.M., Gelman, R.S., Tribou, L., Parker, L.M., Manola, J., Younger, J., Matulonis, U., Bunnell, C.A., Partridge, A.H., Richardson, P.G., Clarke, K., Shulman, L.N., Winer, E.P. Clinical activity of Trastuzumab and Vinorelbine in women with HER2-Overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, **19**, 2722-2730 (2001)
- Cauley, J.A., Zmuda, J.M., Danielson, M.E., Ljung, B.M., Bauer, D.C., Cummings, S.R., Kuller, L.H. Estrogen metabolites and the risk of breast cancer in older women. *Epidemiology*, **14**, 740-744 (2003)
- Colditz, G.A., Hankinson, S.E., Hunter, D.J., Willett, W.C., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Hennekens, C., Rosner, B., Speizer, F.E. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New Engl. J. Med.*, **332**, 1589-1593 (1995)
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast Cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet*, **350**, 1047-1059 (1997)
- Coughlin, S.S., Piper, M. Genetic polymorphisms and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, **8**, 1023-1032 (1999a)

- Coughlin, S.S., Khoury, M.J., Steinberg, K.K. BRCA1 and BRCA2 gene mutations and risk of breast cancer: public health perspectives. *Am. J. Prev. Med.*, **16**, 91-98 (1999b)
- De Cree, C., Ball, P., Seidlitz, B., Van Kranenburg, G., Geurten, P., Keizer, H.A. Responses of catecholesterogen metabolism to acute graded exercise in normal menstruating women before and after training. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 3342-3348 (1997)
- Djuric, Z., Poore, K.M., Depper, J.B., Uhley, V.E., Lababidi, S., Covington, C., Klurfeld, D.M., Simon, M.S., Kucuk, O., Heilbrun, L.K. Methods in increase fruit and vegetable intake with and without a decrease in fat intake: compliance and effects on body weight in the nutrition and breast health study. *Nutr. Cancer*, **43**, 141-151 (2002)
- Dorgan, J.F., Longcope, C., Stephenson, H.E. Jr., Falk, R.T., Miller, R., Franz, C., Kahle, L., Campell, W.S., Tangrea, J.A., Schatzkin, A. Serum sex hormone levels are related to breast cancer risk in postmenopausal women. *Environ. Health Persp.*, **105**, 583-585 (1997)
- Dunning, A.M., Healey, C.S., Pharoah, P.D.P., Teare, M.D., Pondet, B.A., Easton, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, **8**, 843-854 (1999)
- Elston, C.W., Ellis, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer. Experiences from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, **19**, 403-410 (1991)
- Emons, G., Gründker, C., Hanf, V. Sind Östrogene Karzinogene? *Der Gynäkologe*, **36**, 182-189 (2003)
- Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 606-616 (2002)
- Falck, F., Ricci, A., Wolff, M.S., Godbold, J., Decker, P. Pesticides and polychlorinated biphenyls residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch. Environ. Health*, **47**, 143-146 (1992)
- Feigelson, H.S., Coetzee, G.A., Kolonel, L.N., Ross, R.K., Henderson, B.E. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. *Cancer Res.*, **57**, 1063-1065 (1997)
- Fishman, J., Martucci, C. Biological properties of 16 α -hydroxyestrone: Implications in estrogen physiology and pathophysiology. *J Clin. Endocrinol. Metabol.* **51**, 611-615 (1980)

- Fishman, J., Osborne, M.P., Telang, N.T. The role of estrogen in mammary carcinogenesis. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **768**, 91-100 (1995)
- Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P.P., Schweigerer, L. The endogenous estrogen metabolite 2-methoxyestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Nature*, **368**, 237-239 (1994)
- Fowke, J.H., Longcope, C., Hebert, J.R. Macronutrient intake and estrogen metabolism in healthy postmenopausal women. *Breast Cancer Res. Treat.*, **65**, 1-10 (2001)
- Fowke, J.H., Qi, D., Bradlow, H.L., Shu, X.O., Gao, Y.T., Cheng, J.R., Jin, F., Zheng, W. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: differential pattern of risk found with pre- versus post-treatment collection. *Steroids*, **68**, 65-72 (2003)
- Ginsburg, E.S., Walsh, B.W., Shea, B.F., Gao, X., Gleason, R.E., Feltmate, C., Barbieri, R.L. Effect of acute ethanol ingestion on prolactin in menopausal women using estradiol replacement. *Gynecol. Obstet. Invest.*, **39**, 47-49 (1995)
- Ginsburg, E.S. Estrogen, alcohol and breast cancer risk. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 299-306 (1999)
- Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K., Meyer, R., Linz, K.W., Karas, R.H., Vetter, H. Modulation of hypertensive heart diseases by estrogen. *Steroids*, **61**, 201-204 (1996)
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer - collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58515 women with breast cancer and 95067 women without the disease. *Br. J. Cancer*, **87**, 1234-1245 (2002)
- Hankinson, S.E. Estrogens and breast cancer development: prospective blood collections. *Aromatase*, **54**, 14 (2002)
- Hermann, S., Linseisen, J., Chang-Claude, J. Nutrition and breast cancer risk by age 50: a population-based case-control study in Germany. *Nutr. Cancer*, **44**, 23-34 (2002)
- Ho, G.H., Luo, X.W., Ji, C.Y., Foo, S.C., Ng, E.H. Urinary 2/16 alpha-hydroxyestrone ratio: correlation with serum insulin-like growth factor binding protein-3 and a potential biomarker of breast cancer risk. *Ann. Acad. Med. Singapore*, **27**, 294-299 (1998)

- Hunter, D.J., Willett, W.C. Nutrition and breast cancer. *Cancer Causes Control*, **7**, 56-68 (1996)
- IMMUNA CARE Corporation. ESTRAMET™ urinary estrogen metabolite kit. Enzyme immunoassay kit for urinary estrogen metabolites (2-Hydroxyestrogen and 16 α -Hydroxyestrone). Bethlehem, PA 18015 USA (2002)
- Ishibe, M., Ishibashi, T. Kaneda, K., Koda, T., Rosier, R.N., Puzas, J.E. Stimulation of bone formation in vivo by insulin-like growth factor-II in rats. *Calcif. Tissue Int.*, **63**, 36-38 (1998)
- Jazaeri, O., Shupnik, M.A., Jazaeri, A.A., Rice, L.W. Expression of estrogen receptor alpha mRNA and protein variants in human endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **74**, 38-47 (1999)
- Jernstrom H., Klug, T.L., Sepkovic, D.W., Bradlow, H.L., Narod, S.A. Predictors of the plasma ratio of 2-hydroxyestrone to 16 α -hydroxyestrone among pre-menopausal, nulliparous women from four ethnic groups. *Carcinogenesis*, **24**, 991-1005 (2003)
- Kabat, G.C., Chang, C.J., Sparano, J.A., Sepkovic, D.W., Hu, X.P., Khalil, A., Rosenblatt, R., Bradlow, H.L. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**, 505-509 (1997)
- Kanaley, J.A., Sames, C., Swisher, L., Swick, A.G., Ploutz-Snyder, L.L., Steppan, C.M., Sagendorf, K.S., Feiglin, D., Jaynes, E.B., Meyer, R.A., Weinstock, R.S. Abdominal fat distribution in pre- and postmenopausal women: The impact of physical activity, age and menopausal status. *Metabolism*, **50**, 976-982 (2001)
- Kreienberg, R., Volm, T., Möbus, V., Alt, D. [Hrsg.] *Management des Mammakarzinoms*, 2. Aufl., Springer, Berlin (2002)
- Kuhl, H., Braendle, W. (Deutsche Menopause Gesellschaft) *Stellungnahme zu den Ergebnissen der WHI-Studie 2004* (Internet)
- Lahmann, P.H., Lissner, L., Gullberg, B., Olsson, H., Berglund, G. A prospective study of adiposity and postmenopausal breast cancer risk: the Malmo Diet and Cancer Study. *Int. J. Cancer*, **103**, 246-252 (2003)
- Lahmann, P.H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C.H., Khaw, K.T., Tehard, B., Berrino, F., Tjonneland, A., Bigaard, J., Olsen, A., Overvad, K., Clavel-Chapelon, F., Nagel, G., Boeing, H., Trichopoulos, D., Economou, G., Bellos, G., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Sacerdote, D., Krogh, V., Peeters, P.H., Bueno-de-Mesquita, H.B., Lund, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Pera, G., Quiros, J.R., Martinez, C., Tormo, M.J., Wirfalt, E., Berglund,

- G., Hallmans, G., Key, T.J., Reeves, G., Bingham, S., Norat, T., Biessy, C., Kaaks, R., Riboli, E. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int. J. Cancer*, **111**, 762-771 (2004)
- Lippert, T.H., Seeger, H., Mueck, A.O. Estradiol metabolism during oral and transdermal estradiol replacement therapy in the postmenopause. *Hormone Metab. Res.*, **30**, 598-600 (1998)
- Lippert, T.H., Seeger, H., Mueck, O.A. Metabolism of Endogenous Estrogens in: *Handbook of Experimental Pharmacology. Estrogens and Antiestrogens*. Oettel, M., Schiller, E. [Hrsg.], **135/1**, Springer, Berlin (1999a)
- Lippert, T.H., Seeger, H., Mueck, A.O. Beurteilung des Estrogen-Metabolismus bei hormonabhängigen Neoplasien unter klinisch-pharmakologischen Aspekten. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **49**, 649-662 (1999b)
- Lippert, T.H., Seeger, H., Mueck, A.O. The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis. *Steroids*, **65**, 357-369 (2000)
- Longcope, C., Flood, C., Femino, A., Williams, K.I. Metabolism of 2-methoxyestrone in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**, 277-282 (1983)
- Martucci, C.P., Fishman, J. P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol. Ther.*, **57**, 237-257 (1993)
- Matthews, C.E., Fowke, J.H., Dai, Q., Bradlow, H.L., Jin, F., Shu, X.O., Gao, Y.T., Longcope, C., Hebert, J.R., Zheng, W. Physical activity, body size, and estrogen metabolism in women. *Cancer Causes Control*, **15**, 473-481 (2004)
- McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., Adams-Campbell, L.L., Woods, N., Ockene, J., Women's Health Initiative Cohort Study. Recreational physical activity and risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA*, **290**, 1331-1336 (2003)
- Meilahn, E.N., De Stavola, B., Allen, D.S., Fentiman, I., Bradlow, H.L., Sepkovic, D.W., Kuller, L.H. Do urinary estrogen metabolites predict breast cancer? Guernsey III cohort follow-up. *Br. J. Cancer*, **78**, 1250-1255 (1998)
- Merriam, G.R., Brandon, D.D., Kono, S., Davis, S.E., Loriaux, D.L., Lipsett, M.B. Rapid metabolic clearance of the catecholestrogen 2-hydroxyestrone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1211-1213 (1980)

- Michnovicz, J.J., Hershcopf, R.J., Naganuma, H., Bradlow, H.L., Fishman, J. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1305-1309 (1986)
- Michnovicz, J.J., Galbraith, R.A. Effects of exogenous thyroxine on C-2 and C-16 alpha hydroxylations of estradiol in humans. *Steroids*, **55**, 22-26 (1990)
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. A strong candidate for breast cancer and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71 (1994)
- Miller, W.R. *Medical Intelligence Unit. Estrogen and breast cancer*, Springer, New York (1996)
- Mitrunen, K., Hirvonen, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat. Res.*, **544**, 9-41 (2003)
- Morabia, A., Bernstein, M., Heritier, S., Khatchatrian, N. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am. J. Epidemiol.* **143**, 918-928 (1996)
- Mueck, A.O., Seeger, H., Wallwiener, D. Endogenous estradiol metabolism during treatment with oral contraceptives. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **42**, 160-164 (2004)
- Muti, P., Bradlow, H.L., Micheli, A., Krogh, V., Freudenheim, J.L., Schunemann, H.J., Stanulla, M., Yang, J., Sepkovic, D.W., Trevisan, M., Berrino, F. Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. *Epidemiology*, **6**, 635-640 (2000)
- Nanda, K., Bastian, L.A., Schulz, K. Hormone replacement therapy and the risk of death from breast cancer: a systematic review. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **186**, 325-334 (2002)
- Osborne, M.P., Bradlow, H.L., Wong, G.Y., Telang, N.T. Upregulation of estradiol 16 α -hydroxylation in human breast tissue: Potential biomarker of breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, **85**, 1917-1920 (1993)
- Pasagian-Macaulay, A., Meilahn, E.N., Bradlow, H.L., Sepkovic, D.W., Buhari, A.M., Simkin-Silverman, L., Wing, R.R., Kuller, L.H. Urinary markers of estrogen metabolism 2- and 16alpha-hydroxylation in premenopausal women. *Steroids*, **61**, 461-467 (1996)

- Pfleiderer, A., Breckwoldt, M., Martius, G. [Hrsg.] *Gynäkologie und Geburtshilfe: Sicher durch Studium und Praxis*. 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, (1999)
- Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., Hendersson, B.E. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* **50**, 7415-7421 (1990)
- Rebbeck, T.R. Molecular epidemiology of the human glutathion S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol., Biomarkers and Prev.*, **6**, 733-743 (1997)
- Reed, M.J., Purohit, A. Aromatase regulation and breast cancer. *Clin. Endocrinol.*, **54**, 563-571 (2001)
- Remmele, W., Stegner, H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*, **8**, 138-140 (1987)
- Rock, C.L., Demark-Wahnefried, W. Can lifestyle modification increase survival in women diagnosed with breast cancer? *J. Nutr.*, **132**, 3504-3507 (2002)
- Roodi, N., Bailey, L.R., Kao, W.Y., Verrier, C.S., Yee, C.J., Dupont, W.D., Pare, F.F. Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 446-451 (1995)
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M., Ockene, J., Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, **288**, 321-333 (2002)
- Schmidt-Matthiesen, H., Bastert, G., Wallwiener, D. [Hrsg.] *Gynäkologische Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge der bösartigen Genitaltumoren und des Mammakarzinoms*. 6. Aufl., Schattauer, Stuttgart (2000)
- Schneider, J., Kinne, D., Fracchia, A., Pierce, V., Anderson, K.E., Bradlow, H.L., Fishman, J. Abnormal oxidative metabolism of estradiol in women with breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3047-3051 (1982)
- Schneider, J., Huh, M.M., Bradlow, H.L., Fishman, J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4840-4845 (1984)

- Schön, D., Bertz, J., Görsch, B. et al. *Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland: Gesundheitsberichterstattung für Deutschland*. Robert Koch-Institut, Berlin (2002)
- Schumacher, G., Neuhaus, P. The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, **127**, 405-410 (2001)
- Seeger, H., Mueck, A.O., Lippert, T.H. The antiproliferative effect of 17 β -estradiol metabolites on human coronary artery smooth muscle cells. *Med. Sci. Res.*, **26**, 481-482 (1998)
- Seeger, H., Mueck, A.O., Lippert, T.H. Effect of norethisterone acetate on estrogen metabolism in postmenopausal women. *Horm. Metab. Res.*, **32**, 436-439 (2000)
- Smith G., Stanley, L.A., Sim, E., Strange, R.C., Wolf, C.R. Metabolic polymorphism and cancer susceptibility. *Cancer Surv.*, **25**, 27-65 (1995)
- Stoll, B.A., Vattenn, L.J., Kvinnsland, S. Does early physical maturity influence breast cancer risk? *Acta Oncologica*, **33**, 171-176 (1994)
- Strowitzki, T., Wolff von, M. Hormonelle Situation der älteren Frau. *Gynäkologische Endokrinologie*, **1**, 26-31 (2002)
- Tavtigian, S.V. Simard, J., Rommerns, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J.F., Goldgar, D.E. et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat. Genet.* **12**, 333-337 (1996)
- Umemura, S., Itoh, J., Itoh, H., Serizawa, A., Saito, Y., Suzuki, Y., Tokuda, Y., Tajima, T., Osamura, R.Y. Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures? *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, **12**, 8-13 (2004)
- Union International Contre le Cancer. *TNM-Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Von Spiessl, B., Beahrs, O.H., Hermanek, P. et al. [Hrsg.] 3. Aufl., Berlin, Heidelberg, New York,... Springer-Verlag (1993)
- Ursin, G., London, S., Stanczyk, F.Z., Gentschein, E., Paganini-Hill, A., Ross, R.K., Pike, M.C. A pilot study of urinary estrogen metabolites (16 α -OHE1 and 2-OHE1) in postmenopausal women with and without breast cancer. *Environ. Health Perspec.*, **105**, 601-605 (1997)

- Ursin, G., London, S., Stanczyk, F.Z., Gentschein, E., Paganini-Hill, A., Ross, R.K., Pike, M.C. Urinary 2-hydroxyestrone/16 α -hydroxyestosterone ratio and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**, 1067-1072 (1999)
- Ursin, G., Wilson, M., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., Monroe, K., Lee, H.P., Seow, A., Yu, M.C., Stanczyk, F.Z., Gentschein, E. Do urinary estrogen metabolites reflect the differences in breast cancer risk between Singapore Chinese and United States African-American and white women? *Cancer Res.*, **61**, 3326-3329 (2001)
- Ursin, G., London, S., Yang, D., Tseng, C.C., Pike, M.C., Bernstein, L., Stanczyk, F.Z., Gentschein, E. Urinary 2-hydroxyestrone/16 α -hydroxyestrone ratio and family history of breast cancer in premenopausal women. *Breast Cancer Res. Treat.*, **72**, 139-143 (2002)
- Van den Brandt, P.A., Spiegelman, D., Yaun, S.S., Adami, H.O., Beeson, L., Folsom, A.R., Fraser, G., Goldbohm, R.A., Graham, S., Kushi, L., Marshall, J.R., Miller, A.B., Rohan, T., Smith-Warner, S.A., Speizer, F.E., Willett, W.C., Wolk, A., Hunter, D.J. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.*, **152**, 514-527 (2000)
- Vanderwalle, B., Lefebvre, J. Opposite effects of estrogen and catecholestrone on hormone-sensitive breast cancer cell growth and differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **61**, 239-146 (1989)
- Willett, W.C., Browne, M.L., Bain, C., Lipnick, R.J., Stampfer, M.J., Rosner, B., Colditz, G.A., Hennekens, C.H., Speizer, F.E. Relative weight and risk of breast cancer among premenopausal women. *Am. J. Epidemiol.*, **122**, 731-740 (1985)
- Zhu, B.T., Conney, A.H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, **19**, 1-27 (1998)
- Zumoff, B., Fishman, J., Cassouto, J., Hellman, L., Gallagher, T.F. Estradiol transformation in men with breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **26**, 960-966 (1966)

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A-Ring	Erster Ring im Steroidgrundgerüst (Cyclopentanoperhydrophenanthrens), bestehend aus drei Sechseringen mit einem Fünfering. Die Ringe werden als A-, B-, C- und D-Ring bezeichnet
ADH1	Alkoholdehydrogenase 1
AP	Alkalische Phosphatase
BMI	Body Mass Index
BRCA1 und 2	Breast Cancer Gene 1 und 2
Ca	Carcinom
CEE	Konjugierte equine Estrogene
C	Kohlenstoffatom
CI	Confidence Intervall
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COMT-Met	Polymorphismus der COMT
CYP 450	Cytochrom P450
CYP1A 1, 1B1, 2D6, 2E1, 17, 19,	Polymorphismen des Enzyms Cytochrom P450
d	Tag
D-Ring	siehe A-Ring
DBD	DNA binding domain
DCIS	Duktales carcinoma in situ
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteonsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol

E3	Estriol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER(+/-)	Estrogenrezeptor (positiv/negativ)
ERE	Estrogen response elements
Fibrös-zyst.	Fibrös-zystisch
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
G 1 - 3	Grading Schweregrad 1 - 3
GC	Gaschromatographie
GSTM1	Glutathion-S-Transferase M1
GSTT1	Glutathion-S-Transferase T1
HAA	Hormonell Active Agenzien
HDL	High density lipoproteins
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HRT	Hormone Replacement Therapy
IGF	Insulin-like growth factor
Ile-Val	Aminosäuren
IRS	Immunoreactive Score
JMP 5.0	Statistikprogramm
LBD	Ligand binding domain
LH	Luteinisierendes Hormon
log	Logarithmus zur Base 10
log Ratio	log 2-OHE/16 α -OHE
M.	Morbus
Max.	Maximum
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie
Min.	Minimum
MPA	Medroxyprogesteronacetat
MS	Massenspektroskopie

Msp1	Merozoite surface protein 1
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAT1 und 2	N-Acetyltransferase 1 und 2
neg.	negativ
2-OHE	2-Hydroxyestron
16 α -OHE	16 α -Hydroxyestron
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
OR	Odds Ratio
PA USA	Pennsylvania USA
pH	Potentia hydrogenii
pNPP	Paranitrophenylphosphat
pos.	positiv
PR(+/-)	Progesteronrezeptor (positiv/negativ)
prim.	primär
RR	Relatives Risiko
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
SE	Standardfehler
sek.	sekundär
SHBG	Sex hormone binding globulin
t-Test	Stichprobentest für normalverteilte Daten
TBS	Trispuffer Saline
TDLU	Terminal Duct Lobular Units
Tis	Carcinoma in situ
TM	Trademark
TNM	Stadieneinteilung maligner Tumoren
P53	Tumorsuppressorgen
UICC	Union International Contre le Cancer
WHI-Studie	Women's Health Initiative Studie
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Estrogenbiosynthese
- Abb. 2: Estrogenmetabolismus
- Abb. 3: Altersverteilung
- Abb. 4: Verhältnis von Karzinom/Kontrolle bezogen auf das Alter
- Abb. 5: BMI-Verteilung der Studienteilnehmerinnen
- Abb. 6: Log BMI-Verteilung der Studienteilnehmerinnen
- Abb. 7: Log BMI differenziert nach Menopausenstatus
- Abb. 8: Log BMI differenziert nach Karzinom/Kontrolle
- Abb. 9: Regressionsgeraden des log BMI
- Abb. 10: Verteilung der log Ratio
- Abb. 11: Log Ratio differenziert nach Karzinom/Kontrolle
- Abb. 12: Homogenitätsprüfung der Kategorien
- Abb. 13: Homogenitätsprüfung des Rezeptorstatus
- Abb. 14: Log Ratio differenziert nach Menopausenstatus
- Abb. 15: Ergebnis der multiplen logistischen Regression – Wechselwirkung der Einflussfaktoren auf die Wahrscheinlichkeit gesund zu sein
- Abb. 16: Ergebnis der Regressionsanalyse – Wechselwirkung verschiedener Einflussfaktoren auf die log Ratio
- Abb. 17: Einfluss von log E2 auf die log Ratio

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Estradiol- und Estronproduktion
- Tab. 2: Diagnosen Kontrollgruppe
- Tab. 3: Diagnosen Karzinomgruppe
- Tab. 4: Tumorgröße
- Tab. 5: Grading
- Tab. 6: Rezeptorstatus
- Tab. 7: Zusammenfassung von 2-OHE/16 α -OHE-Messungen unabhängiger
Forschungslabors
- Tab. 8: Anzahl Karzinomgruppe und Kontrollgruppe
- Tab. 9: Hormoneinnahme
- Tab.10: Rauchen
- Tab.11: Alkoholkonsum
- Tab. 12: BMI
- Tab. 13: Messung verschiedener Estrogene
- Tab. 14: Homogenität der Kategorien
- Tab. 15: Log Ratio differenziert nach prä- und postmenopausalen Frauen
- Tab. 16: Multiple logistische Regression bzgl. der Wahrscheinlichkeit gesund
zu sein - Variablenselektion
- Tab. 17: Regressionsanalyse bezüglich der log Ratio

Patientenaufklärung und -einverständnis

Patientinneninformation zur Untersuchung von Estrogenmetaboliten im Urin

Sehr geehrte Patientin,

die Universitätsfrauenklinik führt eine Untersuchung durch, wobei bei Patientinnen Abbauprodukte (Metaboliten) von weiblichen Geschlechtshormonen (Estrogene) im Urin untersucht werden sollen. Angeregt durch internationale Studien wollen wir überprüfen, ob man mit Hilfe des Estrogenstoffwechsels Hinweise auf bestimmte Brustkrankungen erhalten kann und evtl. ein erhöhtes Mamakarzinomrisiko (Brustkrebsrisiko) erkennen kann.

Ablauf der Untersuchung:

In einem für Sie bereitgestellten Becher bitten wir Sie einen Teil Ihres Morgenurins (Mittelstrahlurin, ca. 20 ml) zu sammeln. Das ist schon alles! Der Urin wird von uns abgeholt und untersucht.

Im Rahmen dieser Untersuchung sollen auch die weiblichen Geschlechtshormone im Blut untersucht werden, wobei bei der vor der Operation üblichen notwendigen Blutentnahme ein zusätzliches Blutröhrchen (7,5 ml) abgenommen wird. Dies geschieht durch eine Venenpunktion am Unterarm oder der Hand. Komplikationen bei Blutentnahmen sind äußerst selten und beinhalten eine mögliche Infektion sowie die Bildung eines Blutergusses („blauer Fleck“) an der Punktionsstelle.

Da die Urin- und Blutproben erst (tiefgefroren) gelagert und dann gesammelt anonym (ohne Angabe Ihres Namens) gemessen werden, können wir Ihnen die Messergebnisse nicht mitteilen.

Ein direkter Nutzen für Sie durch die Teilnahme an dieser Studie ist nicht zu erwarten. Wir erhoffen jedoch durch diese Untersuchung in der Zukunft Frauen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko identifizieren zu können. Die Teilnahme an dieser Studie ist vollkommen freiwillig und es besteht für sie jederzeit die Möglichkeit, die Zusage zur Teilnahme an dieser Studie ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die Behandlung zurückzuziehen. Sollte von Ihnen die Einwilligung widerrufen werden, werden die von Ihnen erhaltenen Blut- und Urinproben vernichtet.

Weil gerade Alter, Nationalität, manche Erkrankungen und auch Medikamente (vor allem Hormonpräparate) den Stoffwechsel von Hormonen beeinflussen können, möchten wir Sie bitten den beigelegten Fragebogen auszufüllen.

Alle im Rahmen dieser Studie erhobenen personenbezogenen Daten werden entsprechend der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Bestimmungen vertraulich behandelt. Die Weitergabe der Daten und ihre wissenschaftliche Auswertung erfolgt anonymisiert, d.h. ohne Angabe ihres Namens, lediglich mit Ihren Initialen versehen.

Die Teilnahme an dieser Studie schließt eine mögliche Einsichtnahme in Ihre Krankenakte und Weitergabe von anonymisierten Krankheitsdaten (ohne Angabe Ihres Namens) an autorisierte Mitarbeiter der Studienleitgruppe sowie die zuständigen Gesundheitsbehörden zu Überprüfungszwecken ein. Dies dient dazu, die Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen und des Prüfplans dieser Studie zu gewährleisten. Die korrekte und vollständige Aufzeichnung aller Daten ist besonders wichtig für den Forschungszweck und dient damit auch der Sicherheit zukünftiger Patientinnen. Die Ergebnisse der Studie können in Form einer wissenschaftlichen Arbeit veröffentlicht und bei der Gesundheitsbehörde eingereicht werden. Die Anonymität der Studienteilnehmer bleibt selbstverständlich auch in diesem Fall gewahrt.

Wir bedanken uns recht herzlich für Ihre Mitarbeit und wünschen Ihnen eine baldige Genesung.

Prof. Dr. med. D. Wallwiener, Ärztlicher Direktor der Frauenklinik

Dr. med. J. Huober, Oberarzt der Frauenklinik

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A.O. Mueck, Leiter des Bereichs experimentelle Endokrinologie und Menopausenforschung der Frauenklinik

Der Einfluss unterschiedlicher Estrogenmetaboliten auf das Mammakarzinomrisiko

Einwilligungserklärung

Name des Arztes:

Anschrift:

Name der Patientin:

Anschrift:

Über Wesen, Bedeutung und Tragweite dieser klinischen Studie bin ich von o.g. Arzt eingehend informiert worden. Über die theoretisch denkbaren Risiken bin ich unterrichtet worden. Ich bin über den gesamten Ablauf und den Zweck der Studie vollständig informiert worden. Ich wurde darauf hingewiesen, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen kann, ohne nachteilige Folgen für meine weitere ärztliche und medizinische Versorgung.

Die mir erteilten Informationen habe ich inhaltlich voll verstanden. Die schriftliche Patientinneninformation und eine Kopie dieses Einwilligungsschreibens ist mir ausgehändigt worden. Über die datenschutzrechtlichen Bestimmungen bin ich aufgeklärt worden. Patientendaten werden streng vertraulich behandelt und ohne Angabe des Namens ausgewertet.

Zur Kontrolle des Prüfergebnisses kann ein Vergleich mit meinen Krankendaten erforderlich sein. Zu diesem Zweck willige ich ein, dass die zuständigen Überwachungsbehörden oder die zuständige Bundesoberbehörde Einblick in meine Patientenunterlagen nehmen können. Zu diesem Zweck entbinde ich die behandelnde Ärztin/den behandelnden Arzt von ihrer/seiner Schweigepflicht. Dabei habe ich das Recht jederzeit zu erfahren, welche Daten weitergegeben werden. Die Bestimmungen des Datenschutzes werden in jedem Fall beachtet.

Datum, Unterschrift Patientin

Datum, Unterschrift Arzt

Fragebogen

Patientin

Geburtsjahr

1. Wie groß sind Sie?
2. Wieviel kg wiegen Sie?
3. Welcher Nationalität gehören Sie an?
4. Ihre letzte Regelblutung war am:
5. Aufgrund welcher Erkrankung/Beschwerden erfolgte die Einweisung?
 - ✓ Knoten in der Brust
 - ✓ Zyste in der Brust
 - ✓ Absonderung aus der Brustdrüse
 - ✓ Schmerzen in der Brust
 - ✓ Anderes
6. Haben Sie in den letzten 3 Monaten täglich Geschlechtshormone (z.B. Antibabypille oder Wechseljahrmedikamente) eingenommen oder andersweitig zugeführt (z.B. Pflaster oder Gel)?
 - ✓ Nein
 - ✓ Ja, wenn ja, welche:
 - seit:
 - Dosierung:
7. Haben Sie in den letzten 3 Monaten täglich Medikamente eingenommen?
 - ✓ Nein
 - ✓ Ja, wenn ja welche:
 - seit:
 - Dosierung:
8. Rauchen Sie zur Zeit oder haben Sie die letzten 3 Monate geraucht?
 - ✓ Nein
 - ✓ Ja, wenn ja wie viele Zigaretten/Tag:
9. Trinken Sie alkoholische Getränke?
 - ✓ Nein
 - ✓ Ja, wenn ja wie oft und wieviel? Pro Tag, pro Woche, pro Monat?
10. Hat ein Arzt eine der folgenden Krankheiten bei Ihnen festgestellt?
 - ✓ Leberzirrhose
 - ✓ Fettleber
 - ✓ Nierenerkrankung, wenn ja welche:
 - ✓ Stoffwechselerkrankung, wenn ja welche:
 - ✓ Autoimmunerkrankung, wenn ja welche:

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn Privatdozent Dr. Jens Huober, Universitätsfrauenklinik Tübingen, danke ich ganz herzlich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit und die jederzeit möglichen kritischen Diskussionen. Durch seine Menschlichkeit und sein stets offenes Ohr für jegliche Art von Fragen ermöglichte er eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und trug wesentlich zum Erfolg und zur Fertigstellung der Arbeit bei.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. Diethelm Wallwiener, Ärztlicher Direktor der Universitätsfrauenklinik Tübingen, für die Möglichkeit der Studiendurchführung an der Universitätsfrauenklinik Tübingen danken, sowie für die Nutzung der dortigen Labors für die Messungen der Estrogene und des FSH.

Herrn Privatdozent Dr. Harald Seeger, Universitätsfrauenklinik Tübingen, danke ich für die Koordination der Studie und die Durchführung des ELISA sowie für seine zahlreichen konstruktiven Vorschläge. Er war unmittelbarer und jederzeit verfügbarer Ansprechpartner bei allen Problemen und Fragen; seine Ideen und hilfreichen Anregungen waren ein wichtiger Beitrag zum Gelingen der Arbeit. Durch seine Förderung und uneingeschränkte Unterstützung meines wissenschaftlichen Arbeitens war auch die Teilnahme an Kongressen und die Auszeichnung mit dem Christian Lauritzen Preis möglich.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Dr. Alfred O. Mueck, Leiter des Bereichs experimentelle Endokrinologie der Universitätsfrauenklinik Tübingen, für sein Engagement bei der Leitung der Studie und seine zahlreichen Beiträge und Veröffentlichungen zum Thema Hormone und Menopause.

Ebenso herzlich danke ich Herrn Dr. Hans-Peter Dürr, Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen, für die statistische Auswertung der Daten sowie für seine unglaubliche Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Interpretation und der Darstellung der Ergebnisse.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Dagmar Diesing, Universitätsfrauenklinik Tübingen, danke ich ebenfalls für Ihr Engagement, ihre Energie und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Sigrid Herter, Studienzentrale Universitätsfrauenklinik Tübingen, für die Mithilfe beim Sammeln der Proben sowie Ihren unermüdlichen Einsatz bei der Patientinnenrekrutierung.

Ein großes Dankeschön allen MTAs des Labors der Universitätsfrauenklinik Tübingen für die Durchführung der Routinemessungen von E2 und FSH.

Ebenso möchte ich mich bei allen Krankenschwestern der gynäkologischen Stationen der Universitätsfrauenklinik Tübingen bedanken, ohne deren Mithilfe die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wäre.

Allen Frauen, die sich bereit dazu erklärt haben, an der Studie teilzunehmen, bin ich von ganzem Herzen dankbar.

Danken möchte ich außerdem meiner Schwester Ursula Bertenrath für das Korrekturlesen und meinem Bruder Georg Zimmermann für seine Unterstützung und seinen stets guten Rat.

Nicole Stenzl und Marc Jurrat danke ich ganz herzlich für „die Wellnesswoche“ inklusive Unterstützung bei der Schaubildproblematik sowie für das 1a-Qualitätsmanagement.

Bei Karsten Flügge und Bruno Arbter bedanke ich mich ganz herzlich „für den Versuch“.

Ein großes Dankeschön an Jette Schenk, Birte Huber und Heike Schultz für Motivationsschübe und „Balsam für die Seele“.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Georg und Marita Zimmermann, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Birgit Sybille Zimmermann

Geburtsdatum: 20.03.1976

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/82 – 07/86 Mozartschule Schwäbisch Gmünd

08/86 – 06/95 Hans-Baldung-Gymnasium Schwäbisch Gmünd

21.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

10/95 - 02/99 Hochschule für Bibliotheks- und Informations-
wesen Stuttgart

26.02.1999 Diplom in Wissenschaftliches Bibliothekswesen

04/99 - 10/99 Studium der Humanmedizin an der
Freien Universität Berlin und der

10/99 - 03/04 Eberhard Karls Universität Tübingen

21.03.2002 Erstes Staatsexamen

29.03.2004 Zweites Staatsexamen

04/04 - 04/05 Praktisches Jahr an der
Charité - Universitätsmedizin Berlin

18.06.2004 Christian Lauritzen Preis
der Deutschen Menopause Gesellschaft e.V.

27.06.2005 Drittes Staatsexamen

27.06.2005 Approbation

Berufstätigkeit:

seit 09/05 Assistenzärztin - Klinikum Augsburg Chirurgie