

Aus dem Departement für Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und dem ER β -Agonisten ZK 281738
auf das Mammagewebe der Sprague-Dawley-Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mareike Ernst

aus Duderstadt

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke
2. Berichterstatter/in:
3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Die Hormonersatztherapie (HET) und Brustkrebs	6
1.2 Allgemeines zu Sexualsteroiden	9
1.2.1 Das Östrogen (17 β -Östradiol (E2))	9
1.2.2 Die Östrogenrezeptoren (ER α und ER β)	10
1.3 Das Klimakterium	12
1.4 Das tierexperimentelle Modell	13
1.4.1 Mikroskopische Abbildung der Mammastrukturen	14
1.5 Die Expression von ER α und ER β in der Rattenbrustdrüse	15
1.6 Die Entstehung des Mammakarzinoms	15
1.7 Die verwendeten Substanzen	17
1.7.1 17 β -Östradiol (E2)	17
1.7.2 Das Antiöstrogen ICI 182,780 (Fulvestrant)	17
1.7.3 Der ER α -Agonist: ZK 281471 und der ER β -Agonist: ZK 281738	18
1.8 Das Ziel der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Tierversuch	20
2.1.1 Gesetzliche Bestimmungen	20
2.1.2 Die Versuchstiere und ihre Haltung	20
2.1.3 Verwendetes Futter	20
2.1.4 Zeitlicher Versuchsablauf	21
2.1.5 Die Identifikation der Tiere	22
2.1.6 Die Ovariectomie	22
2.1.7 Die subkutane (s.c) Injektion	22
2.1.8 Die Tötung der Ratten	22
2.2 Die histologischen Präparationsschritte zur Aufarbeitung der Mammae	23
2.2.1 Die Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung)	24
2.3 Statistische Auswertung	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Bestimmung des Uterusgewichtes	27
3.2 Prolaktin-Konzentration im Serum	28
3.3 LH-Konzentration im Serum	29
3.4 Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Duktus	30
3.5 Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Lobuli 1	31
3.6 Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Lobuli 2	32
3.7 Die histologischen Bilder des Mammagewebes nach Behandlung mit den Testsubstanzen	33
3.7.1 E2-Effekte auf das Mammagewebe	33
3.7.2 Der Einfluss des ER α -Agonisten (ZK 281471) auf das Mammagewebe	36
3.7.3 Die Wirkung des ER β -Agonisten (ZK 281738) auf das Mammagewebe	39
4. Diskussion	42
4.1 Ziel der Arbeit	42
4.2 Versuchsaufbau	42
4.3 Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Uterusgewicht	43
4.4 Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Serum-Prolaktin	43

4.5 Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Serum-LH	44
4.6 Die Effekte von E2 am Mammagewebe	45
4.7 Der ER α -Agonist ZK 281471 und ER β -Agonist ZK 281738	48
4.7.1 Der Einfluss des ER α -Agonisten ZK 281471 auf das Mammagewebe	48
4.7.2 Die Effekte des ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Mammagewebe	49
5. Zusammenfassung	52
7. Literaturverzeichnis	56
8. Abbildungsverzeichnis	60
9. Tabellenverzeichnis	60

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
E2	17β-Östradiol
ER (α, β)	Östrogenrezeptor (α, β)
EREs	estrogen-response-elements
Fa.	Firma
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
H	hoch
HE	Hämatoxylin-Eosin
HET	Hormonersatztherapie
ICI	Antiöstrogen (ER-Antagonist: Fulvestrant)
IMS	International Menopause Society
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L	Lendenwirbel
LH	luteinisierendes Hormon
M	mittel
MARIE	Mammakarzinom-Risikofaktoren-Erhebung
µg	Mikrogramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
MPA	Medroxyprogesteronacetat
N	niedrig
Ovx	Ovarektomie
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
S.	Seite
s.c.	subkutan
SD-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
sec.	Sekunden
SEM	standard error of the mean
SERD	Selektiver Östrogenrezeptor-Downregulator
SIS	Soft Imaging System
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
WHI	Women's Health Initiative
ZK 281471	ERα-Agonist
ZK 281738	ERβ-Agonist

1. Einleitung

1.1 Die Hormonersatztherapie (HET) und Brustkrebs

Aufgrund des Östrogenmangels in der Postmenopause entwickeln sich häufig Symptome wie Hitzewallungen und Libidoverlust sowie Erkrankungen zu denen beispielsweise Osteoporose zählt oder Atrophieerscheinungen des Urogenitalsystems und der Haut. Die HET wirkt diesen Veränderungen zwar entgegen, beinhaltet jedoch zugleich das erhöhte Risiko, an Mamma- und Endometriumkarzinomen, Venenthrombosen, Schlaganfällen und Herzinfarkten zu erkranken (Freeman et al. 2007). Das Mammakarzinom stellt in der westlichen Welt die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar (Russo IH und Russo J 1996). In Deutschland erkranken jährlich über 55.100 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 23.200 im Alter unter 60 Jahren (<http://www.gekid.de> 2008). Die Thematik der aktuell noch immer sehr umstrittenen HET als kausaler Zusammenhang zu Brustkrebs bildet die experimentelle Basis dieser Arbeit.

Anhand des Mammagewebes der Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratte) werden die Einflüsse von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und dem ER β -Agonisten ZK 281738 in verschiedenen Einzeldosen sowie in Kombination mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 untersucht.

Seit der 2002 veröffentlichten Women's-Health-Initiative(WHI)-Studie stieg das wissenschaftliche Interesse an der Erforschung neuer therapeutischer Strategien für eine HET, die das Brustkrebsrisiko nicht begünstigt. Die in den USA durchgeführte WHI-Studie hatte als Hauptziel, den langfristigen Nutzen der HET gegenüber Placebo in Bezug auf eine Risikoreduktion einer koronaren Herzkrankheit bei gesunden Frauen zu evaluieren. Dieser mögliche Nutzen sollte dem Erkrankungsrisiko, an einem invasiven Mammakarzinom zu erkranken, gegenübergestellt werden. Zudem wurde der Einfluss auf die Hüftfrakturrate, das Risiko für Schlaganfall, venöse Thromboembolien, Endometrium- und Kolonkarzinom sowie die Gesamt-Mortalität erfasst (Schmidt und Kimmig 2006). Verwendet wurde in dieser multizentrischen, prospektiven Studie die orale Kombination von konjugierten equinen Östrogenen (0,625mg/Tag) und Medroxyprogesteronacetat (MPA, 2,5mg/Tag) im Vergleich zu Placebo. Eine dritte Gruppe hysterektomierter Frauen wurde nur mit konjugierten equinen Östrogenen (ohne MPA) behandelt. Das Alter der Frauen betrug bei Studienbeginn im Mittel 63 Jahre (Heufelder 2002). Im Sommer 2002 wurde nach 5,2 Jahren die Behandlung der Frauen, die konjugierte equine Östrogene + MPA bekamen, eingestellt, da die nachteiligen Effekte gegenüber dem Nutzen der HET überwogen.

Es traten zwar weniger Hüftfrakturen, Kolon- und Endometriumkarzinome auf, dagegen zeigten sich jedoch, verglichen mit der Placebogruppe, öfter Brustkrebs (+25%), Herzinfarkt (+30%), Schlaganfall (+40%) und Venenthrombosen (+50%) (Prelevic et al. 2005). Die Behandlung der Frauen, die ausschließlich konjugierte equine Östrogene erhalten hatten, wurde ebenfalls, aufgrund der erhöhten Schlaganfallinzidenz, sowie einer fehlenden Reduktion kardiovaskulärer Erkrankungen, vorzeitig beendet (Stefanick et al. 2006). Diese Studienergebnisse beeinflussten die Nutzen-Risiko-Balance der HET nachteilig.

Die Million Women Study, publiziert im August 2003, erbrachte ähnliche Resultate. Zwischen 1996 und 2001 untersuchte diese Studie 1084110 Frauen mit HET. Auch hier zeigte sich insbesondere in der Kombination von Östrogen-Progesteron-Präparaten eine erhöhte Brustkrebsinzidenz (Beral 2003; Roth et al. 2006).

Weitere Daten zum Brustkrebsrisiko unter HET stellte die Deutsche Menopause Gesellschaft (Teil der IMS) im Frühjahr 2007 mit der Mammakarzinom-Risikofaktoren-Erhebung (MARIE) vor. Sie bestätigte die Daten der WHI – wies jedoch auch einige Unterschiede auf: Eine HET mit E2 und Progesteron in Kombination über mehr als fünf Jahre erhöht das Brustkrebsrisiko, im Gegensatz zur WHI-Studie zeigte sich jedoch in der MARIE-Studie eine relativ rasch sinkende Inzidenz des Brustkrebsrisikos nach dem Absetzen der HET. Wie in der WHI-Studie ist die reine Östrogentherapie mit einer steigenden Inzidenz von Mammakarzinomen verknüpft (Siegmund-Schultze et al. 2008).

Andere Studien wiesen bei der E2-Monotherapie im Vergleich zur Kombination mit Progesteron ein geringeres Brustkrebsrisiko nach (Conner et al. 2008) oder es zeigte sich ein erhöhtes Brustkrebsrisiko erst nach langjähriger Hormonsubstitution (>15 Jahre) (Chen et al. 2006) bei gleichzeitiger Inzidenzminderung kolorektaler Karzinome (Corrao et al. 2008).

Auch die kurzfristige HET (5 Jahre) kann ein erhöhtes Brustkrebsrisiko darstellen. Hierbei liegt das Risiko für die E2-Monotherapie bei 2-3 Brustkrebserkrankungen/1000 Frauen im Vergleich zur E2-Gestagen-Kombinationstherapie mit 4-6 Brustkrebsfällen/1000 Frauen. Eine Hormonsubstitution von weniger als 5 Jahren führt zu keiner Zunahme der Brustkrebsinzidenz (Lyytinen et al. 2006). Zudem variiert das Brustkrebsrisiko mit der Applikationsform der HET: die orale Substitution von E2 + Progesteron erhöht das Brustkrebsrisiko (Opatrny et al. 2008). Im Gegensatz dazu ist die Kombination von E2 + Dydrogesteron, appliziert als Gel oder Pflaster, mit einem geringeren Brustkrebsrisiko assoziiert (Fournier et al. 2008). Die transdermale Therapie zeigte generell ein verringertes Brustkrebsrisiko (Corrao et al. 2008).

Trotz der beschriebenen Nebenwirkungen spielt die östrogenbasierte Therapie der klimakterischen Symptome weiterhin eine bedeutende Rolle, zumal es nur wenige effektive Alternativen zur HET gibt, die ebenso wirksam sind (Pitkin et al. 2004). Aktuell wird empfohlen, Nutzen und Risiken einer HET sorgfältig abzuwägen, sowie die Verabreichungsform und Dosis individuell anzupassen (Canderelli et al. 2007). Demnach sollte nur bei mittelschweren bis starken klimakterischen Symptomen, Klimakterium praecox sowie keinem bestehenden Brustkrebs-, Thrombose- oder Herzinfarkttrisiko, zeitlich begrenzt, eine möglichst niedrig dosierte Hormonsubstitution erfolgen (MacLennan 2007; Skouby et al. 2005). Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine Kontraindikation für eine HET dar (Caufriez 2007).

Obwohl die HET infolge der verschiedenen Studien stark in Verruf geraten ist und ihre Anwendung weiterhin sorgsam bedacht werden sollte, ist ihre Effektivität in der Therapie der klimakterischen Symptomatik unbestritten. Oftmals genügen bereits geringste Dosen, um die Lebensqualität der Frauen erheblich zu verbessern (Canderelli et al. 2007)

Diesbezüglich ist eine Fall-Kontroll-Studie aus Japan erwähnenswert, welche die Brustkrebsinzidenz unter HET von japanischen und westlichen Frauen verglich. Erstaunlicherweise ergab diese Studie bei den japanische Frauen eine signifikant negative Korrelation zwischen der HET und Brustkrebs. Es wird vermutet, dass das Alter, die Anzahl der Geburten, das Alter bei Menarche und Menopause sowie das Rauchen oder Stillen in der Vergangenheit als individuelle Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms von größerer Bedeutung sind als die HET (Saeki et al. 2008).

1.2 Allgemeines zu Sexualsteroiden

17 β -Östradiol (E2) zählt neben Progesteron und Testosteron zur Gruppe der Sexualsteroidhormone. Sie leiten sich vom Cholesterol ab und werden in Nebennierenrinde, Testes und Ovar synthetisiert (Nilsson et al. 2001). Zum Transport im Blut binden sie an Proteine (Sexualhormonbindungsglobuline). Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Transkriptionsänderung spezifischer Gene, deren Liganden beziehungsweise Aktivatoren sie darstellen. Folglich lassen sich die Steroidhormonrezeptoren in die Klasse der ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren eingliedern. Der Abbau der Sexualsteroiden findet hauptsächlich in der Leber statt, wo sie gekoppelt an Sulfat oder Glucuronsäure mit der Galle oder dem Harn ausgeschieden werden (Löffler 2003; Silbernagel 2001).

1.2.1 Das Östrogen (17 β -Östradiol (E2))

Östrogene regulieren zahlreiche physiologische Prozesse, wie die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale, Uteruswachstum, Erhöhung der Knochendichte und die Menopause. Zudem wirken Östrogene protektiv auf das kardiovaskuläre System. Sie führen zum Anstieg des High-density-Lipoproteins (HDL), das den Cholesterinabbau fördert und so das Arterioskleroserisiko vermindert (Dietel 2003). Sie nehmen jedoch auch Einfluss auf pathologische Prozesse hormonabhängiger Krankheiten; hierzu zählen Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs (Matthews und Gustafsson 2003). Östrogene sind sowohl im weiblichen als auch im männlichen Organismus vorhanden. Entstehungsort bei der Frau ist das Ovar, beim Mann werden die Östrogene in den Testes gebildet. Geringe Mengen werden bei beiden Geschlechtern in der Nebennierenrinde und dem Fettgewebe synthetisiert (Enmark und Gustafsson 1999). Entscheidend für die Östrogensynthese ist die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Die pulsatile Freisetzung des hypothalamischen GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) führt zur Sekretion von FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse. Unter dem Einfluss von FSH reift im Ovar zunächst ein Follikel heran. Stimuliert durch LH wird in den Theka-Interna-Zellen des Ovars, ausgehend vom Cholesterin, Testosteron synthetisiert. Im Ovar kann Cholesterin de novo synthetisiert werden, aber es kann auch das Cholesterin aus zirkulierenden Lipoproteinen zur Steroidhormonbildung verwendet werden. Nach Diffusion über die Follikelflüssigkeit gelangt das Testosteron in die Granulosazellen, wo zunächst durch Hydroxylierung die Methylgruppe des Testosterons am C-Atom 19 abgespalten wird (Löffler 2003).

Anschließend katalysiert die in den Granulosazellen vorhandene Aromatase durch Aromatisierung am A-Ring des Testosterons dessen Umwandlung in das biologisch aktive Östrogen 17 β -Östradiol (E2) (Purohit et al. 2002).

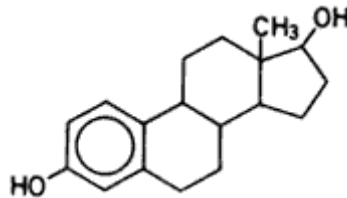


Abbildung 1: Strukturformel von 17 β -Östradiol (E2) (Online 2008)

Konstant hohe Östrogenspiegel führen zur negativen Rückkopplung des Hypothalamisch-Hypophysären Regelkreises, der sich auf diese Weise selbst reguliert (Löffler 2003).

Der Mechanismus, über den Östrogene im Zielgewebe wirksam werden, beinhaltet die Bindung an einen nukleären oder auf der Zellmembran befindlichen Steroidrezeptor, entweder den Östrogenrezeptor (ER) α oder β (Marino et al. 2005).

1.2.2 Die Östrogenrezeptoren (ER α und ER β)

Gemäß Enmark und Gustafsson wurde der Östrogen-Rezeptor (ER α) 1958 von Jensen und Jakobsen entdeckt und 1986 aus dem Uterus kloniert (Enmark und Gustafsson 1999). Bis 1995 bestand die Annahme, daß nur ein Östrogenrezeptor existiert, welcher für die Effekte der natürlichen und künstlich synthetisierten Östrogen-derivate verantwortlich ist. Diese These konnte 1996 mit der Ermittlung des zweiten Östrogenrezeptors (ER β) anhand eines cDNA-Klons der Rattenprostate widerlegt werden (Kuiper et al. 1996). ER α und ER β zählen zu den ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, die der Steroidhormonsuperfamilie der Nukleinsäure-Rezeptoren angehören. Sie besitzen große strukturelle Ähnlichkeit zueinander und setzen sich aus mehreren Domänen zusammen (Matthews und Gustafsson 2003; Nilsson et al. 2001).

Die Bindung eines Liganden induziert am ER α oder ER β eine Konformationsänderung. Der Liganden-Östrogen-Rezeptor-Komplex reguliert schließlich, in Verbindung mit estrogen-response-elements (EREs) der DNA, die Transkription östrogensensitiver Gene (Nilsson et al. 2001). Hierbei kann sowohl eine Aktivierung als auch Inhibition der Transkription auftreten.

Welche Impulse jeweils zu agonistischen oder antagonistischen Wirkungen führen, beruht auf komplexen Interaktionen zwischen Liganden, ERs, Koregulatorproteinen und EREs und ist bisher noch nicht bis ins Detail geklärt (Marino et al. 2005).

Die ERs zeigen in verschiedenen Körpergeweben Präsenz: ER α ist in Hypophyse, Niere, Nebenhoden, Knochen, Leber, Uterus und weißem Fettgewebe exprimiert und ER β in Harnblase, Speicheldrüse, Gefäßendothel und Lunge; im Ovar, Gehirn, Prostata, Brust und Hoden sind beide ERs etwa zu gleichen Anteilen lokalisiert (Dahlman-Wright et al. 2006). Beim Vorhandensein beider ERs fungiert der ER β als dominierender Modulator der Östrogensignalinduktion, der in Koexpression mit dem ER α denselben inhibiert. Es besteht gewissermaßen eine "Balance" zwischen ER α und β , die sich durch ihre agonistischen und antagonistischen Wirkungen gegenseitig beeinflussen (Matthews und Gustafsson 2003).

1.3 Das Klimakterium

Das Klimakterium bezeichnet die Übergangsphase von der vollen Geschlechtsreife bis zur Postmenopause. Bei einer relativ großen Schwankungsbreite beginnt das Klimakterium etwa in der Zeit zwischen dem 45. und 60. Lebensjahr (Schwenkhagen 2007). Das deutlichste Signal für den Beginn des Klimakteriums ist das Sistieren der Menstruation. Die letzte natürliche Menstruationsblutung der Frau ist als Menopause definiert. Der ihr unmittelbar vorausgehende Zeitabschnitt wird als Prämenopause, die Zeit danach als Postmenopause bezeichnet (Ribot und Tremollieres 2007). In der Prämenopause kann das Regelblutungsmuster sehr variabel sein; meist verkürzen sich die Zyklen aufgrund der beschleunigten Follikelrekrutierung bzw. -reifung. Bei lutealer Insuffizienz mit Progesteronmangel und progredienter Ovarialinsuffizienz kommt es zu anovulatorischen Zyklen mit verminderter E2-Produktion (17 β -Estradiol). Der „relative E2-Mangel“ führt prämenopausal zu beginnenden vasomotorischen und vegetativen Störungen, wie z.B. Ödemen und Gewichtszunahme (Burger et al. 2007). Während der Postmenopause bewirken die niedrigen E2-Blut-Spiegel einen Anstieg der Gonadotropine FSH und LH. Zudem kommt es zum Abfall der Androgene, die damit für eine Aromatisierung zu Östrogen nicht mehr zur Verfügung stehen (Schwenkhagen 2007). Der „absolute“ E2-Mangel in der Postmenopause verursacht häufig Schleimhautatrophisierungen (Colpitis senilis), neurovegetative Symptome, Inkontinenz, Vaginitis, Dyspareunie, Beckenbodensenkung, Arteriosklerose und Osteoporose (Burger et al. 2007). Die Brustdrüse wird mit dem Einsetzen der Menopause nicht mehr ausreichend durch Östrogene stimuliert, infolgedessen atrophiert ihr sekretorischer Anteil (Gratzl 2002).

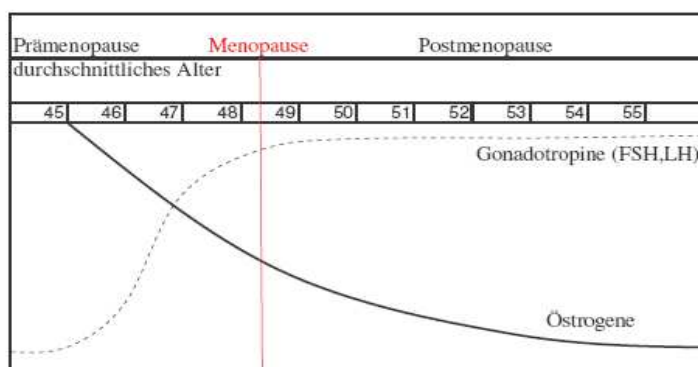


Abbildung 2: Östrogenkurve im Klimakterium

1.4 Das tierexperimentelle Modell

Das Modell der Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratte) bildet aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum menschlichen Brustgewebe ein sehr geeignetes Modell zur Analyse und präziseren Erforschung der durch Pharmaka (HET) evozierten Brustkrebskarzinogenese. Die SD-Ratte gilt als Standardmodell zur Erforschung endokrinologischer Fragestellungen (Russo IH und Russo J 1996). Die weibliche Ratte besitzt sechs Brustdrüsenpaare: jeweils drei in der Thorax- und drei in der Abdominalregion. Ausgehend von der Mamille befindet sich der Rest der Brustdrüse dorsolateral als subkutaner Anteil im fibroadipösen Gewebe (Russo IH und Russo J 1996). Die Drüsenkörper gliedern sich in Einzeldrüsen (Lappen, Lobi), die durch Bindegewebe weiter in Drüsenläppchen (Lobuli) unterteilt werden. Die alveolären Drüsenendstücke (Azini, Alveolen) der Lobuli bilden das sekretorische Organ. Zu jedem Lobulus gehört ein Ausführungsgang (Duktus), der auf der Brustwarze mündet (Stauber und Weyerstahl 2005). Der beschriebene strukturelle Aufbau des Brustdrüsengewebes ist bei Mensch und Ratte identisch und wird unter Abbildung 3 in einer abstrahierten Zeichnung dargestellt. Für die Stimulation und Zellproliferation der Brustdrüse sind Östrogene verantwortlich, ihre Differenzierung wird durch Progesteron reguliert (Russo IH und Russo J 1996).

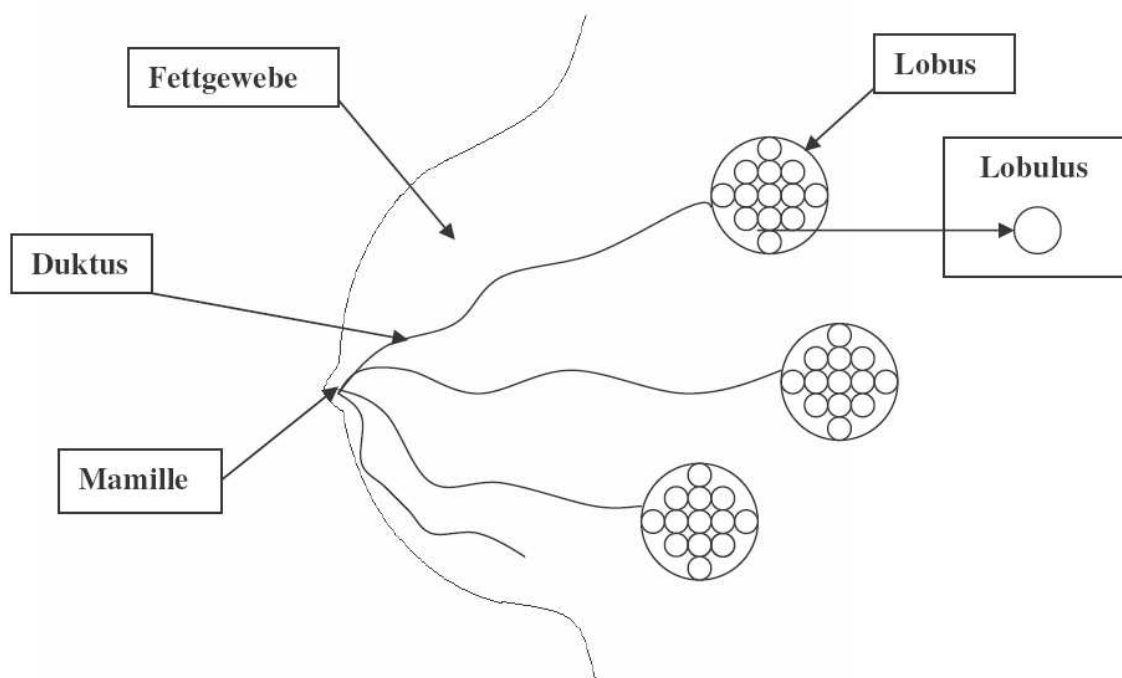


Abbildung 3: Abstrahierte Darstellung des Brustdrüsengewebes (Mensch/Ratte)

1.4.1 Mikroskopische Abbildung der Mammastrukturen

In der folgenden Abbildung werden Bildauschnitte der einzelnen Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und Lobulus 2 gezeigt.

Eine Alveolenanzahl von 5-10 definiert den Lobulus 1, 11-20 Alveolen den Lobulus 2.

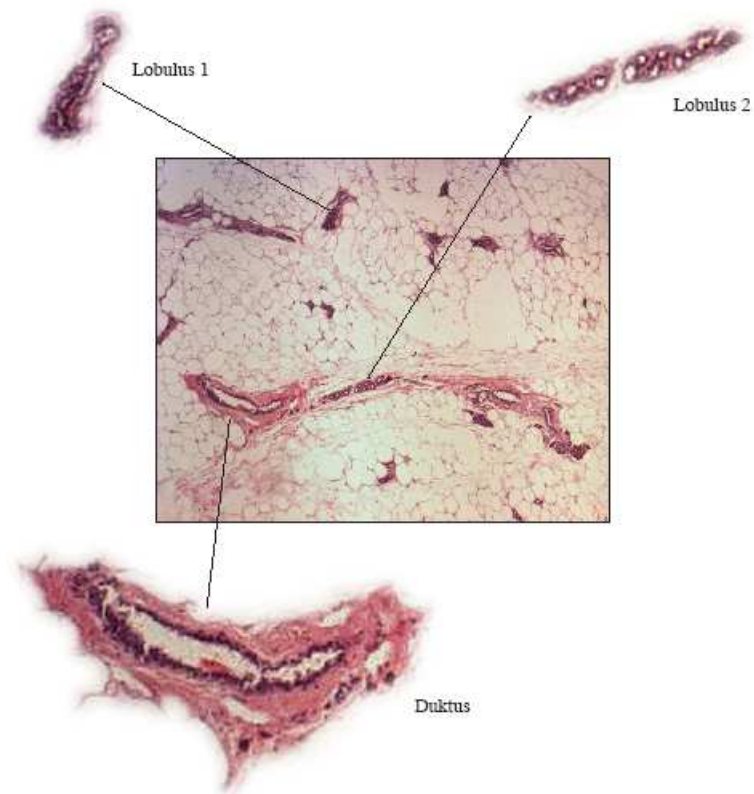


Abbildung 4: Mikroskopische Abbildung der Mammastrukturen, ($\times 2,5$), HE

1.5 Die Expression von ER α und ER β in der Rattenbrustdrüse

Ex-vivo-Studien konnten die Existenz beider ERs mittels spezifischer Antikörper in der Rattenbrustdrüse nachweisen. In der Präsenz und zellulären Verteilung der ERs bestehen jedoch Unterschiede: ER β ist sowohl in Stromazellen als auch in dukталen und lobulären Epithelzellen vorhanden; ER α hingegen wird nur in dukталen und lobulären Epithelzellen exprimiert (Cheng et al. 2004). Des Weiteren konnte belegt werden, dass sowohl ER α als auch ER β unabhängig voneinander die E2 induzierte Proliferation des Brustdrüsengewebes vermitteln können (Cheng et al. 2004; Saji et al. 2000).

1.6 Die Entstehung des Mammakarzinoms

Die Brustdrüse zählt zu den wenigen Organen, die nach der Geburt noch nicht vollständig entwickelt sind und nur durch hormonelle Stimulation, Schwangerschaft und Laktation ihre Ausdifferenzierung erreichen. Differenzierung und Zellproliferation der Brustdrüse sind wichtige Faktoren des Karzinogeneseprozesses (Russo IH und Russo J 1996). Eine bedeutende Rolle in der Brustkrebsentwicklung nehmen Östrogene ein. Statistisch signifikant steigt das Brustkrebsrisiko nach 15-jähriger E2-Substitution (Chen et al. 2006). Bei der Induktion eines Mammakarzinoms aktivieren die Tumorzellen stromale Fibroblasten zur Aromataseexpression. Die Aromatase katalysiert die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen. Die Konsequenz ist eine intratumorale Östrogenproduktion. In Interaktion mit Wachstumsfaktoren koppeln die Östrogene an den ER und forcieren so eine Proliferation von Brustkrebszellen. Hohe Proliferationsraten fördern das potentielle Brustkrebsrisiko (Yamaguchi 2007). Neben den direkt ER-vermittelten Effekten stimulieren die Östrogene die hypophysäre Prolaktinsekretion, infolge derer die lobuloalveoläre Entwicklung der Brustdrüse und die Laktation induziert werden (Russo IH und Russo J 1996). Die frühe Lebensphase und die Adoleszenz stellen kritische Zeitpunkte für die Reifung der Hypothalamisch-Hypophysären-Gonaden-Achse dar, die für die Regulation der Hormonproduktion verantwortlich ist. Zudem sind die perinatale Phase, Größe und Gewicht in der Kindheit und die „Hormonlevel“ in der Adoleszenz mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Hierzu zählt eine hohe Östrogenexposition in utero und während des weiteren Lebens (Opdahl et al. 2008; Ruder et al. 2008).

Ferner ist die Brustkrebsentwicklung von den jeweiligen Strukturen der Brustdrüse abhängig. Der Lobulus 1 ist die undifferenzierteste Struktur der Brustdrüse im Vergleich zum Lobulus 2 mit einer komplexeren Morphologie. Während der Schwangerschaft differenzieren sich die Lobuli 1 und 2 zum Lobulus 3.

Der Lobulus 4 ist nur in der Laktationsphase präsent und bildet sich anschließend wieder zum Lobulus 3 zurück. Am Ende der 5. Lebensdekade dominiert sowohl in der Brust von Parae als auch von Nulliparae der Lobulus 1 (Russo J et al. 2005). Im Vergleich zum Lobulus 3 proliferieren die Lobuli 1 und 2 bei hormoneller Stimulation stärker, wobei der der Lobulus 1 die größte Proliferationsaktivität zeigt (Russo J und Russo IH 2008).

In- vitro-Versuche identifizierten die Lobuli 1 und 2 als Ausgangsstrukturen für Karzinome: Lobulus 1 = DCIS (duktales Carcinoma in situ), Lobulus 2 = LCIS (lobuläres Carcinoma in situ). Im Verhältnis dazu wies der Lobulus 3 keine Assoziationen zu malignen Läsionen auf (Russo IH und Russo J 1996; Russo IH und Russo J 2007). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Ausdifferenzierung der Brustdrüse (Lobuli 1 und 2 → Lobulus 3) einen protektiven Effekt bezüglich neoplastischer Läsionen darstellt (Russo J und Russo IH 2008). Folglich stellen Differenzierung und Proliferation der Brustdrüse Parameter dar, die moduliert werden können, um Strategien zur Brustkrebsprävention zu entwickeln (Russo IH und Russo J 1996). Über die zeitliche Entwicklung bis zur Initiation des karzinogenen Prozesses ist bisher wenig bekannt (Russo IH und Russo 1996). Gesichert ist jedoch, dass eine Reihe exogener (Umweltfaktoren) und endogener Faktoren im Zusammenspiel das Brustkrebsrisiko erhöht (Patel et al. 2007). In der folgenden Tabelle sind die Brustkrebsrisiken und die protektiven Faktoren zusammengefasst.

Tabelle 1: Brustkrebsrisiken und protektive Faktoren (Rosenberg et al. 2006a; Rosenberg et al. 2006b; Russo IH und Russo J 1996)

Brustkrebsrisiken
Östrogene
Hohes Alter bei Primigravidität
Nulliparität
Frühe Menarche
Späte Menopause
Alkoholkonsum > 10g/Tag
Rauchen
Langjährige Anwendung oraler Kontrazeptiva
Familiärer Brustkrebs
Träger des BRCA1-Gens
Protektive Faktoren
Ausgetragene Schwangerschaft (hCG = humanes Choriongonadotropin)
Stillen
Späte Menarche

1.7 Die verwendeten Substanzen

1.7.1 17 β -Östradiol (E2)

Die Substanzbeschreibung zu E2 wurde bereits unter Abschnitt 1.2.1 aufgeführt. E2 wurde in verschiedenen Dosen sowie kombiniert mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 verwendet, um die jeweiligen Effekte auf die postmenopausale Rattenmamma zu untersuchen.

1.7.2 Das Antiöstrogen ICI 182,780 (Fulvestrant)

Fulvestrant besitzt eine Steroidstruktur, die dem Hormon 17 β -Östradiol ähnelt und demzufolge in der Lage ist, an ER zu binden (Neven et al. 2007). ICI 182,780 wird auch als Antiöstrogen beziehungsweise SERD (selektiver Östrogenrezeptor-Downregulator) bezeichnet, der an ERs koppelt, sie deaktiviert und durch Blockierung der Bindungsstelle für E2 die Signalgebung der ERs stört. Der Fulvestrant-Östrogenrezeptor-Komplex ist sehr instabil und führt durch seinen Zerfall zur „Downregulation“ bzw. Inaktivierung des ERs (Lewis-Wambi und Jordan 2005; Lower et al. 2007). ICI 182,780 evoziert keine agonistischen Effekte am Endometrium (Lower et al. 2007). Seit März 2004 ist Fulvestrant unter dem Handelsnamen Faslodex® (AstraZeneca Pharmaceuticals) zugelassen und wird zur Behandlung von postmenopausalen Frauen mit ER-positivem Mammakarzinom verwendet (Roth et al. 2006).

Bedingt durch die Wirkung von Fulvestrant als SERD leiden diese Frauen verstärkt an klimakterischen Symptomen. Zur Behandlung dieser Symptomatik würde sich eine Substitutionstherapie mit Hormonen eignen (Jansen et al. 2008).

Die Wirkung von Fulvestrant auf das postmenopausale Mammagewebe wurde in Kombination mit den Testsubstanzklassen (E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738) untersucht.

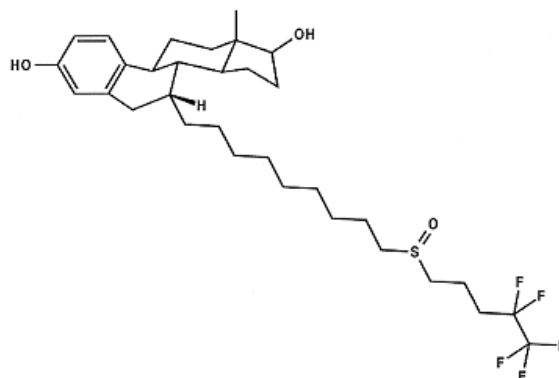
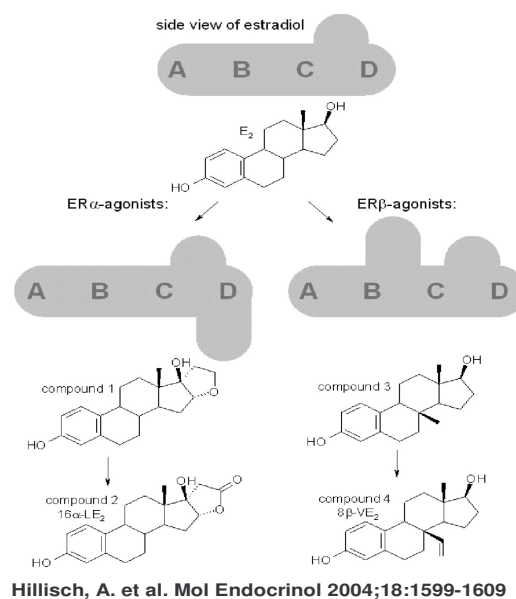


Abbildung 5: Strukturformel des Antiöstrogens ICI 182,780 (Online 2008)

1.7.3 Der ER α -Agonist: ZK 281471 und der ER β -Agonist: ZK 281738

Basierend auf Proteinstrukturen wurden der ER α - und ER β -Agonist als verwandte Derivate des natürlichen Hormons E2 entwickelt. Folglich ist es diesen Verbindungen möglich, aufgrund der Steroidanalogie zu E2 entweder an den ER α oder ER β zu koppeln. Der Beweis dieser Fähigkeit ist bereits *in vitro* validiert (Hillisch et al. 2004). Ebenso potent wie E2 können diese Verbindungen die physiologische Situation der Östrogenaktivitäten imitieren und die Strukturähnlichkeit zu E2 reduziert die Wahrscheinlichkeit von Aktivitäten an anderen Rezeptoren (Hillisch et al. 2004). Zur Entwicklung der selektiven ER α - und ER β -Agonisten wurde an jeweils unterschiedliche Steroidringe von E2 ein lipophiler Fünfring hinzugefügt. Die Substitution am D-Ring führte zum ER α -Agonisten, die am B- und C-Ring zum ER β -Agonisten. Die folgende Abbildung zeigt die Steroide E2, den ER α - und ER β -Agonisten mit ihren Steroidringen (A,B,C,D) im Vergleich.



Copyright ©2004 The Endocrine Society

**MOLECULAR
ENDOCRINOLOGY**

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Strukturformeln des selektiven ER α - und ER β -Agonisten im Vergleich zu E2 (Hillisch et al. 2004, S. 1603).

Die beschriebenen ER α - und ER β - selektiven Agonisten werden in Tiermodellen zur Studie der ER α - und ER β -vermittelten Funktionen eingesetzt. Bisherige in-vivo-Experimente untersuchten die Wirkungen der ER α - und ER β -selektiven Agonisten an Uterus, Knochen, Hypophyse und Leber. Dabei induzierte der ER α -Agonist Uteruswachstum, reduzierte die LH- und FSH-Plasmaspiegel, führte zu einem Angiotensin I-Anstieg und zeigte knochenprotektive Effekte. Entgegen hohen Blutplasmaspiegeln evozierte der ER β -Agonist nicht immer oder nur in hohen Dosen solche Effekte. Infolgedessen werden die östrogenen Wirkungen an Uterus, Knochen, Hypophyse und Leber primär auf den ER α zurückgeführt (Hillisch et al. 2004). Im klinischen Alltag finden diese selektiven ER α - und ER β -Agonisten bisher noch keine Anwendung.

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse der selektiven ER α - und ER β -Agonisten auf das postmenopausale Mammagewebe untersucht.

1.8 Das Ziel der Arbeit

Die Kausalität zwischen der HET und Brustkrebs ist unumstritten. Hohe Proliferationsraten, begünstigt durch die HET, steigern das Brustkrebsrisiko. Eine Lösung dieser Problematik bilden neue therapeutische Strategien, die durch eine Reduzierung des Brustkrebsrisikos das Risiko-Benefit-Profil der HET verbessern würden. Aus diesem Kontext ergibt sich als Ziel dieser Arbeit, verschiedene Testsubstanzen für eine HET in Bezug auf ihr potentielles Mammakarzinomrisiko zu untersuchen. Für den in-vivo-Versuch dieser Arbeit wurden ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) für 30 Tage subkutan (s.c.) verschiedene Testsubstanzen appliziert, die als ER-Modulatoren auf agonistische und antagonistische Weise wirksam werden. Als Testsubstanzen verwendete man E2, den ER α -Agonist ZK 281471, den ER β -Agonist ZK 281738 sowie das Antiöstrogen ICI 182,780. Dabei wurden E2, der ER α -Agonist ZK 281471 und der ER β -Agonist ZK 281738 jeweils in verschiedenen Einzeldosierungen und in Kombination mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 substituiert. Anhand histologischer Schnitte des Mammagewebes erfolgte die Auswertung der Proliferationsraten dieser Testsubstanzen im Vergleich zu einer testsubstanzfreien Kontrollgruppe. Zur Bestätigung der östrogenen Wirkung des ER α -Agonisten ZK 281471 und des ER β -Agonisten ZK 281738 diente die Bestimmung des Uterusgewichtes, sowie der LH- und Prolaktin-Serumspiegel. Aus diesem Versuch ergibt sich die Frage, inwiefern die Testsubstanzen anhand des Ausmaßes ihrer Proliferationsaktivität oder möglicher histopathologischer Proliferationen das Mammakarzinomrisiko begünstigen. Dabei gilt es zu bewerten, ob die Testsubstanzen als therapeutische Optionen für eine HET einsetzbar wären.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Gesetzliche Bestimmungen

Die Bezirksregierung Braunschweig erteilte die Genehmigung für den Tierversuch:

Az 509.42502/01-36.03 (vom 13.10.2003-31.10.2006). Der Versuch wurde unter Anleitung und Aufsicht von Dr. D. Seidlová-Wuttke in der Abteilung für Endokrinologie an der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

2.1.2 Die Versuchstiere und ihre Haltung

Es handelte sich bei den Versuchstieren um 130 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Winkelmann, Borcheln), welche bei Versuchsbeginn 3 Monate alt waren und ein Ausgangsgewicht von 230-270g hatten. Pro Käfig (Makrolonkäfige vom Typ IV, Fa. Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) wurden jeweils fünf Ratten gehalten. Die Raumbeleuchtung mit künstlichem Licht erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr. Die relative Luftfeuchtigkeit zwischen 50-85 % und die Raumtemperatur von $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ wurden unter Verwendung eines Thermo-Hygrometers kontrolliert. Die Ratten hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Durch die Vermeidung von Stressfaktoren wie beispielsweise Schwankungen des Hell-Dunkel-Rhythmus und Lärm konnte die Aufrechterhaltung konstanter äußerer Bedingungen gewährleistet werden.

2.1.3 Verwendetes Futter

Von Geburt an erhielten die Ratten testsubstanzfreies Pelletfutter (V.1354 ssniff®, 10mm, phytoöstrogenarm, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) aus Kartoffelprotein. Dieses Futter beinhaltete weder Sojaprodukte noch andere Isoflavone, deren östrogenähnliche Wirkungen bekannt sind. Demzufolge wurden östrogenähnliche Einflüsse, hervorgerufen durch das Futter vermieden, beziehungsweise die östrogenen Effekte der Testsubstanzen nicht verdeckt. Auf Grund dessen eignet sich dieses Futter besonders gut für Studien, in denen der Effekt von Östrogenen, östrogenähnlichen Substanzen oder anderen Sexualhormonen untersucht werden soll. Die Lagerung der Futtersäcke erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Detaillierte Angaben zur Zusammensetzung des Futters finden sich im methodischen Anhang (Seite 54-55).

2.1.4 Zeitlicher Versuchsablauf

Zu Versuchsbeginn teilte man die 130 weiblichen Ratten in 13 Gruppen zu jeweils 10 Tieren auf. Nach einer Akklimatisierungsphase von 22 Tagen wurden die Ratten zur Eliminierung der körpereigenen E2-Produktion ovariectomiert (ovx) = Tag 0. Am 28. Tag = Tag 1 begann das 4-wöchige (30 Tage) Injektionsintervall.

Von da an injizierte man s.c. im 24-Stunden-Rhythmus immer vormittags zwischen 7.00-9.00 Uhr, 0,2 ml Testsubstanz/Tier.

Während dieses Zeitabschnittes erhielt jede Gruppe die entsprechende Konzentration der verwendeten Testsubstanzen (E2=17- β Estradiol, ZK 261471=ER α -Agonist, ZK 281738=ER β -Agonist). Einer Gruppe pro Testsubstanzklasse wurde zusätzlich das Antiöstrogen ICI 182,780 (0,2 ml/Tier) s.c appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt täglich s.c. 0,2ml Rizinusöl/Tier.

Tabelle 2: Wirkstoffmengen der Gruppen

Gruppe	1. Substanz (0,2 ml/Tier)	2. Substanz (0,2 ml/Tier)
Gruppe 1 (Kontrolle)	Rizinusöl	
Gruppe 2	E2-17 β 0,1 μ g/Tier	
Gruppe 3	E2-17 β 1,0 μ g/Tier	
Gruppe 4	E2-17 β 10 μ g/Tier	
Gruppe 5	E2-17 β 1,0 μ g/Tier	ICI
Gruppe 6	ZK 281471 1,0 μ g/Tier	
Gruppe 7	ZK 281471 10 μ g/Tier	
Gruppe 8	ZK 281471 100 μ g/Tier	
Gruppe 9	ZK 281471 10 μ g/Tier	ICI
Gruppe 10	ZK 281738 1,0 μ g/Tier	
Gruppe 11	ZK 281738 10 μ g/Tier	
Gruppe 12	ZK 281738 100 μ g/Tier	
Gruppe 13	ZK 281738 100 μ g/Tier	ICI

2.1.5 Die Identifikation der Tiere

Zur Identifikation erhielt jede Ratte einen Transponder-UNO MICRO-ID-System (ISO-Transponder 12mm, Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Niederlande), der unter Inhalationsnarkose (s.c) implantiert wurde.

2.1.6 Die Ovariectomie

Vor der Ovariectomie narkotisierte man die Ratten für 10-15 min mit Isofluran über ein Inhalationsgeschirr. Zur Freilegung der Ovarien wurde 2cm unterhalb des Rippenbogens mit einem Skalpell inzidiert. Nachfolgend ligierte man distal der Uterushornspitzen die Ovarien und entfernte sie mit einem Skalpell. Abschließend wurden alle eröffneten Strukturen wieder mit sterilem Nahtmaterial verschlossen und die Kurznarkose mit Antisedan (Antipamazolhydrochlorid) ausgeleitet.

2.1.7 Die subkutane (s.c) Injektion

Das Verfahren der s.c.-Injektion eignet sich, um über einen langen Zeitraum den Erhalt einer konstanten Substratkonzentration im Blut zu erzielen. Über das entstehende Depot im subkutanen Fettgewebe wird die Substanz gleichmäßig abgegeben. Um zu gewährleisten, dass die Substanz nicht direkt in ein Kapillargefäß gelangt, wurde vor jeder Injektion aspiriert. Die Injektion erfolgte seitlich der Flanke in Höhe von L4-L5. Während des Experiments applizierte man täglich 0,2-0,4 ml, wodurch das maximal erlaubte Injektionsvolumen von 1ml/kg/KG nicht überschritten wurde.

2.1.8 Die Tötung der Ratten

Nach dem 30-tägigen Injektionszeitraum der Testsubstanzen dekapitierte man die Ratten in CO₂ -Narkose. Neben Blut, zur Bestimmung der LH-und Prolaktin-Serumspiegel, den Uteri, zur Gewichtsbestimmung und anderen Organen, entnahm man die Mammae der Abdominal-Inguinal-Region, legte sie in Eppendorf-Cups (Firma Sarstedt, Nümbrecht) und frohr sie in Flüssigstickstoff bei -70 C° ein.

2.2 Die histologischen Präparationsschritte zur Aufarbeitung der Mammae

Zur histologischen Weiterverarbeitung wurden die eingefrorenen Mammae nach dem Auftauen für maximal 72 Std. in 10%igem Formalin konserviert. Im darauffolgenden Arbeitsschritt entwässerte und fixierte man die in den Einbettkästen befindlichen Organe mittels einer Zitadelle (Leica TP1020, V 2,0, Ordernr: 070430101, Herstellung 03/08). Für diesen Zweck wurden sie nacheinander für eine vorgegebene Einwirkzeit in Alkohol-, Xylol- und Paraffinlösungen getaucht (Tabelle 2). Anschließend bewahrte man die Einbettkästen bis zur endgültigen Fixierung im Wärmeschrank (Fa. Schütt Labortechnik, GFL 7601) bei 56-62 C° auf. Zur Fixierung wurden die vorbehandelten Mammae in den Einbettkästen zu Paraffinblöcken gegossen. Die folgende Tabelle gibt das Schema zur Organentwässerung- und Fixierung wieder.

Tabelle 3: Schema der Organentwässerung- und Fixierung

Substanz	Einwirkzeit
50%iger Alkohol	1 Std.
75%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
75%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
96%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
96%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
100%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
100%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
100%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
Xylol	1 Std. 20 min.
Xylol	1 Std. 20 min.
Paraffin	1 Std.
Paraffin	1 Std.

Anhang: Zur Herstellung der verschieden prozentigen Alkohole wurde das 100%ige Ethanol (GeReSo GmbH, D-37574 Einbeck) mit destilliertem Wasser verdünnt.

Xylol (J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande).

Vor dem Anfertigen histologischer Schnitte wurden die Mammae für mindestens 24 Std. tiefgefrorenen. Anschließend schnitten wir die Mammae mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica Model RM 2135 Fabriknr: 2794/10.2000, Kat.Nr: 050029802) in 3-6µm dicke Schichten und fixierten sie auf einem Glasobjektträger. Zum Trocknen lagerten die Schnitte für 12 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank (Fa. Schütt Labortechnik, GFL 7601).



Abbildung 7: Das Schneiden mit dem Mikrotom

2.2.1 Die Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung)

Vor der HE-Färbung wurden die Eosin- und Hämatoxylinlösungen angefertigt: Zur Herstellung von 100 ml Eosinlösung wurden 1g Eosin (Merck 1.15935.0025), 20 ml destilliertes Wasser und 80 ml 96%iger Alkohol vermischt. Anschließend wurde aus 45ml der Eosinlösung und 135ml 80%igem Alkohol die Eosin-Arbeitslösung angefertigt. Das Hämatoxylin (Merck 1.09249.05000) wurde vor der Verwendung einmal filtriert (Filter: Schleicher & Schuell MicroScience, D-37582 Dassel). Für den Färbeprozess gab man die Schnitte in Färbeküvetten und tauchte sie nacheinander für die vorgegebenen Einwirkzeiten in die Glasbehälter mit den jeweiligen Lösungen.



Abbildung 8: Die HE-Färbeküvetten

In der folgenden Tabelle werden die einzelnen Färbeschritte aufgeführt.

Tabelle 4: Die HE-Färbung

Substanz	Einwirkzeit
Xylol	10 min.
Xylol	10 min.
Xylol	10 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 96%	2 min.
Ethanol 96%	2 min.
Ethanol 75%	2 min.
Aqua dest.	2 min.
Hämatoxylin	2,5 min.
Leitungswasser	5-10 min.
Eosin	25 sec.
Aqua bidest	5-10 sec.
Ethanol 75%	5 sec.
Ethanol 96%	1 min.
Ethanol 96%	1 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Xylol	5 min.
Xylol	5 min.
Xylol	5 min.

Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Eindeckgläsern (Menzel GmbH & Co KG, D-38116 Braunschweig) und Eindeckmittel (DePeX: Firma, SERVA Elektrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg) fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.2 Histologische Bewertung der Präparate

Zur histologischen Auswertung der gefärbten Präparate verwendete man ein Lichtmikroskop, (Typ: Zeiss Axiophot) welches über eine digitale Fotokamera (Olympus, Deutschland) an ein Analysissystem (Soft Imaging System=SIS) angeschlossen war. Pro Substanzgruppe wurden aus den Präparaten in $2,5 \times 10$ facher Vergrößerung per Auszählung die Gesamtsummen an Duktus, Lobuli 1 und Lobuli 2 bestimmt. Die Präparate wurden hierfür jeweils in 6 nummerierte Quadranten unterteilt. Anhand dieser Vorgehensweise konnte eine zuverlässige Auszählung der Strukturen gewährleistet werden.

2.3 Statistische Auswertung

Aus den Präparaten wurden für jede Substanzgruppe die Summen der mikroskopisch ermittelten Anzahlen der Duktus, Lobuli 1 und Lobuli 2 mit dem Computerprogramm EXCEL (Microsoft Windows XP-Paket) berechnet. Zur Erstellung der Graphen und Berechnung der Signifikanz (Signifikanzniveau auf $p < 0.05$ festgelegt) wurden die Ergebnisse in das Programm PRISM (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, USA) eingefügt und die Standardfehler der Mittelwerte erhoben (SEM=standard error of the mean). Anschließend erfolgte anhand von non-parametrischen one-way ANOVA-Tests nach Dunnett die statistische Auswertung.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Uterusgewichtes

Im Vergleich zur Kontrollgruppe nahm das Uterusgewicht insbesondere in den mittleren und hohen Dosen von E2 (1,0µg/ 0,2 ml und 10µg/0,2ml) und des ER α -Agonisten ZK 281471 M (mittel) und H (hoch) signifikant zu. Die Kombination mit ICI 182,780 führte zu einer Gewichtsabnahme bis auf das Niveau der Kontrollgruppe. Der ER β -Agonist ZK 281738 bewirkte nur in der hohen Dosis H eine geringe Gewichtszunahme des Uterus.

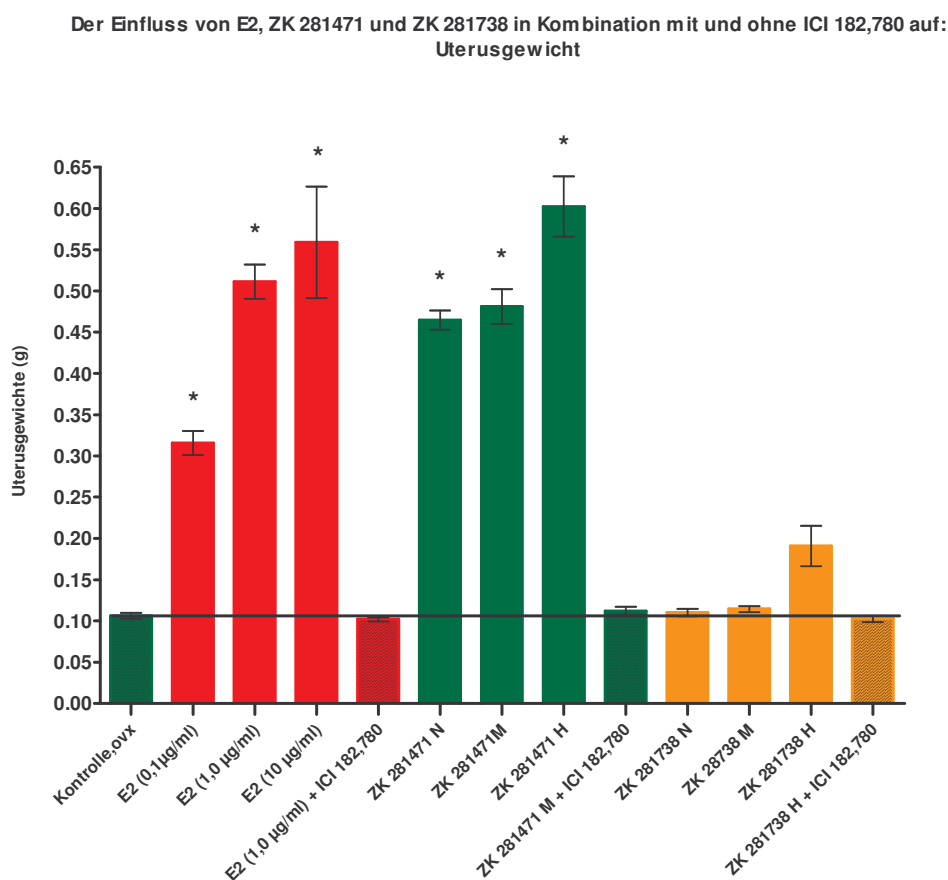


Abbildung 9: Bestimmung des Uterusgewichtes

Von den Testsubstanzen zeigte sich besonders bei E2 (1,0µg/ 0,2 ml und 10µg/0,2ml) und dem ER α -Agonisten ZK 281471 M (mittel) und H (hoch) eine deutliche Zunahme des Uterusgewichtes. $p^* < 0,05$ vs Kontrolle, ovx.

3.2 Prolaktin-Konzentration im Serum

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten insbesondere E2 und der ER α -Agonist ZK 281471 in der mittleren und hohen Dosis (E2 1 μ g/0,2ml und 10 μ g/0,2ml, ER α -Agonist ZK 281471 M (mittel) und H (hoch)) eine signifikante Zunahme des Serum-Prolaktins. In Kombination mit ICI 182,780 nahm die Prolaktinkonzentration jedoch deutlich ab.

Der ER β -Agonist ZK 281738 führte nur kombiniert mit ICI 182,780 zu einem signifikanten Anstieg des Serum-Prolaktins.

Der Einfluss von E2, ZK 281471 N, M, H und ZK 281738 N, M, H in Kombination mit und ohne ICI 182,780 (4 Wochen in ovx Ratten, s.c.) auf: Prolaktin im Serum

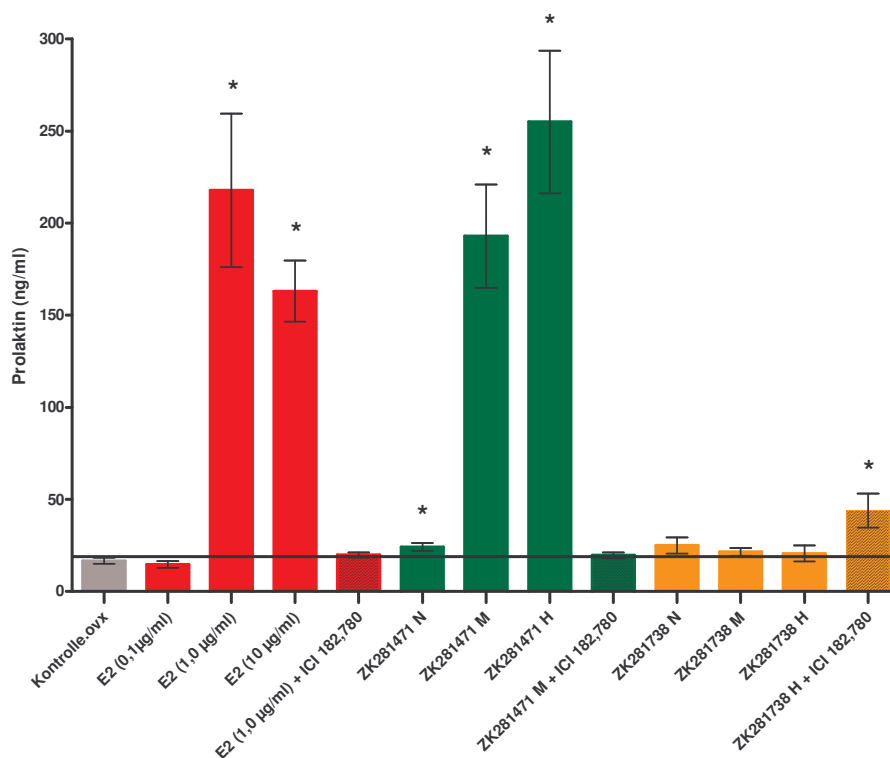


Abbildung 10: Prolaktin-Konzentration im Serum

Unter den Testsubstanzen führten nur E2 (1 μ g/0,2ml und 10 μ g/0,2ml) und der ER α -Agonist ZK 281471 M (mittel) und H (hoch) zu einer signifikanten Erhöhung des Prolaktins. Die Wirkung des ER β -Agonisten ZK 281738 fiel deutlich geringer aus. $p^* < 0,05$ vs Kontrolle, ovx.

3.3 LH-Konzentration im Serum

Im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierten E2 in der mittleren und hohen Dosis (1,0µg/ 0,2 ml und 10µg/0,2 ml) und der ER α -Agonist ZK 281471 M (mittel) und H (hoch) signifikant die LH-Serumspiegel. Kombiniert mit ICI 182,780 stieg der Serumspiegel an.

Der ER β -Agonist ZK 281738 führte auch zu einer signifikanten, jedoch deutlich geringeren Abnahme des LH-Serumspiegels, was sich am stärksten in der hohen Dosis (ZK 281738 H) zeigte. In Kombination mit ICI 182,780 war keine deutliche Zunahme des LH-Serumspiegels erkennbar.

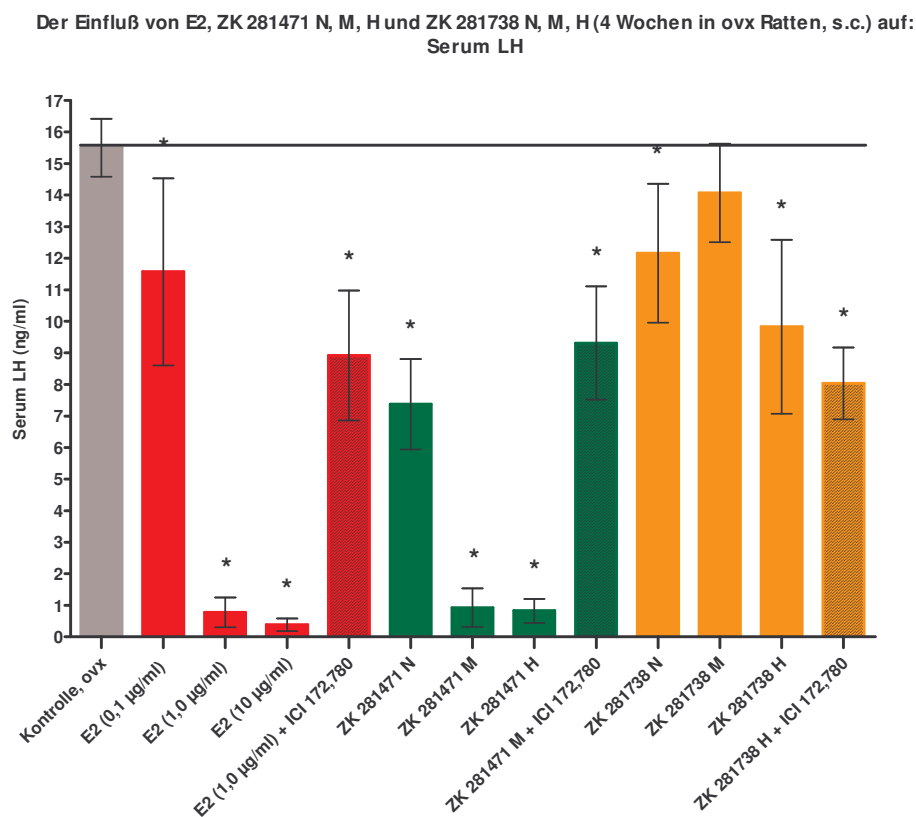


Abbildung 11: LH-Konzentration im Serum

Nur E2 (1,0µg/ 0,2 ml und 10µg/0,2 ml) und der ER α -Agonist ZK 281471 M (mittel) und H (hoch) führten zu einer deutlichen Reduktion des LH-Plasmaspiegels. Der ER β -Agonist ZK 281738 erzielte keinen vergleichbaren Effekt. $p^* < 0,05$ vs Kontrolle, ovx.

3.4 Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Duktus

Verglichen mit der Kontrollgruppe bewirkten alle Testsubstanzen mit Ausnahme des ER β -Agonisten ZK 281738 M (mittel), E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780, ZK 281471 M (mittel)+ ICI 182,780 sowie ZK 281738 H (hoch) + ICI 182,780 eine signifikante Proliferation der Duktus. Die Kombination von E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 reduzierte dabei die Duktusproliferation nicht signifikant unter die Kontrollgruppe. Die größte Proliferation erbrachte der ER α -Agonist ZK 281471 M (mittel), die geringste die Kombination von E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780.

Der Einfluss von E2, ZK 281471 N, M, H und ZK 281738 N, M, H in Kombination mit und ohne ICI 182,780 (4 Wochen in ovx Ratten, s.c.) auf: die Summe der Duktus

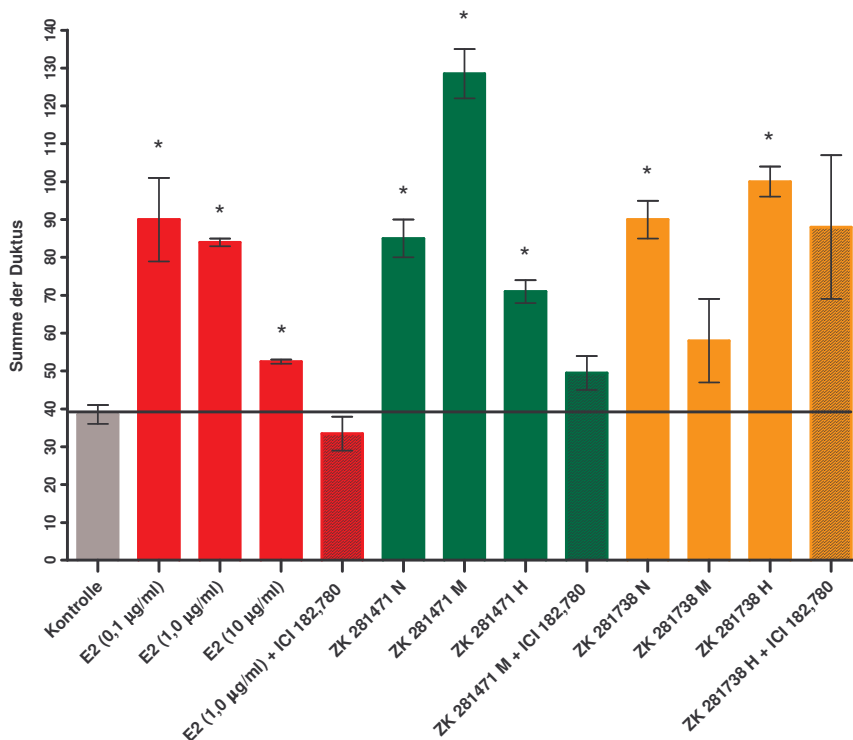


Abbildung 12: Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Duktus

Mit Ausnahme von E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 induzierten alle Testsubstanzen eine fast ausnahmslos signifikante Proliferation der Duktus oberhalb der Kontrollgruppe. *p<0.05 vs Kontrolle, ovx.

3.5 Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Lobuli 1

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte eine signifikante Proliferation der Lobuli 1 interessanterweise nur unter dem ER β -Agonisten ZK 281738 H (hoch) + ICI 182,780 nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von E2 (10 μ g/0,2ml) und E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780, deren Lobuli-1-Proliferation sich sogar nicht signifikant unterhalb der Kontrollgruppe befand, induzierten alle anderen Substanzen eine nicht-signifikante Proliferation der Lobuli 1. Die größten Auswirkungen zeigten sich unter E2 (0,1 μ g/0,2ml), dem ER α -Agonisten ZK 281471 M (mittel), sowie dem ER β -Agonisten ZK 281738 H (hoch). Die Kombination von E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 rief die geringste Lobuli-1-Proliferation hervor.

Der Einfluss von E2, ZK281471 N, M, H und ZK 281738 N, M, H in Kombination mit und ohne ICI 182,780 (4 Wochen in ovx Ratten, s.c.) auf: die Summe der Lobuli 1

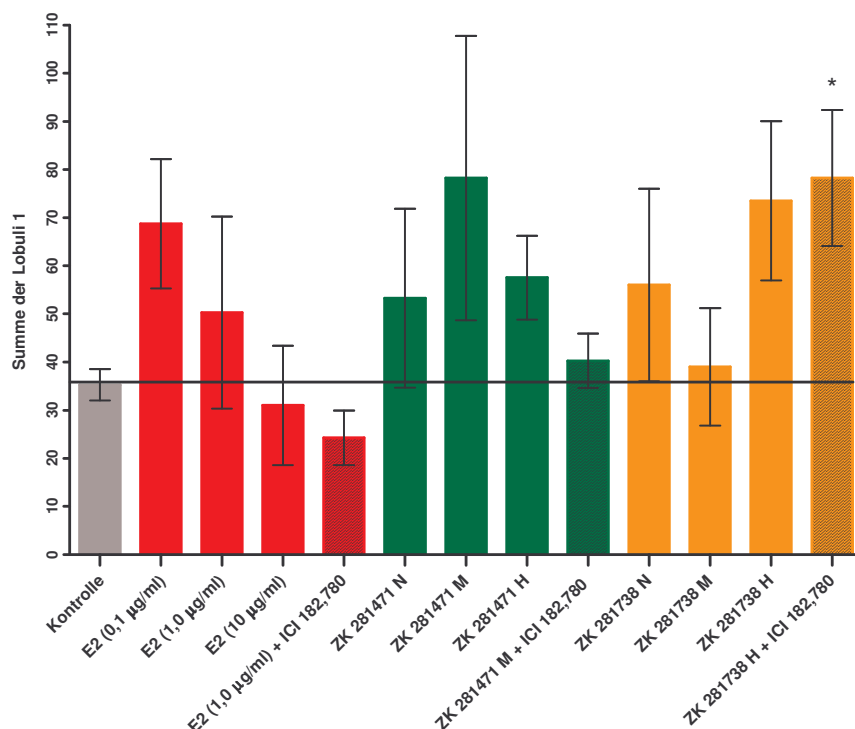


Abbildung 13: Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Lobuli 1

Die Proliferationsrate der Lobuli 1 befand sich bei E2 (10 μ g/0,2ml) und E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 nicht signifikant unterhalb der Kontrollgruppe. Alle anderen Testsubstanzen stimulierten die Proliferation, wobei nur der ER β -Agonist ZK 281738 H (hoch) + ICI 182,780 eine Signifikanz aufwies. p* < 0.05 vs Kontrolle, ovx.

3.6 Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Lobuli 2

Im Vergleich zur Kontrollgruppe evozierten der ER α -Agonist ZK 281471 H (hoch) und der ER β -Agonist ZK 281738 H (hoch) eine signifikante Lobuli 2-Proliferation. Bis auf E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780, deren Lobuli 2-Stimulation sogar nicht signifikant unterhalb derer der Kontrollgruppe lag, wurden in allen anderen Substanzklassen nicht-signifikante Stimulationen der Lobuli 2 oberhalb der Kontrollgruppe ausgelöst. Die größte Proliferation wurde unter dem ER α -Agonisten ZK 281471 M (mittel) und dem ER β -Agonisten ZK 281738 H (hoch), die geringste unter E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 hervorgerufen.

Der Einfluss von E2, ZK 281471 N, M, H und ZK 281738 N, M, H in Kombination mit und ohne ICI 182,780 (4 Wochen in ovx Ratten, s.c.) auf: die Summe der Lobuli 2

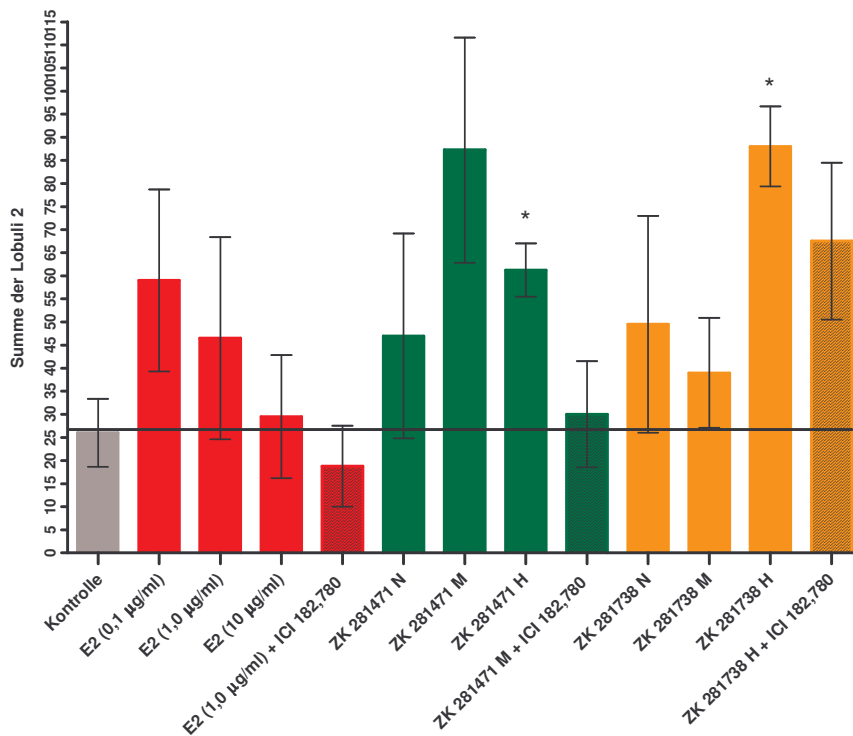


Abbildung 14: Die Effekte der Testsubstanzen auf die Summe der Lobuli 2

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wirkten alle Testsubstanzen, mit Ausnahme von E2 (1,0 μ g/0,2ml) + ICI 182,780, stimulierend auf die Proliferation der Lobuli 2. Signifikante Stimulationen traten jedoch nur bei dem ER α -Agonist ZK 281471 H (hoch) und dem ER β -Agonist ZK 281738 H (hoch) auf. $p^* < 0.05$ vs Kontrolle, ovx.

3.7 Die histologischen Bilder des Mammagewebes nach Behandlung mit den Testsubstanzen

Die folgenden histologischen Bilder zeigen das Mammagewebe nach der Behandlung mit den verschiedenen Testsubstanzklassen.

3.7.1 E2-Effekte auf das Mammagewebe

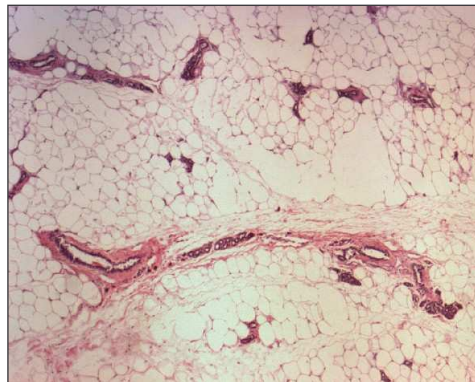


Abbildung 15: Kontrollgruppe ($\times 2,5$), HE

Abb. 15 zeigt die Mammastrukturen Duktus und Lobuli der unbehandelten Kontrollgruppe.

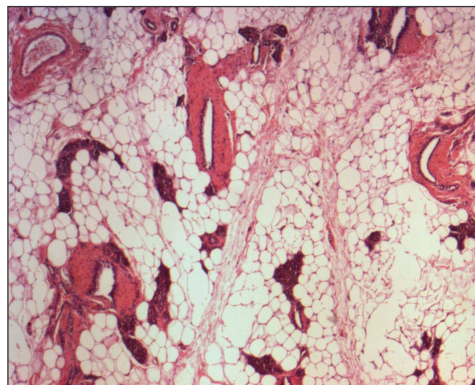


Abbildung 16: E2: $0,1\mu\text{g}/0,2\text{ml}$ ($\times 2,5$), HE

In Abb. 16 ist eine deutliche Proliferation der Duktus und Lobuli 1 und 2 nach der Behandlung mit E2: $0,1\mu\text{g}/0,2\text{ml}$ zu erkennen.

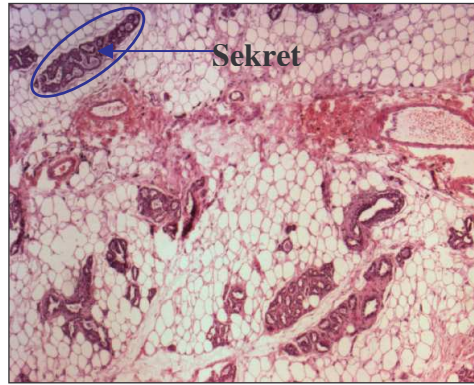


Abbildung 17: E2: 1,0µg/0,2ml (×2,5), HE

Neben der sichtbar stärkeren Proliferation der Mammastrukturen Duktus, Lobuli 1 und 2, wird in Abb. 17 unter E2: 1,0µg/0,2ml eine Sekretstimulation in den Alveolen sichtbar.

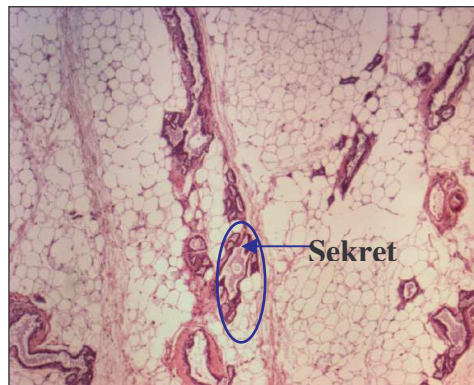


Abbildung 18: E2: 10µg/0,2ml (×2,5), HE

In Abb. 18 zeigt sich unter E2: 10µg/0,2ml interessanterweise die geringste Proliferation der Mammastrukturen. Eine Sekretstimulation ist ebenfalls zu vermerken.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15) wird in Abbildung 16 (E2: 0,1µg/0,2ml) und 17 (E2: 1,0µg/0,2ml) der proliferationsfördernde Einfluss auf die Duktus, Lobuli 1 und 2 sichtbar. Abbildung 17 und 18 zeigen zudem eine deutlich sichtbare Sekretstimulation in den Alveolen und Duktus. Eine Differenzierung zum Lobulus 3 oder 4 ist nicht zu vermerken. Im Vergleich zu den anderen E2-Dosen und der Kontrollgruppe fällt die Proliferation der Mammastrukturen in Abbildung 18 (E2: 10µg/0,2ml) geringer aus.

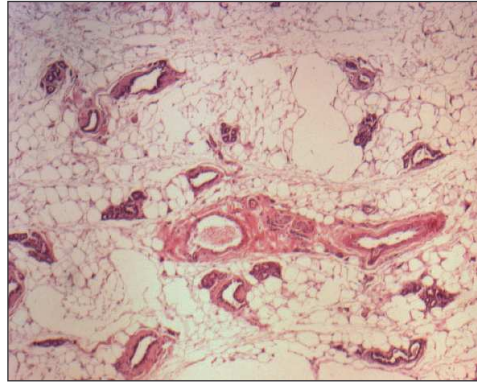


Abbildung 19: E2: 1,0µg/0,2ml + ICI 182,780 (×2,5), HE

Abb. 19 zeigt nach der kombinierten Verabreichung von E2: 1,0µg/0,2ml + ICI 182,780 den blockierenden Effekt von ICI 182,780 auf die Proliferation der Mammastrukturen.

Im Vergleich zu Abbildung 17 (E2: 1,0µg/0,2ml) wird in Abbildung 19 der proliferationsinhibierende Effekt beziehungsweise die Hemmung der östrogenen Wirkung durch ICI 182,780 auf die Mammastrukturen deutlich erkennbar. Zudem fehlt die unter E2: 1,0µg/0,2ml hervorgerufene Sekretstimulation. Die geringere Proliferation der Mammastrukturen in der Kombination von E2: 1,0µg/0,2ml + ICI 182,780 (Abbildung 19) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15) zeigte sich ebenfalls in den Graphen (vgl. Seite 30-32). Dort befand sich die Proliferationsrate der Mammastrukturen in der Kombination mit E2: 1,0µg/0,2ml + ICI 182,780 sogar unterhalb der Kontrollgruppe.

3.7.2 Der Einfluss des ER α -Agonisten (ZK 281471) auf das Mammagewebe

Die folgenden Bilder zeigen das Mammagewebe nach der Behandlung mit dem ER α -Agonisten ZK 281471.

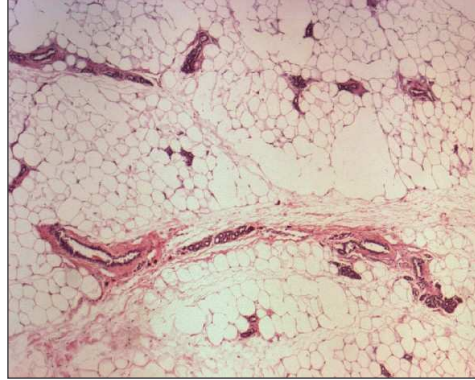


Abbildung 20: Kontrollgruppe ($\times 2,5$), HE

Abb. 20 zeigt die Mammastrukturen Duktus und Lobuli der unbehandelten Kontrollgruppe.

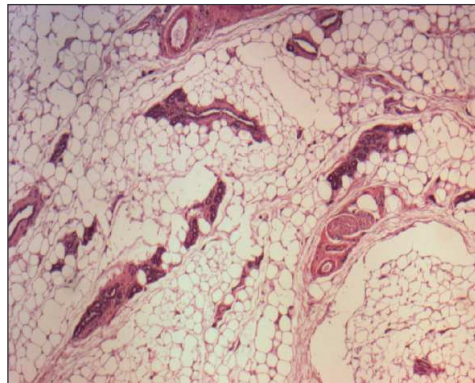


Abbildung 21: ER α -Agonist (N) (1,0 μ g/0,2ml) ($\times 2,5$), HE

In Abb. 21 wird unter dem ER α -Agonist (N) (1,0 μ g/0,2ml) die Stimulation der Mammastrukturen sichtbar.



Abbildung 22: ER α -Agonist (M) (10 μ g/0,2ml) (\times 2,5), HE

Abb. 22 zeigt die sichtbare Zunahme der Mammastrukturen nach der Behandlung mit dem ER α -Agonisten (M) (10 μ g/0,2ml) sowie eine zusätzliche Sekretstimulation und Vermehrung der glatten Muskulatur.



Abbildung 23: ER α -Agonist (H) (100 μ g/0,2ml) (\times 2,5), HE

In Abb. 23 stellt sich unter dem ER α -Agonist (H) (100 μ g/0,2ml) ebenfalls eine Proliferation der Mammastrukturen mit starker Sekretproduktion in den Alveolen dar.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe in Abbildung 20 stimuliert der ER α -Agonist ZK 281471 zunehmend in der niedrigen (N) (1,0 μ g/0,2ml), mittleren (M) (10 μ g/0,2ml) und hohen (H) (100 μ g/0,2ml) Dosis (Abbildung 21, 22 und 23) die Mammastrukturen, Duktus, Lobulus 1 und 2. Zudem führt der ER α -Agonist in der mittleren (M) (10 μ g/0,2ml) und hohen (H) (100 μ g/0,2ml) Dosis (Abbildung 22 und 23) zur Sekretproduktion in den Alveolen und Duktus, sowie zur Vermehrung der Duktus-umgebenden glatten Muskulatur in der mittleren (M) Dosis (10 μ g/0,2ml) (Abbildung 22). Eine Differenzierung der Lobuli 1 und 2 zum Lobulus 3 oder 4 wurde vom ER α -Agonisten ZK 281471 nicht hervorgerufen.

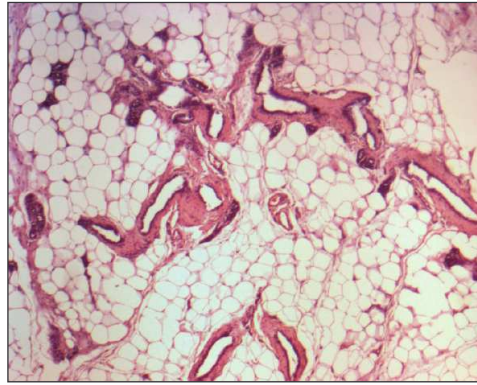


Abbildung 24: ER α -Agonist (M) (10 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 (\times 2,5), HE

In Abb. 24 zeigt sich nach der kombinierten Substitution des ER α -Agonisten (M) (10 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 eine deutliche Proliferationsinhibierung der Mammastrukturen.

Im Vergleich zur mittleren (10 μ g/0,2ml) Dosis des ER α -Agonisten ZK 281471 (Abbildung 22) führt die Kombination des ER α -Agonisten ZK 281471 in mittlerer (M) Dosis (10 μ g/0,2ml) mit ICI 182,780 (Abbildung 24) zur Proliferationsinhibierung der Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und Lobulus 2. Vergleicht man Abbildung 24 mit der Kontrollgruppe in Abbildung 20, so ist kein eindeutiger proliferationsblockierender Einfluss, sondern eher eine gerinfügige Zunahme der Mammastrukturen zu erkennen. Auch die Graphen (vgl. Seite 30-32) zeigen bei der Kombination des ER α -Agonisten ZK 281471 in der mittleren (M) Dosis (10 μ g/0,2ml) mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 eine im Vergleich zur Kontrollgruppe stärkere Proliferationsrate.

3.7.3 Die Wirkung des ER β -Agonisten (ZK 281738) auf das Mammagewebe

In den nächsten Abbildungen folgen die histologischen Bilder nach der Substitution des ER β -Agonisten (ZK 281738).

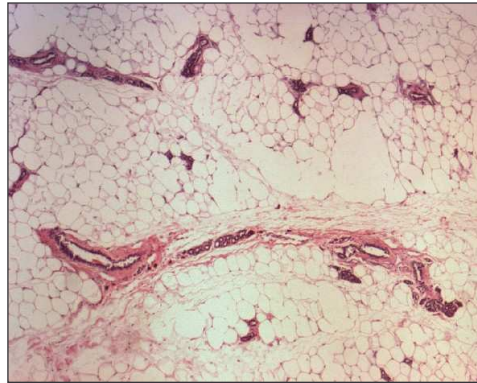


Abbildung 25: Kontrollgruppe ($\times 2,5$), HE

Abb. 25 zeigt die Mammastrukturen Duktus und Lobuli der unbehandelten Kontrollgruppe.

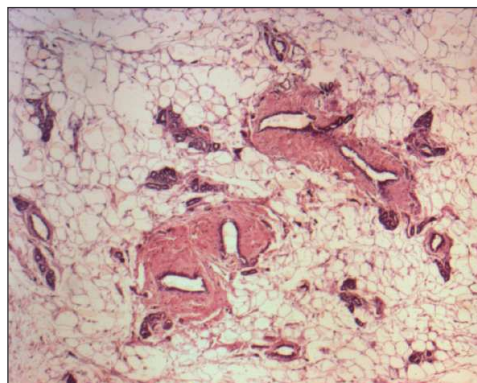


Abbildung 26: ER β -Agonist (N) (1,0 μ g/0,2ml) ($\times 2,5$), HE

In Abb. 26 ist nach der Behandlung mit dem ER β -Agonisten (N) (1,0 μ g/0,2ml) eine Proliferation der Duktus, Lobuli 1 und 2 erkennbar.

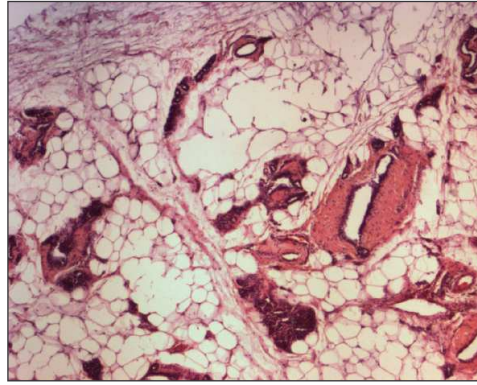


Abbildung 27: ERβ-Agonist (M) (10μg/0,2ml) (×2,5), HE

In Abb. 27 ist nach der Substitution des ERβ-Agonisten (M) (10μg/0,2ml) ebenfalls die Stimulation der Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2 zu verzeichnen.

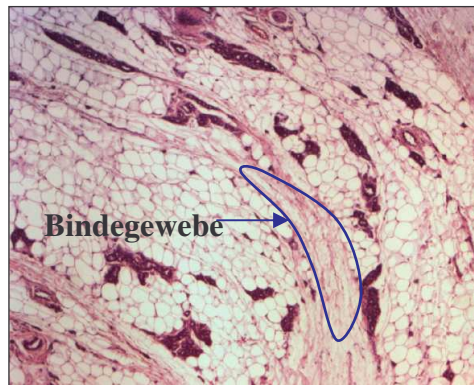


Abbildung 28: ERβ-Agonist (H) (100μg/0,2ml) (×2,5), HE

Abb. 28 zeigt neben der Proliferation der Mammastrukturen eine Bindegewebsvermehrung.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe in Abbildung 19 führt der ERβ-Agonist ZK 281738 in der niedrigen (N), mittleren (M) (10μg/0,2ml) und hohen (H) (100μg/0,2ml) Dosis (Abbildung 26, 27 und 28) zur Proliferation der Mammastrukturen. In der hohen (H) (100μg/0,2ml) Dosis des ERβ-Agonisten ZK 281738 (Abbildung 28) ist neben der Proliferation der Duktus, Lobuli 1 und 2 eine sichtbare Bindegewebsproliferation im Mammagewebe hervorzuheben.

Entgegen des ERα-Agonisten ZK 281471 bewirkte der ERβ-Agonist ZK 281738 in allen Dosisbereichen keine Sekretproduktion. Im Vergleich der Abbildungen des ERα-Agonisten ZK 281471 mit denen des ERβ-Agonisten ZK 281738 zeigten sich beide Substanzen als ähnlich starke Proliferationsinduktoren auf die Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2.

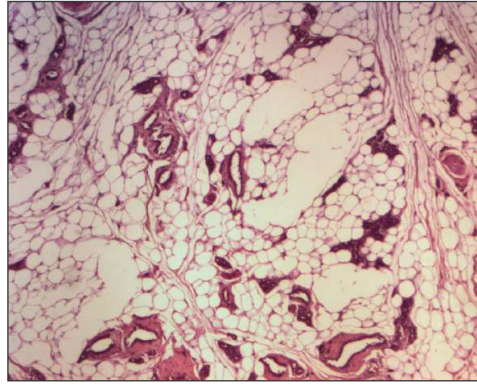


Abbildung 29: ER β -Agonist (H) (100 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 (\times 2,5), HE

In Abb. 29 ist nach der kombinierten Verabreichung des ER β -Agonisten (H) (100 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 keine Proliferationsinhibierung der Mammastrukturen zu erkennen.

Die hohe (H) Dosis des ER β -Agonisten ZK 281738 in Abbildung 28 zeigt im Vergleich zu ihrer Kombination mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 (Abbildung 29) keinen proliferationsinhibierenden Effekt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe in Abbildung 25 ist sogar eine eindeutig stärkere Proliferation der Mammastrukturen festzustellen (vgl. Graphen auf Seite 30-32).

4. Diskussion

4.1 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Brustkrebs und der HET genauer zu erörtern. Hohe Proliferationsraten der Mammaprostrukturen, z.B unter der HET, erhöhen das potentielle Brustkrebsrisiko. Daraus ergab sich als Ziel, die Proliferationsraten unter E2, des ER α -Agonisten ZK281471 und ER β -Agonisten ZK281738 sowie deren Kombinationen mit dem Antiöstrogen ICI 182,780, am Mammagewebe der SD-Ratte im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe zu untersuchen. Zur Bestätigung der östrogenen Wirkung des ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 wurden zusätzlich das Uterusgewicht, LH-und Prolaktin-Serumspiegel bestimmt.

Nun stellt sich die Frage, wie stark die Proliferationsrate und damit das Brustkrebsrisiko unter dem Einfluss der Testsubstanzen zunimmt und ob die Testsubstanzen als therapeutische Optionen für eine HET substituierbar wären.

4.2 Versuchsaufbau

Der Versuch wurde an ovariectomierten SD-Ratten durchgeführt. Dieses Tiermodell eignet sich sehr gut, einen postmenopausalen Zustand zu simulieren. Aufgrund seines strukturellen Aufbaus und der Empfindlichkeit gegenüber E2 stellt die SD-Ratte ein geeignetes Vergleichsmodell zur humanen Brustdrüse dar (Russo IH und Russo J 1996). Die Verwendung von testsubstanzfreiem Pelletfutter aus Kartoffelprotein als Ersatz für sojahaltiges Futter, diente der Vermeidung östrogensimultaner Effekte. Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden verschiedene Dosisbereiche jeder Testsubstanzklasse getestet. Die subkutane Injektion der Testsubstanzen gewährleistet, durch ein im Fettgewebe entstehendes Depot, eine konstante Substratkonzentration im Blut. Zudem wird durch die subkutane Verabreichung der Testsubstanzen deren Abbau über den Leberstoffwechsel umgangen.

Die HE-Färbung der histologischen Schnitte des Mammagewebes dient zur Kontrastierung und Unterscheidung der einzelnen zu untersuchenden Zell- und Gewebsbestandteile der Rattenmammas. Hämalaun färbt alle sauren und basophilen Strukturen blau, insbesondere Zytoplasma und Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER).

Eosin, ein Farbstoff zur Gegenfärbung, färbt alle azidophilen und eosinophilen Strukturen in verschiedenen Rottönen (Zytoplasma, Bindegewebsfasern, Muskelgewebe, Erythrozyten) (Gratzl 2002). Zum Erhalt von Schnitt und Färbung wurden die Präparate mit Eindeckmittel und Deckgläsern versehen (Welsch 2002).

4.3 Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Uterusgewicht

Verglichen mit der Kontrollgruppe führten E2 und der ER α -Agonist ZK 281471 zu einer signifikanten Gewichtszunahme. Beide Substanzen zeigten jeweils in den hohen Dosen (E2 10 μ g/0,2ml, ER α -Agonist ZK 281471 100mg/0,2ml) die größte Gewichtszunahme des Uterus. In Kombination mit ICI 182,780 ließ sich das Uterusgewicht sowohl bei E2 als auch bei dem ER α -Agonisten ZK 281471 auf das Niveau der Kontrollgruppe reduzieren.

Der ER β -Agonist ZK 281738 bewirkte nur in der hohen Dosis (100 μ g/0,2ml) eine Uterusgewichtszunahme, die jedoch deutlich geringer ausfiel als unter E2 und dem ER α -Agonisten ZK 281471. Damit bestätigte sich die östrogene Wirkung des ER α -Agonisten ZK 281471 zum einen durch die Zunahme des Uterusgewichtes, die sich deutlich ausgeprägter darstellte als bei dem ER β -Agonisten ZK 281738 und zum anderen anhand der Reduktion des Uterusgewichtes als Folge der Kombination mit dem Antiöstrogen ICI 182,780.

4.4 Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Serum-Prolaktin

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Serum-Prolaktins bei E2 und dem ER α -Agonisten ZK 281471 insbesondere in der mittleren und hohen Dosis (E2 1 μ g/0,2ml und 10 μ g/0,2ml, ER α -Agonist ZK 281471 10mg/0,2ml und 100 μ g/0,2ml). Die Kombination mit ICI 182,780 führte sowohl bei E2 als auch bei dem ER α -Agonisten ZK 281471 zu einer deutlichen Abnahme des Serum-Prolaktins. Außer in Kombination mit ICI 182,780 führte der ER β -Agonist ZK 281738 zu keiner signifikanten Erhöhung des Serum-Prolaktins, was auf eine geringere östrogene Wirkung schließen lässt.

Diese Ergebnisse sind ein zusätzlicher Nachweis der östrogenen Wirkung des ER α -Agonisten ZK 281471, der ebenso wie E2 eine starke Erhöhung des Serum-Prolaktins hervorrief. Die Abnahme des Serum-Prolaktins unter ICI 182,780 bekräftigte ebenfalls die östrogene Wirkweise des ER α -Agonisten ZK 281471, die sonst nicht durch das Antiöstrogen ICI 182,780 inhibiert werden könnte.

4.5 Die Effekte von E2, dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Serum-LH

Im Vergleich zu Kontrollgruppe reduzierten E2 und der ER α -Agonist ZK 281471 insbesondere in der mittleren und hohen Dosis (E2 1 μ g/0,2ml und 10 μ g/0,2ml, ER α -Agonist ZK 281471 10mg/0,2ml und 100 μ g/0,2ml) die LH-Serumspiegel signifikant. Im Verhältnis zu den Einzeldosen ergab die Kombination mit ICI 182,780 eine signifikante Erhöhung der LH-Serumspiegel. Der ER β -Agonist ZK 281738 führte in allen Dosen sowie in Kombination mit ICI 182,780 zu einer signifikant geringeren Abnahme der LH-Serumspiegel.

Gemäß der negativen Rückkopplung des Hypothalamisch-Hypophysären-Regelkreises führt E2 physiologischerweise zu einer Reduktion der LH-Serumspiegel. Kombiniert mit ICI 182,780, das als Antiöstrogen wirkt, zeigte sich demnach der gegensätzliche Effekt in einem LH-Anstieg.

Der ER α -Agonist wies nahezu identische Effekte wie E2 auf, wodurch dessen östrogene Wirkung bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte der ER β -Agonist ZK 281738 mit der signifikant geringeren Reduktion der LH-Serumspiegel entgegengesetzte Effekte.

Anhand dieser Ergebnisse wird die stärkere östrogene Wirksamkeit des ER α -Agonisten ZK 281471 gegenüber dem ER β -Agonisten ZK 281738 deutlich erkennbar, dessen Wirkungen bezüglich des LH-Serumspiegels nicht annähernd mit dem ER α -Agonisten ZK 281471 zu vergleichen sind.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Uterusgewichtes sowie der LH- und Prolaktinspiegel im Serum zeigten, dass E2 und der ER α -Agonist ZK 281471 nahezu identische Effekte erzielten. Der ER β -Agonist ZK 281738 bewirkte nur in der hohen Dosis (100 μ g/0,2ml) annähernde Effekte wie der ER α -Agonist ZK 281471. Folglich liegt hier die Vermutung nahe, dass die östrogenen Wirkungen primär auf den ER α zurückzuführen sein könnten.

Auch die folgenden Ergebnisse aus den Untersuchungen am Mammagewebe zeigten bei dem ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 dieselben dosisabhängigen Effekte.

4.6 Die Effekte von E2 am Mammagewebe

Im Vergleich zur Kontrollgruppe induzierte die Behandlung mit E2 in der niedrigen (0,1µg/0,2ml) und mittleren (1,0µg/0,2ml) Dosis eine deutliche, wenn auch nicht durchweg signifikante Proliferation der Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2, wobei die niedrige Dosis (0,1µg/0,2ml) die stärkste Proliferation hervorrief.

Entgegen der Erwartungen führte die hohe Dosis (10µg/0,2ml) im Vergleich zur niedrigen (0,1µg/0,2ml) und mittleren (1,0µg/0,2 ml) Dosis zu einer geringeren Proliferation. Die Lobuli-1-Proliferationsrate der hohen Dosis (10µg/0,2ml) lag sogar, wenn auch nicht signifikant, unterhalb der Kontrollgruppe. Dieser „paradoxe“ Effekt der niedrigeren Stimulation in der hohen E2-Dosis (10µg/0,2ml) wurde in der Literatur von Vandenberg et al. auch als das Phänomen der nicht-monotonen Dosisantwort beschrieben. Sie bezeichnen das dosisabhängige Fungieren von E2 als komplexe Interaktion, die reflektiert, daß E2 neben seiner bekannten agonistischen Wirkung am Mammagewebe auch antagonistische Effekte hervorrufen kann (Vandenberg et al. 2006).

Basierend auf der signifikanten Reduktion des Brustkrebsrisikos durch eine frühe Schwangerschaft (< 35 Jahren+Stillen > 6 Monate), werden hohe Östrogendosen in der Literatur unter anderem als potentielle Inhibitoren der Tumorgenese beschrieben: Im Gegensatz zu dem Brustkrebsrisiko, assoziiert mit langen Expositionszeiträumen, soll exogenes Östrogen in hohen Dosen für eine kurze Anwendungsdauer den protektiven Effekt einer Schwangerschaft imitieren (Jerry 2007). Die kurzzeitige Behandlung mit hohen E2-Leveln wie in der Schwangerschaft, wird in der Literatur als hocheffektiv in der Prävention von Brustkrebs beschrieben (Jacobson et al. 2008; Lakshmanaswamy et al. 2008; Tsubura et al. 2008). Dieser protektive Effekt bezüglich neoplastischer Läsionen wird von Russo und Russo auf die Ausdifferenzierung der Brustdrüse durch hohe E2-Dosen wie z.B. in der Schwangerschaft (Lobuli 1 und 2 → Lobulus 3) zurückgeführt (Russo J und Russo IH 2008). Da in dieser Studie eine Differenzierung der Lobuli 1 und 2 zum Lobulus 3 besonders unter hoher E2-Substitution ausblieb, bleibt fraglich, ob wie bei Russo und Russo von protektiven Wirkungen der hohen E2-Dosis (10µg/0,2ml), durch Ausdifferenzierung zum Lobulus 3, gesprochen werden kann.

Darüber hinaus ist zu erwähnen, daß in der Vergangenheit hohe Östrogendosen (Ablacton = Östrogen-Progesteron-Androgen-Kombinationspräparat) zum Abstillen genutzt wurden (Hepp und Ellringmann 1972).

Unter dem Einfluss von Ablacton verkleinerten sich die Drüsenalveolen, es kam zu einer vermehrten Fettsynthese und zur morphologischen und funktionellen Regression des Brustdrüsengewebes (Mateos Candano et al. 1970; Slunsky und Mullauer 1972). Dieser Effekt ist vermutlich auf die Wirkung von E2 in der hohen Dosis von 10µg/0,2ml übertragbar und würde eine Erklärung für dessen geringe Proliferationsrate darstellen.

In Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchte Wirkung von E2 in der Dosis 1,0µg/0,2ml kombiniert mit ICI 182,780 wurden in der Literatur in vitro-Versuche beschrieben, die ebenfalls ICI 182,780 mit E2 kombinierten. Dabei konnte keine Inhibition der E2-induzierten Proliferation nachgewiesen werden. Aufgründessen wurde die E2-induzierte Proliferation der Mammastrukturen nicht auf die Vermittlung über ERs zurückgeführt (Lareef et al. 2005). Demgegenüber hatte der in-vivo-Versuch dieser Arbeit bei der Kombination der mittleren Dosis E2 (1,0µg/ml) + ICI 182,780 die Blockierung des Proliferationseffekts von E2 beziehungsweise die Hemmung der östrogenen Wirkung zur Folge. Dabei befand sich die Proliferationsrate zwar nicht signifikant, jedoch eindeutig unterhalb der Kontrollgruppe. Somit könnte die E2-induzierte Proliferation möglicherweise doch einen ER-vermittelten Prozess vermuten lassen. Ein in-vitro-Versuch von Jansen et al., in welchem ICI 182,780 neben anderen Substanzen ebenfalls mit E2 kombiniert wurde, ergab ähnliche Resultate. In Kombination mit E2 war ICI 182,780 dort weiterhin als Proliferationsinhibitor wirksam und verlor nicht an Effektivität (Jansen et al. 2008).

Desweiteren ist in den mikroskopischen Bildern der mittleren (1,0µg/0,2ml) und hohen (10µg/0,2ml) E2-Dosis eine Sekretproduktion aufgetreten. Diese Sekretproduktion könnte eine Dauerlaktation und erhöhte Entzündungsgefahr nachsichziehen, was einen negativen Aspekt für die HET darstellen würde.

Zu der E2-Monotherapie und ihrer Wirkung auf das Brustdrüsengewebe ist eine Studie der Internationalen Menopause Gesellschaft (IMS) zu erwähnen, die neueste Belege der WHI-Daten publiziert hat. Interessanterweise wird hier angedeutet, dass unter E2-Monotherapie das Gesamtrisiko, an Brustkrebs zu erkranken, reduziert wird. Dies trifft insbesondere auf Tumore mit duktaler Histologie und örtlicher Begrenzung zu. Tumore mit lobulärer oder tubulärer Histologie sind eher klein, tendieren zu langsamem Wachstum und sind gut differenziert. Sie haben zudem eine hohe Nachweisempfindlichkeit, die als alternative Erklärung der hohen Brustkrebsinzidenzen unter HET bisher noch nicht ausgeschlossen wurde.

Laut dieser Studie wird unter E2-Monotherapie ein protektiver Effekt gegen Brustkrebs vermutet. Basierend auf diesen widersprüchlichen Belegen ist es unmöglich zu entscheiden, ob eine HET induzierend, reduzierend oder keinen Effekt auf das Brustkrebsrisiko hat (Shapiro 2007). Die Studie der IMS zeigt wiederum, daß noch immer eine große Verwirrung bezüglich der HET und Brustkrebs existiert. Ob E2 möglicherweise protektive Effekte gegen Brustkrebs am Mammagewebe hervorruft, wie von Shapiro 2007 vermutet, kann weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Unter E2 zeigten sich zwar keine pathologischen Proliferationsraten, dennoch muß erwähnt werden, dass hohe Proliferationsraten im Mammagewebe immer mit einem gewissen Entartungsrisiko verbunden sind (Yamaguchi 2007).

Gelehnt an die in der Einleitung erwähnte japanische Fall-Kontroll-Studie von Saeki et al. (2008) ist die Ausbildung von Brustkrebs unter der HET nicht generell auf diese zurückzuführen. Möglicherweise sind die individuellen Risikofaktoren wie das Alter, die Geburtenzahl, das Alter bei Menarche und Menopause sowie das Rauchen und Stillen in der Vergangenheit von erheblich größerer Bedeutung.

Es bleibt festzuhalten, dass unter E2 sowohl in den einzelnen Dosen als auch in der Kombination mit ICI 182,780 keine histologischen Gewebsveränderungen im Sinn pathologischer Proliferationen der Mammastrukturen auftraten. In Kombination mit ICI 182,780 wird der proliferierende Effekt von E2 inhibiert. Folglich besteht kein erhöhtes Mammakarzinomrisiko.

Anhand dieser Ergebnisse würde E2, vornehmlich in der mittleren Dosis (1,0µg/0,2ml) + ICI 182,780, als Therapeutikum zur HET durchaus in Frage kommen.

Dies wäre auch für jene Frauen interessant, die aufgrund von ER-positivem Brustkrebs adjuvant mit ICI 182,780 therapiert werden und dadurch verstärkt an Symptomen des E2-Mangels (Hitzewallungen, Osteoporose, Atrophieerscheinungen der Haut und des Urogenitalsystems...) leiden. Kombiniert mit E2 ließe sich diese Symptomatik möglicherweise lindern.

4.7 Der ER α -Agonist ZK 281471 und ER β -Agonist ZK 281738

Die Forschungsgruppe um A. Hillisch entwickelte 2004 hochselektive ER-Agonisten: den ER α -Agonisten ZK 281471 und den ER β -Agonisten ZK 281738.

Ihre Effekte auf das Mammagewebe wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben und sollten in dieser Arbeit untersucht und diskutiert werden.

4.7.1 Der Einfluss des ER α -Agonisten ZK 281471 auf das Mammagewebe

Im Vergleich zur Kontrollgruppe stimulierte der ER α -Agonist ZK 281471 teilweise signifikant in allen Dosen die Proliferation der Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2.

Eine Begründung für die proliferationsfördernde Wirkung des selektiven ER α -Agonisten ZK 281471 findet sich bei Matthews und Gustafsson (2003). Sie beschreiben den ER β als dominierenden Modulator der Östrogensignalgebung, der bei Bindung eines Liganden in Koexpression mit dem ER α zu dessen Inhibierung führt (Matthews und Gustafsson 2003).

Erfolgt wie in dieser Arbeit nur die Substitution eines selektiven ER α -Agonisten (ZK 281471), wird dessen selektive Bindung am ER α , bedingt durch das Fehlen eines ER β -Liganden, nicht inhibiert.

Die mittlere Dosis (10 μ g/ml) des ER α -Agonisten ZK 281471 induzierte insgesamt den stärksten Stimulationseinfluss und eine, im Vergleich zu allen E2-Dosen, eindeutig stärkere signifikante Proliferation bei den Duktus sowie nicht signifikante Proliferationen der Mammastrukturen Lobulus 1 und 2. Wie in den mikroskopischen Bildern erkennbar, schien die mittlere Dosis (10 μ g/0,2ml) des ER α -Agonisten ZK 281471 zudem die Vermehrung der duktusbegleitenden glatten Muskulatur und ebenso wie die hohe Dosis (100 μ g/0,2ml) die Anregung der Sekretproduktion in den Duktus und Alveolen zu bewirken. Für die Anwendung des ER α -Agonisten ZK 281471 in der HET stellt die Sekretproduktion mit der möglichen Dauerlaktation und Entzündungsgefahr des Mammagewebes, ebenso wie unter E2, einen negativen Aspekt dar. Die Ausbildung der Duktus-begleitenden glatten Muskulatur ist vermutlich auf die Sekretproduktion zurückzuführen und dient einer erleichterten Sekretejektion. Betrachtet man die histologischen Abbildungen und Graphen, so führte die Kombination des ER α -Agonisten ZK 281471 in der mittleren Dosis (10 μ g/0,2ml) mit ICI 182,780, im Vergleich zu den Einzeldosen, zur nicht-signifikanten Inhibierung der Proliferationsaktivität. Verglichen mit der Kontrollgruppe ist eine geringfügige, jedoch nicht signifikant höhere Proliferationsrate des ER α -Agonisten ZK 281471 in der mittleren Dosis (10 μ g/0,2ml) + ICI 182,780 erkennbar.

Im Vergleich zu allen E2-Dosen erwies sich der ER α -Agonist ZK 281471 in der mittleren Dosis (10 μ g/0,2ml) als durchweg stärkerer Proliferationsinduktor.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre das Umgehen eines ER β -Liganden, der über den ER β die Wirkung des selektiven ER α -Agonisten ZK 281471 am ER α inhibiert hätte (Matthews und Gustafsson 2003).

Es bleibt festzuhalten, dass der ER α -Agonist ZK 281471 in allen Dosen eine nicht durchgehend signifikant stärkere Proliferation bewirkte als E2. Im Vergleich zu den einzeln getesteten ER α -Agonisten ist in Kombination mit ICI 182,780 die eindeutige Inhibition der proliferationsfördernden Wirkung des ER α -Agonisten ZK 281471 zu erkennen. Ferner ließen sich keine histopathologischen Proliferationen nachweisen. Demzufolge wird das Mammakarzinomrisiko nicht erhöht. Damit wäre eine Anwendung des ER α -Agonisten ZK 281471 in Kombination mit ICI 182,780 als Therapeutikum zur HET vorstellbar.

Hierdurch könnten erneut Frauen mit ER-positivem Brustkrebs, die sich in adjuvanter Therapie mit ICI 182,780 befinden, profitieren. Deren E2-Mangelsymptome (Osteoporose, Hitzewallungen, Atrophie der Schleimhäute...), bedingt durch die Therapie mit ICI 182,780, ließen sich mit dem ER α -Agonisten ZK 281471 möglicherweise lindern.

4.7.2 Die Effekte des ER β -Agonisten ZK 281738 auf das Mammagewebe

Im Vergleich zur Kontrollgruppe induzierte der ER β -Agonist ZK 281738 in allen Dosierungen teilweise signifikant die Proliferation der Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2. Dabei erzeugte der ER β -Agonist ZK 281738 durchweg in der hohen (H) Dosis (100 μ g/0,2ml) den größten Stimulationseinfluss, der eine geringfügig stärkere Proliferation bewirkte als alle untersuchten E2-Dosen. Interessanterweise führte die niedrige (N) Dosis (1,0 μ g/0,2ml) zu einer stärkeren Proliferation als die mittlere (M) Dosis (10 μ g/0,2ml).

Wie in den mikroskopischen Abbildungen erkennbar, ist zudem in der hohen Dosis (100 μ g/0,2ml) des ER β -Agonisten ZK 281471 eine Bindegewebsproliferation zu verzeichnen. Möglicherweise könnte das Bindegewebe starke Proliferationen von Duktus, Lobulus 1 und 2 verhindern, wodurch es einen protektiven Einfluss auf die Entstehung eines Mammakarzinoms hätte.

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden der ER α -Agonist ZK 281471 und der ER β -Agonist ZK 281738 bereits an anderen Organen (Uterus, Knochen, Hypophyse und Leber) getestet. Dabei erzielte der ER β -Agonist ZK 281738 entweder gar keine oder nur in hohen Dosen ähnliche Effekte wie der ER α -Agonist ZK 281471 (Hillisch et al. 2004).

Im Mammagewebe ist ähnliches zu beobachten. In der niedrigen Dosis (1,0µg/0,2ml) erreichten beide ER-Agonisten nahezu identische Proliferationsraten der Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2, die sich oberhalb der Kontrollgruppe befanden. Bei der Proliferation der mittleren (10µg/0,2ml) und hohen (100µg/0,2ml) Dosis des ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 bestehen jedoch große Unterschiede: Eine vergleichbar starke Proliferation der Mammastrukturen, wie durch den ER α -Agonisten ZK 281471 in der mittleren Dosis (10µg/0,2ml) ausgelöst, verursachte der ER β -Agonist ZK 281738 nur in der hohen Dosis (100µg/0,2ml). Eine Begründung hierfür besteht möglicherweise in der hauptsächlichen Aufgabe des ER β als Modulator der E2-Signalgebung. Wie in der Einleitung von Matthews und Gustafsson (2003) beschrieben, inhibiert der ER β den ER α . Demnach nimmt der ER β vermutlich indirekt via Inhibierung des ER α Einfluss auf die E2-Signalgebung. Somit wäre der ER α sozusagen der „aktive“ Proliferationsinduktor, der bereits durch geringe Dosen des ER α -Agonisten ZK 281471 eine starke Proliferation der Mammastrukturen hervorruft. Im Gegensatz zum ER α führt der ER β , vermutlich zurückzuführen auf seine vorrangige Aufgabe als Modulator und sogenannter „passiver“ Proliferationsinduktor der E2-Signalgebung, nur bei höheren Dosen des ER β -Agonisten ZK 281738 zu ähnlich starken Proliferationen der Mammastrukturen. Folglich ist anzunehmen, dass die östrogenen Wirkungen am Brustdrüsengewebe primär auf den ER α zurückzuführen sind, welches von Hillisch et al. 2004 in Versuchen an Uterus, Knochen, Hypophyse und Leber ebenfalls nachgewiesen wurde. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse bei der Kombination des ER β -Agonisten ZK 281738 mit ICI 182,780 eine zum Teil signifikante Proliferation der Mammastrukturen, die deutlich oberhalb derer der Kontrollgruppe lag. ICI 182,780 konnte demnach die Proliferationsaktivität des ER β -Agonisten ZK 281738 nicht ausreichend hemmen. Eine Erklärung für diese geringe Proliferationsinhibierung bei der Kombination des ER β -Agonisten ZK 281738 in der hohen (H) (100µg/0,2ml) Dosis mit ICI 182,780 im Vergleich zu den Kombinationen von ICI 182,780 mit E2 in der Dosis 1,0µg/0,2ml und dem ER α -Agonisten ZK 281471 in der mittleren (M) (10µg/0,2ml) Dosis könnte die geringere „Downregulation“ des ER β durch ICI 182,780 geben. Vermutlich inhibiert ICI 182,780 den ER α stärker als den ER β .

Der ER β -Agonist ZK 281738 verursachte sowohl in den Einzeldosen als auch in der Kombination mit ICI 182,780 keine Pathologien im Mammagewebe. Da jedoch ein eindeutig inhibierender Effekt von ICI 182,780 auf die Proliferationsaktivität des ER β -Agonisten ZK 281738 ausblieb, bleibt die mögliche Anwendung des ER β -Agonisten ZK 281738 zur HET bei ER-positivem Brustkrebs fraglich.

Zumindest sollte sie sorgfältig abgewogen werden, da hohe Proliferationsraten, zumal sie nicht inhibiert werden können, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko mit sich bringen (Yamaguchi 2007).

Einen bemerkenswerten Aspekt stellt die Dosisabhängigkeit der Testsubstanzen auf die untersuchten Gewebestrukturen und Hormone dar. Auffallend ist, dass die verschiedenen Testsubstanzdosen die Östrogen-regulierten Strukturen Uterus, Brustgewebe sowie die Hormone Prolaktin und LH auf unterschiedliche Weise beeinflussten. Diskussionswürdig scheint die mögliche Koexistenz unbekannter Faktoren, welche auf die untersuchten Gewebestrukturen und Hormone wahrscheinlich über komplexe Mechanismen inhibierend oder stimulierend wirkten.

Möglicherweise stehen die unterschiedlichen Reaktionen auf die Testsubstanzdosen mit der jeweiligen Funktion der Östrogen-sensiblen Strukturen und Hormone in Verbindung. Spekuliert werden kann auch über eine differente Östrogensensibilität der untersuchten Gewebestrukturen und Hormone, sodass bereits geringe beziehungsweise erst hohe Testsubstanzdosen zu nachweisbar stimulierenden oder inhibierenden Effekten führen würden.

5. Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die thematische Kausalität zwischen der HET und Brustkrebs.

Hierfür wurden die Einflüsse verschiedener Testsubstanzen auf das Mammagewebe der Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) untersucht: Für diesen Zweck injizierte man s.c. für 30 Tage ovariectomierten SD-Ratten E2, den ER α -Agonisten ZK 281471 und den ER β -Agonisten ZK 281738 jeweils in verschiedenen Einzeldosierungen sowie in Kombination mit dem Antiöstrogen ICI 182,780, welches zur Therapie von ER-positivem Brustkrebs angewendet wird und häufig klimakterische Symptome verursacht, die mit einer HET behandelt werden könnten. Anhand histologischer Schnitte wurden die Effekte der Testsubstanzen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe beurteilt.

Ziel dieser Arbeit war es, das potentielle Brustkrebsrisiko der Testsubstanzen anhand ihrer proliferationsaktivierenden Wirkung auf die Mammastrukturen Duktus und Lobulus, sowie mögliche histopathologische Proliferationen zu bewerten. Hohe Proliferationsraten steigern das Mammakarzinomrisiko. Zur Bestätigung der östrogenen Wirkung des ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 diente die Bestimmung des Uterusgewichtes, sowie der LH- und Prolaktin-Serumspiegel. Dabei zeigte der ER α -Agonist ZK 281471 nahezu identische Resultate wie E2. Beide Substanzen führten, insbesondere in der mittleren und hohen Dosis, zur signifikanten Reduktion der LH-Serumspiegel und erhöhten die Prolaktin-Serumspiegel sowie das Uterusgewicht. In Kombination mit ICI 182,780 ließen sich diese östrogenen Effekte inhibieren - die LH-Serumspiegel stiegen an und die Prolaktin-Serumspiegel und das Uterusgewicht nahmen ab.

Der ER β -Agonist ZK 281738 bewirkte nur bedingt, in hoher Dosierung, vergleichbare Effekte wie E2 und der ER α -Agonist ZK 281471, so dass die Ergebnisse vermuten lassen, dass der östrogene Effekt auf Uterusgewicht, LH- und Prolaktinspiegel primär über den ER α vermittelt wird.

Ähnliche Resultate zeigten sich auch im Mammagewebe. Die Einzeldosierungen der Testsubstanzen E2, des ER α -Agonisten ZK 281471 und ER β -Agonisten ZK 281738 übten in unterschiedlicher Ausprägung proliferierenden Einfluss auf die Mammastrukturen Duktus, Lobulus 1 und 2 aus. Die Proliferationsraten der Testsubstanzen befanden sich nahezu alle oberhalb der Kontrollgruppe, diejenigen der Duktus fast vollständig, die der Lobuli 1 und 2 teilweise signifikant. Dabei wirkten die ER-Agonisten ZK 281471 (ER α) und ZK 281738 (ER β) fast durchgehend stärker auf die Proliferation der Mammastrukturen als E2 in gleicher Dosierung.

Der ER β -Agonist ZK 281738 führte nur in hoher Dosis zu ähnlichen Proliferationen wie der ER α -Agonist ZK 281471. Vermutlich sind die östrogenen Effekte auch am Brustdrüsengewebe primär auf den ER α zurückzuführen.

ICI 182,780 inhibierte nur die Proliferationsaktivität des ER α -Agonisten ZK 281471 und von E2. In Kombination mit dem ER β -Agonisten ZK 281738 zeigte es keine proliferationshemmende Wirkung. Bei keiner der untersuchten Testsubstanzen traten Veränderungen des Mammagewebes im Sinne pathologischer Proliferationen auf.

Der ER β -Agonist ZK 281738, dessen proliferationsfördernde Wirkung von ICI 182,780 nicht ausreichend inhibiert wurde, würde vermutlich in der Langzeitanwendung durch die erhöhte Proliferationsaktivität das Brustkrebsrisiko erhöhen. Demnach sollte die Anwendung für eine HET sorgsam abgewogen werden.

ICI 182,780 wirkte in Kombination mit E2 und dem ER α -Agonisten ZK 281471 proliferationsinhibierend auf das Mammagewebe, wodurch das Mammakarzinomrisiko nicht erhöht wird. Folglich wäre eine HET mit E2 und dem ER α -Agonisten ZK 281471 durchaus denkbar. In diesem Zusammenhang könnten insbesondere auch Frauen mit ER-positivem Brustkrebs, die adjuvant mit ICI 182,780 therapiert werden und dadurch verstärkt an Symptomen des E2-Mangels leiden, profitieren. Durch die zusätzliche Kombination mit E2 oder dem ER α -Agonisten ZK 281471 ließen sich diese Symptome lindern. Da ICI 182,780 auf beide Testsubstanzen proliferationsinhibierend wirkt, könnte das Mammakarzinomrisiko weitgehend reduziert werden. Damit hätten sowohl Frauen in der Postmenopause als auch jene mit ER-positivem Brustkrebs in adjuvanter Therapie mit ICI 182,780 die Option für eine HET mit verbesserter Risiko-Benefit-Bilanz. Regelmäßige Kontrolluntersuchungen sind dabei jedoch nach wie vor unumgänglich.

6. Methodischer Anhang

Die folgenden Tabellen geben Auskunft über die Zusammensetzung des Alleinfuttermittels für die Zucht von Ratten.

Tabelle 5: Aminosäuren

Aminosäuren	[%]
Lysin	1,22
Methionin	0,44
Met+Cys	0,83
Threonin	0,97
Tryptophan	0,28
Arginin	1,13
Histidin	0,51
Valin	1,25
Isoleucin	1,03
Leucin	1,95
Phenylalanin	1,21
Phe+Tyr	2,2
Glycin	1,05
Glutaminsäure	3,96
Asparaginsäure	2,18
Prolin	1,53
Alanin	1,26
Serin	1,17

Tabelle 6: Rohnährstoffe

Rohnährstoffe	[%]
Trockensubstanz	88,2
Rohprotein	21,7
Rohfett	4,3
Rohfaser	4,2
Rohasche	6,1
N-freie Extraktstoffe	52,2
Stärke	34
Zucker	3

Tabelle 7: Mineralstoffe

Mineralstoffe	[%]
Calcium	1
Phosphor	0,7
Natrium	0,19
Magnesium	0,2
Kalium	0,67

Tabelle 8: Fettsäuren

Fettsäuren	[%]
C 12:0	-
C 14:0	0,01
C 16:0	0,56
C 16:1	0,01
C 18:0	0,08
C 18:1	0,82
C 18:2	2,26
C 18:3	0,22
C 20:0	0,01
C 20:1	0,02
C 20:5	-
C 20:6	-

Tabelle 9: Vitamine

Vitamine	per kg
Vitamin A	15.000 IE
Vitamin D3	1.000 IE
Vitamin E	115 mg
Vitamin K (als Menadion)	5 mg
Thiamin (B1)	18 mg
Riboflavin (B2)	22 mg
Pyridoxin (B6)	20 mg
Cobalamin (B12)	100 µg
Nicotinsäure	120 mg
Pantothensäure	40 mg
Folsäure	7 mg
Biotin	460 µg
Cholin-Cl	2.380 mg
Inositol	100 mg

Tabelle 10: Spurenelemente

Spurenelemente	per kg
Eisen	169 mg
Mangan	78 mg
Zink	101 mg
Kupfer	14 mg
Iod	2,2 mg
Selen	0,4 mg
Cobalt	2,2 mg

7. Literaturverzeichnis

- Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-27.
- Burger HG, Hale GE, Robertson DM, Dennerstein L (2007): A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Hum Reprod Update* 39:1355-4786.
- Canderelli R, Leccesse LA, Miller NL, Unruh Davidson J (2007): Benefits of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Am Acad Nurse Pract* 19:635-41.
- Caufriez A (2007): Hormonal replacement therapy (HRT) in postmenopause: a reappraisal. *Ann Endocrinol (Paris)* 68:241-50.
- Chen WY, Manson JE, Hankinson SE, Rosner B, Holmes MD, Willett WC, Colditz GA (2006): Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer. *Arch Intern Med* 166:1027-32.
- Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3739-46.
- Conner P, Lundstrom E, von Schoultz B (2008): Breast cancer and hormonal therapy. *Clin Obstet Gynecol* 51:592-606.
- Corrao G, Zambon A, Conti V, Nicotra F, La Vecchia C, Fornari C, Cesana G, Contiero P, Tagliabue G, Nappi RE et al. (2008): Menopause hormone replacement therapy and cancer risk: an Italian record linkage investigation. *Ann Oncol* 19:150-5.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (2006): International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58:773-81.
- Dietel M: Harrinsons Innere Medizin 2; ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2003.
- Enmark E, Gustafsson JA (1999): Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 246:133-8.
- Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F (2008): Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 107:103-11.
- Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR, Pien GW, Nelson DB, Sheng L (2007): Symptoms Associated With Menopausal Transition and Reproductive Hormones in Midlife Women. *Obstet Gynecol* 110:230-40.
- Gratzl M: Histologie. 5. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2002.
- Hepp H, Ellringmann R (1972): [Inhibition of lactation using Estrovis 4000 and Ablacton]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 32:471-6.
- Heufelder AE (2002): Abbruch der WHI-Studie erzwingt Neubewertung. *Gynäkol Geburtshilfe* 22:71.
- Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Muller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W, Fritzemeier KH (2004): Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol Endocrinol* 18:1599-1609.
- <http://www.gekid.de> wgd. Int. Series.; 2008.
- Jacobson HI, Lemanski N, Narendran A, Agarwal A, Bennett JA, Andersen TT (2008): Hormones of pregnancy, alpha-feto protein, and reduction of breast cancer risk. *Adv Exp Med Biol* 617:477-84.
- Jansen GH, Franke HR, Wolbers F, Brinkhuis M, Vermes I (2008): Effects of fulvestrant alone or combined with different steroids in human breast cancer cells in vitro. *Climacteric* 11:315-21.
- Jerry DJ (2007): Roles for estrogen and progesterone in breast cancer prevention. *Breast Cancer Res* 9:102.

- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-30.
- Lakshmanaswamy R, Guzman RC, Nandi S (2008): Hormonal prevention of breast cancer: significance of promotional environment. *Adv Exp Med Biol* 617:469-75.
- Lareef MH, Garber J, Russo PA, Russo IH, Heulings R, Russo J (2005): The estrogen antagonist ICI-182-780 does not inhibit the transformation phenotypes induced by 17-beta-estradiol and 4-OH estradiol in human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 26:423-9.
- Lewis-Wambi JS, Jordan VC (2005): Treatment of Postmenopausal Breast Cancer with Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Breast Dis* 24:93-105.
- Löffler G: *Basiswissen Biochemie*. 5. Auflage; Springer Verlag, Regensburg 2003.
- Lower EE, Esparaz BT, Garnett SA, Wade JL, 3rd (2007): Evaluation of fulvestrant in clinical practice: use of an electronic data registry. *Clin Breast Cancer* 7:565-9.
- Lyytinen H, Pukkala E, Ylikorkala O (2006): Breast cancer risk in postmenopausal women using estrogen-only therapy. *Obstet Gynecol* 108:1354-60.
- MacLennan AH (2007): HRT: a reappraisal of the risks and benefits. *Med J Aust* 186:643-6.
- Marino M, Acconcia F, Ascenzi P (2005): Estrogen receptor signalling: bases for drug actions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5:305-14.
- Mateos Candano M, Ruiz Moreno JA, Cordoba Senties A (1970): [Suppression of lactation by using a trihormone preparation]. *Ginecol Obstet Mex* 27:367-9.
- Matthews J, Gustafsson JA (2003): Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3:281-92.
- Neven P, Paridaens R, Pelgrims G, Martens M, Bols A, Goeminne JC, Vindevoghel A, Demol J, Stragier B, De Greve J et al. (2007): Fulvestrant (Faslodex trade mark) in advanced breast cancer: clinical experience from a Belgian cooperative study. *Breast Cancer Res Treat* 109:59-65.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001): Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-65.
- Online PZ. Fulvestrant-Strukturformel. *Int. Series Fulvestrant-Strukturformel*. 2008.
- Online PZ. Estradiol-Strukturformel. *Int. Series Estradiol-Strukturformel*. 2008.
- Opatrny L, Dell'Aniello S, Assouline S, Suissa S (2008): Hormone replacement therapy use and variations in the risk of breast cancer. *BJOG* 115:169-75; discussion 75.
- Opdahl S, Nilsen TI, Romundstad PR, Vanky E, Carlsen SM, Vatten LJ (2008): Association of size at birth with adolescent hormone levels, body size and age at menarche: relevance for breast cancer risk. *Br J Cancer* 99:201-6.
- Patel RR, Sharma CG, Jordan VC (2007): Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. *Breast Cancer* 14:113-22.
- Pitkin J, Rees MC, Gray S, Lumsden MA, Marsden J, Stevenson J, Williamson J (2004): Managing the menopause: BMS Council Consensus statement on HRT. *J Br Menopause Soc* 10:33-6.
- Prelevic GM, Kocjan T, Markou A (2005): Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Minerva Endocrinol* 30:27-36.
- Purohit A, Newman SP, Reed MJ (2002): The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 4:65-9.
- Ribot C, Tremollieres F (2007): [Hormone replacement therapy in postmenopausal women: all the treatments are not the same]. *Gynecol Obstet Fertil* 35:388-97.
- Rosenberg LU, Einarsdottir K, Friman EI, Wedren S, Dickman PW, Hall P, Magnusson C (2006a): Risk factors for hormone receptor-defined breast cancer in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:2482-8.

- Rosenberg LU, Magnusson C, Lindstrom E, Wedren S, Hall P, Dickman PW (2006b): Menopausal hormone therapy and other breast cancer risk factors in relation to the risk of different histological subtypes of breast cancer: a case-control study. *Breast Cancer Res* 8:R11.
- Roth S, Schaad S, Hardel V, Jaehde U (2006): [Fulvestrant]. *Dtsch Med Wochenschr* 131:2718-21.
- Ruder EH, Dorgan JF, Kranz S, Kris-Etherton PM, Hartman TJ (2008): Examining breast cancer growth and lifestyle risk factors: early life, childhood, and adolescence. *Clin Breast Cancer* 8:334-42.
- Russo IH, Russo J (1996): Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104:938-67.
- Russo IH, Russo J (2007): Primary prevention of breast cancer by hormone-induced differentiation. *Recent Results Cancer Res* 174:111-30.
- Russo J, Russo IH (2008): Breast development, hormones and cancer. *Adv Exp Med Biol* 630:52-6.
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH (2005): The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:131-42.
- Saeki T, Sano M, Komoike Y, Sonoo H, Honjyo H, Ochiai K, Kobayashi T, Aogi K, Sato N, Sawai S et al. (2008): No increase of breast cancer incidence in Japanese women who received hormone replacement therapy: overview of a case-control study of breast cancer risk in Japan. *Int J Clin Oncol* 13:8-11.
- Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:337-42.
- Schmidt M, Kimmig R (2006): [The benefits and risks of hormonal replacement therapy--an update]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 46:166-73.
- Schwenkhagen A (2007): Hormonal changes in menopause and implications on sexual health. *J Sex Med* 4 Suppl 3:220-6.
- Shapiro S (2007): Recent epidemiological evidence relevant to the clinical management of the menopause. *Climacteric* 10 Suppl 2:2-15.
- Siegmund-Schultze N, Zylka-Menhorn V, Leinmüller R, Meyer R (2008): Hormontherapie und Brustkrebs-ein Blick auf die aktuelle Datenlage. *Dtsch Ärztebl* 105:264.
- Silbernagel S.: *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Auflage; Thieme Verlag, Würzburg 2001.
- Skouby SO, Al-Azzawi F, Barlow D, Calaf-Alsina Erdogan Ertungealp J, Gompel A, Graziottin A, Hudita D, Pines A, Rozenberg S, Samsioe G et al. (2005): Climacteric medicine: European Menopause and Andropause Society (EMAS) 2004/2005 position statements on peri- and postmenopausal hormone replacement therapy. *Maturitas* 51:8-14.
- Slunsky R, Mullauer A (1972): [Weaning with an injection of Schering ablacton]. *Zentralbl Gynakol* 94:596-9.
- Stauber M, Weyerstahl T: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2005.
- Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, Hendrix SL, Rodabough RJ, Paskett ED, Lane DS, Hubbell FA, Assaf AR, Sarto GE et al. (2006): Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA* 295:1647-57.
- Tsubura A, Uehara N, Matsuoka Y, Yoshizawa K, Yuri T (2008): Estrogen and progesterone treatment mimicking pregnancy for protection from breast cancer. *In Vivo* 22:191-201.
- Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM (2006): The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol* 101:263-74.

Welsch U: Sobotta, Atlas der Histologie. 6. Auflage; Urban&Fischer Verlag, München, Jena 2002.

Yamaguchi Y (2007): Microenvironmental regulation of estrogen signals in breast cancer. *Breast Cancer* 14:175-81.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	10
Abbildung 2:	12
Abbildung 3:	13
Abbildung 4:	14
Abbildung 5:	17
Abbildung 6:	18
Abbildung 7:	24
Abbildung 8:	24
Abbildung 9:	27
Abbildung 10:	28
Abbildung 11:	29
Abbildung 12:	30
Abbildung 13:	31
Abbildung 14:	32
Abbildung 15:	33
Abbildung 16:	33
Abbildung 17:	34
Abbildung 18:	34
Abbildung 19:	35
Abbildung 20:	36
Abbildung 21:	36
Abbildung 22:	37
Abbildung 23:	37
Abbildung 24:	38
Abbildung 25:	39
Abbildung 26:	39
Abbildung 27:	40
Abbildung 28:	40
Abbildung 29:	41

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	16
Tabelle 2:	21
Tabelle 3:	23
Tabelle 4:	25
Tabelle 5:	54
Tabelle 6:	54
Tabelle 7:	54
Tabelle 8:	55
Tabelle 9:	55
Tabelle 10:	55

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke für die Vergabe des Themas, die Betreuung sowie die Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Zudem danke ich Frau Dr. Dr. D. Seidlová-Wuttke für die Unterstützung im experimentellen und schriftlichen Teil der Arbeit und den Mitarbeitern des Departements für Endokrinologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen; insbesondere Frau H. Brüggemann-Meyer und A. Menche für die Anleitung beim Schneiden und Färben der Präparate sowie Frau S. Lüdemann für die Hilfe bei allen administrativen Schwierigkeiten.

Lebenslauf

Am 22.08.1981 wurde ich, Mareike Ernst, in Duderstadt geboren.

Von 1988-1992 besuchte ich die Grundschule in Fuhrbach. Im Anschluss daran folgten bis 1994 zwei Schuljahre in der Orientierungsstufe St. Ursula in Duderstadt, sowie bis 1998 vier Schuljahre auf der Heinz-Sielmann Realschule in Duderstadt. Mein Abitur erhielt ich im Juni 2001 auf dem Hainberg-Gymnasium in Göttingen, das ich von 1998 bis 2001 besuchte.

Vom 1.10.2001 bis zum 1.03.2002 absolvierte ich ein Krankenpflegepraktikum im Neu-Mariahilf Krankenhaus in Göttingen. Im April 2002 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, welches ich im Juni 2009 mit dem Staatsexamen beendete.

Im Juni 2006 begann ich meine Doktorarbeit in dem Departement für Endokrinologie bei Prof. Dr. med. W. Wuttke.

Vom 16.09.2009 bis zum 31.12.2009 arbeitete ich in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Diakonissen-Krankenhaus in Kassel. Seit dem 01.01.2010 bin ich in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Neu-Mariahilf Krankenhauses in Göttingen tätig.

Göttingen, 14.02.2010