

Aus der  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité Campus Virchow-Klinikum der  
Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. W. Lichtenegger)  
und der  
Klinik für Geburtsmedizin der Charité Campus Virchow-Klinikum der  
Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen)

## HABILITATIONSSCHRIFT

# Der Einfluß von Ovulationshemmern auf die Tumorbiologie und die Prognose des Mammakarzinoms

Zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach

Gynäkologie und Geburtshilfe

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. hc. R. Felix

von

Dr. med. Ines Schönborn aus Jena

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Bässler  
2. Prof. Dr. M. Kaufmann

Eingereicht: 19. Dezember 1999

Habilitation: 9. Januar 2001

<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>1. Material und Methode</b>	<b>6</b>
1.1. Epidemiologische Methodik	6
1.1.1. Studiendesign	6
1.1.2. Patientencharakteristika	6
1.2. Histopathologie	8
1.2.1. Histomorphologie	8
1.2.2. Immunhistochemie	8
Labortechnische Methodik	9
Scoring	10
1.3. Methodische Verfahren	11
1.3.1. Statistische Methodik	11
1.3.2. Methodenkritik	13
1.3.2.1. Epidemiologische Methodik	13
1.3.2.2. Histomorphologie und Immunhistochemie	14
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>16</b>
2.1. Deskription	16
2.1.1. Ovulationshemmer - Einnahmecharakteristika	16
2.1.2. Epidemiologische Risikofaktoren	18
2.1.3. Histomorphologische und immunhistochemische Faktoren	20
2.2. Ovulationshemmer (OH) und Tumorcharakteristika	21
2.2.1. Einfluß von OH-Einnahmedauer und Einnahmezeitpunkt	21
2.2.1.1. Histomorphologische Faktoren	22
Einnahme jemals	22
Einnahmedauer	22
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose	22
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose	22
Einnahmezeitraum	23
2.2.1.2. Hormonrezeptoren und Proliferationsverhalten	24
Einnahme jemals	24
Einnahmedauer	24
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose	24
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose	24
Einnahmezeitraum	24
2.2.1.3. Wachstumsfaktoren und Protoonkogene	26
Einnahme jemals	26
Einnahmedauer	26
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose	26
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose	26
Einnahmezeitraum	26
2.2.2. Einfluß verschiedener Gestagenkomponenten	28
2.2.2.1. Histomorphologische Faktoren	28
Einnahme jemals	28
Einnahmedauer	28
Ersteinnahme	28
2.2.2.2. Hormonrezeptoren und Proliferationsverhalten	29
Einnahme jemals	29
Einnahmedauer	30
Ersteinnahme	30
2.2.2.3. Wachstumsfaktoren und Protoonkogene	31
Einnahme jemals	31
Einnahmedauer	32
Ersteinnahme	32
2.3. Ovulationshemmer (OH) und Prognose des Mammakarzinoms	32

2.3.1.	Histomorphologische und tumorbiologische Prognosefaktoren	32
2.3.1.1.	Univariate Überlebensanalysen	33
2.3.1.2.	Multivariate Überlebensanalysen	34
2.3.2.	Die OH-Einnahme als Prognosefaktor	35
2.3.2.1.	Univariate Überlebensanalysen	35
2.3.2.2.	Multivariate Überlebensanalysen	35
2.3.3.	Charakteristika der OH-Einnahme als Prognosefaktoren	36
2.3.3.1.	OH-Einnahmedauer	36
2.3.3.2.	Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose	36
2.3.3.3.	Abstand der ersten OH-Einnahme zur Diagnose	36
2.3.3.4.	Alter bei der ersten OH-Einnahme	37
2.3.3.5.	OH-Einnahme vor der ersten Lebendgeburt	37
2.3.4.	Zeitraum der Einnahme von Ovulationshemmern (OH) und Prognose	39
2.3.4.1.	OH-Einnahme in definierten Zeitintervallen	39
2.3.4.2.	OH-Einnahme in definierten Jahren vor der Diagnose	40
2.3.5.	Gestagenkomponenten und Prognose	41
2.3.5.1.	Univariate Überlebensanalysen	42
2.3.5.2.	Multivariate Überlebensanalysen	42
2.3.6.	Epidemiologische Risikofaktoren und Prognose	44
2.3.6.1.	Hormonell-reproduktive Faktoren	44
	Schwangerschaft und Stillen	44
	Alter bei erster Lebendgeburt	44
	Anzahl der Lebendgeburten	44
	Alter beim Stillen des 1. Kindes	44
	Anzahl gestillter Kinder	44
	Menarche und Menopause	45
2.3.6.2.	Familiäre Belastung und benigne Mammaveränderungen	45
2.3.6.3.	Sozioökonomische Faktoren	46
	Ausbildungsjahre	46
	Ärztliche Betreuung und Vorsorge	46
2.3.7.	Prognostische Wertigkeit hormoneller Faktoren	47
2.3.7.1.	Hormonell-reproduktive Faktoren und Zeitraum der OH-Einnahme	47
2.3.7.2.	Gestagenkomponenten und Zeitraum der OH-Einnahme	48
2.4.	Prognosefaktoren im Follow-up	50
2.4.1.	Histomorphologische Faktoren	50
2.4.2.	OH-Einnahmezeitraum und Gestagenkomponenten	52
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Hypothese</b>	<b>80</b>
	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>84</b>
	Literaturverzeichnis	86
	Abkürzungsverzeichnis	104

## Einleitung

Mit der Einführung von Ovulationshemmern 1959 in den USA wurde erstmals in der Medizingeschichte eine pharmakologische Substanz in großem Umfang ohne therapeutische Hintergründe verwendet. Aufgrund der hohen Akzeptanz und geringen Nebenwirkungen haben seitdem weltweit mehr als 200 Millionen Frauen Ovulationshemmer eingenommen (Collaborative Study 1996).

Vor dem Hintergrund der jährlich um etwa 1% steigenden Inzidenz des Mammakarzinoms war das Interesse an den Auswirkungen der Einnahme von Ovulationshemmern (OH) auf das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken, von jeher ausgesprochen hoch. Offenbar erhöht sich dieses Risiko nach OH-Einnahme jedoch nur geringfügig, wobei endgültige Aussagen über interessierende Untergruppen wie die der Mammakarzinome nach OH-Einnahme bei Teenagern oder nach OH-Einnahme vor der ersten Lebendgeburt erst im nächsten Jahrzehnt zu erwarten sind.

Dennoch haben möglicherweise Mammakarzinome, die nach oder unter der Einnahme von OH entstehen, andere biologische Merkmale und eine andere Prognose als solche ohne derartige exogene Hormonexposition (Schönborn et al. 1994, Collaborative Study 1996). Die Dauer der Latenzzeiten bis zur Diagnose eines Mammakarzinoms beläuft sich auf durchschnittlich 15 bis 20 Jahre (von Fournier et al. 1980, Koscielny et al. 1985, Bulbrook and Thomas 1989). Dieser Zeitabschnitt umfaßt in der Regel verschiedene Lebensabschnitte, in denen Frauen von OH Gebrauch machen. Die biologischen Auswirkungen dieser hormonellen Exposition auf den Tumor selbst, auf das Metastasierungspotential oder hormonelle Regulationsmechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt.

Die Bedeutung weiterführender Untersuchungen zum Einfluß von OH auf die Tumorbilologie und die Prognose des Mammakarzinoms wurde erst vor wenigen Jahren nach der Veröffentlichung der Metaanalyse der „Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer“ erneut hervorgehoben (Westhoff et al. 1996, Szarewski et al. 1996, Beral et al. 1996). In dieser Studie wurde für einen zehnjährigen Zeitraum nach Beendigung der Einnahme von OH eine moderate Risikoerhöhung für die Erkrankung an einem Mammakarzinom beschrieben. Frauen, die zum Zeitpunkt der Diagnose OH einnahmen, hatten gegenüber denen ohne OH-Einnahme ein um 24% erhöhtes Erkrankungsrisiko. Dieser Effekt war kontinuierlich rückläufig und 10 Jahre nach Beendigung der Einnahme nicht mehr nachweisbar.

Interessanterweise war die Stadienverteilung der Tumoren für Patientinnen, die OH eingenommen hatten, signifikant günstiger als für andere Frauen. Diese Beobachtung konnte nicht nur bei OH-Einnahme zum Zeitpunkt der Diagnose sondern auch noch 10 Jahre nach Beendigung der Einnahme gemacht werden. Aufgrund der langanhaltenden Wirkung dieses Effekts scheint eine Vorverschiebung des Diagnosezeitpunktes durch eine engmaschigere ärztliche Betreuung eher unwahrscheinlich zu sein. Dagegen gewinnt die Möglichkeit einer biologischen Wirkung der OH auf pathogenetische Regulationsmechanismen während der Tumorentstehung durch dieses Ergebnis erheblich an Interesse. Für die weitere Klärung dieser Fragen waren jedoch die Daten der Metaanalyse nicht ausgelegt (Collaborative Group 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Studie zum Einfluß von OH auf die Prognose des Mammakarzinoms hatte sich zu einem sehr frühen Zeitpunkt ein signifikanter Überlebensvorteil für Patientinnen nach OH-Einnahme angedeutet (Schönborn et al. 1994). Auf der Grundlage der konventionellen Prognosefaktoren gab es für die Differenzen in den Überlebensraten keine Erklärung. Die Stadienverteilung war für Patientinnen nach OH-Einnahme nicht günstiger als für andere Frauen. Die Wechselwirkungen zwischen OH-Einnahme, biologischen Regulationsmechanismen des Tumors und nicht zuletzt anderen hormonellen und epidemiologischen Faktoren sind allerdings zu komplex, um sie nur anhand konventioneller Tumorcharakteristika erfassen zu können. Darüberhinaus konnte es sich zu diesem Zeitpunkt ebenso um ein zufälliges Ergebnis nach begrenztem Follow-up handeln. Andererseits war es möglich, daß diesem Effekt eine echte biologische Wirkung der OH-Einnahme im Prozeß der Tumorentwicklung zugrundeliegt, dessen Auswirkungen auf die Prognose des Mammakarzinoms auch über ein langzeitiges Follow-up nachweisbar sein sollten.

Der Erkenntniszuwachs auf dem Gebiet der molekularbiologischen Regulationsmechanismen von Tumoren hat im letzten Jahrzehnt die Möglichkeiten zur Erforschung der hormonellen Steuerung dieser Prozesse stetig erweitert.

Für die Entstehung des Mammakarzinoms standen Östrogene und Wachstumsfaktoren als die beiden stärksten Mitogene lange Zeit im Mittelpunkt des Interesses (Freiss et al. 1993). Gestagene jedoch wirken an der Mamma entgegen früheren Vorstellungen eher proliferativ und damit potentiell mitogen, was eine erneute Definition ihrer Rolle für die Karzinogenese des Mammakarzinoms notwendig macht. Die Ergebnisse sind bisher widersprüchlich. Gestagene potenzieren entgegen ursprünglichen Annahmen möglicherweise die Wirkung der Östrogene, wobei den 19-Nortestosteronderivaten aufgrund ihres Metabolismus und ihrer östrogenen Potenz eine größere Bedeutung zukommen soll als den  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteronderivaten (Jeng et al. 1992, Catherino et al. 1993). Östrogen/Gestagenkombinationen wiederum wurden an der Mamma proliferationshemmende Wirkungen infolge differenzierter gestagenabhängiger Regulationsmechanismen zugeschrieben (Schoonen et al. 1995).

In Anbetracht der zahlreichen ungeklärten Fragen zu diesem Problem war es das **Ziel der vorliegenden Studie**, den Einfluß von OH und deren Gestagenkomponenten auf die Tumorbiologie und die Prognose des Mammakarzinoms zu untersuchen.

Zur Charakterisierung der biologischen Merkmale der Tumoren wurden sowohl konventionell-histomorphologische als auch zellulär exprimierte, molekularbiologische Faktoren (PCNA, c-erbB-2, EGF-R, p53-Protein) bestimmt. Der biologische Effekt exogener hormoneller Einflüsse durch die Einnahme verschiedener OH sowie der Einfluß endogener hormoneller Veränderungen durch natürliche Ereignisse während des reproduktiven Lebensabschnittes wie Schwangerschaft, Geburt und Stillen werden anhand der Ausprägung der untersuchten Tumorcharakteristika analysiert.

Neben dem Einfluß der OH-Einnahme und dem anderer hormonell-reproduktiver Faktoren werden epidemiologische Kofaktoren, die potentiell mit der Wirkung der OH interferieren könnten, einbezogen, um somit den biologischen Effekt der OH-Einnahme gezielt herauszuarbeiten.

Für die Beurteilung der prognostischen Bedeutung der OH-Einnahme und aller tumorassoziierten Faktoren wird die zeitabhängige Veränderung der Wertigkeit der untersuchten Prognosefaktoren während des beobachteten langzeitigen Follow-up gesondert berücksichtigt. Abschließend werden die erzielten Untersuchungsergebnisse in einer Hypothese zur hormonellen Beeinflussung der Tumorbiologie des Mammakarzinoms während verschiedener Phasen der Tumorentwicklung zusammenfassend dargestellt.

## 1. Material und Methode

### 1.1. Epidemiologische Methodik

#### 1.1.1 Studiendesign

Die primäre Datenerfassung für alle Mammakarzinompatientinnen erfolgte im Rahmen der „WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives“. Diese WHO-Studie war eine internationale multizentrische Fall-Kontroll Studie zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Verwendung von OH und dem Karzinomrisiko für verschiedene Organlokalisationen (WHO 1985, WHO 1990). Von November 1982 bis Juli 1986 wurden 502 Fälle mit Mammakarzinom und 1316 Kontrollen rekrutiert. 490 Fälle und 1223 Kontrollen konnten letztlich für die Fall-Kontroll Studie ausgewertet werden (Ebeling et al. 1991).

Von allen primär in die WHO-Studie eingeschlossenen Frauen wurden ausschließlich die 490 Patientinnen mit Mammakarzinom für die hier vorliegende Studie zur Bedeutung der OH-Einnahme für die Tumorbilogie und die Prognose der Erkrankung rekrutiert. Im Verlauf der Studie mußten 19 Patientinnen ausgeschlossen werden, da sie unmittelbar nach der Diagnose nicht mehr nachbeobachtet werden konnten. Somit konnten 471 Fälle mit dokumentiertem Follow-up in diese Untersuchung eingeschlossen werden.

Sämtliche anamnestischen, klinischen und histomorphologischen Daten wurden bei Diagnose und Primärtherapie des Mammakarzinoms unter kontrollierten Bedingungen erfaßt (WHO 1985, WHO 1990). Nur Frauen, die nach 1930 geboren worden waren, hatten während ihres reproduktiven Lebensabschnittes auch die Möglichkeit, OH zu verwenden und konnten damit für die Studie rekrutiert werden.

Im Rahmen eines standardisierten Fragebogens wurden Informationen zu bekannten und potentiellen Risikofaktoren für das Mammakarzinom sowie eine komplette gynäkologische und geburtshilfliche Anamnese erhoben.

Faktoren, die durch hormonelle Veränderungen, Differenzen in der genetischen Belastung oder auch Unterschiede im sozialen Status und Verhalten einen Einfluß auf die Biologie des Mammakarzinoms oder die Prognose der Erkrankung haben können, wurden in dieser Studie einbezogen.

Das Follow-up der Patientinnen wurde mit Hilfe populationsbezogener und klinikbezogener Register erhoben. Weitere Informationen entstammen den Landeseinwohnermeldeämtern und wurden durch Kontakte mit den behandelnden Ärzten überprüft. Das mediane Follow-up für noch lebende Patientinnen erstreckte sich über einen Zeitraum von 117 (48-151) Monaten. Die mediane Überlebenszeit für verstorbene Patientinnen belief sich auf 44.5 (5-130) Monate. Das mediane Follow-up für die Gesamtgruppe betrug 107 (5-151) Monate.

#### 1.1.2 Patientencharakteristika

Alle Patientinnen waren konsekutiv zwischen 1982 und 1986 wegen eines invasiven Mammakarzinoms an der Robert-Rössle-Klinik des ehemaligen Zentralinstitutes für Krebsforschung, heute Charité Campus Berlin-Buch, aufgenommen worden. Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 45 (26-52) Jahre.

Die Diagnostik, operative Therapie und gegebenenfalls auch die adjuvante Behandlung erfolgten an einer Einrichtung und unterlagen im Rekrutierungszeitraum gleichbleibenden Therapiestandards. Alle Patientinnen wurden primär operiert. Bei Frauen mit brusterhaltender Operation erfolgte eine lokale Strahlentherapie. Keine der Patientinnen wies eine distale Metastasierung auf. Patientinnen mit positivem Lymphknoten(LK)-Status erhielten eine Chemotherapie (Bonadonna-Schema 6 Zyklen CMF). Bei 36 Patientinnen mit LK-negativen Tumoren wurde aufgrund ungünstiger prognostischer Kriterien ebenfalls eine Chemotherapie durchgeführt. Postmenopausale Patientinnen mit LK-positivem Mammakarzinom wurden adjuvant mit Tamoxifen 30mg/Tag behandelt. Aufgrund des Studiendesigns waren nur wenige

der Patientinnen postmenopausal. Patientinnen wurden als postmenopausal bezeichnet, wenn sie seit mindestens einem Jahr keine Menstruationsblutung mehr gehabt hatten oder wenn nach operativer Entfernung beider Ovarien keine hormonelle Substitution erfolgt war. Tabelle 1.1-1 faßt die klinischen Charakteristika der rekrutierten Patientinnen zusammen.

Tabelle 1.1-1 Patientencharakteristika

Anzahl der Patientinnen	471	
Alter bei Diagnose (mittleres, Standardabweichung)	45 (SD $\pm$ 5.99) Jahre	
Menopause		
Prämenopausal	373	(79.2%)
Postmenopausal	98	(20.8%)
OH-Einnahme		
Ja	297	(63.1%)
Nein	174	(36.9%)
Primäre Therapie		
Modifizierte Mastektomie	288	(61.1%)
Brusterhaltendes Vorgehen	183	(38.9%)
Adjuvante Chemotherapie (CMF)		
Lymphknoten-negative Tumoren	36	( 7.6%)
Lymphknoten-positive Tumoren	223	(47.3%)
Verstorben		
am Mammakarzinom	161	(34.2%)
Andere Ursachen	1	( 0.2%)

#### *OH-Einnahme*

Von den erfaßten 471 Patientinnen hatten 297 (63.1%) zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose ihrer Erkrankung OH eingenommen. Keine der Patientinnen hatte die Einnahme von OH nach der Diagnose des Mammakarzinoms fortgesetzt oder zu irgendeinem Zeitpunkt wieder aufgenommen. 184 Patientinnen (62% aller Frauen mit OH-Einnahme) hatten OH über mehr als 5 Jahre eingenommen und 92 dieser Frauen hatten sogar über mehr als 10 Jahre OH verwendet. Die Patientinnen hatten mit wenigen Ausnahmen Kombinationspräparate eingenommen. Die verwendeten OH enthielten

- 0.05 mg bzw. 0.03 mg Ethinylestradiol (EE) oder
- 0.1 mg bzw. 0.08 mg Mestranol und
- 1 mg Norethisteronacetat (NETA) oder
- 0.25 bzw. 0.125 mg Levonorgestrel (LNG) oder
- 2 mg Chlormadinonacetat (CMA).

Tabelle 1.1-2 gibt einen Überblick zur Zusammensetzung der verwendeten Präparate.

Tabelle 1.1-2 Ovulationshemmer (OH): verwendete Präparate und deren Zusammensetzung

	Östrogen	Gestagen
Kombinierte OH		
Ovosiston <sup>R</sup>	0.1/0.08 mg Mestranol	2.0 mg CMA
Gravistat <sup>R</sup>	0.05 mg EE	0.125 mg LNG oder 0.250 mg LNG (bis 1978)
Minisiston <sup>R</sup>	0.03 mg EE	0.125 mg LNG
Non Ovlon <sup>R</sup>	0.05 mg EE	1 mg NETA
Sequenzpräparate		
Sequostat <sup>R</sup>	0.05 mg EE	( 1.-6. ZT <sup>2</sup> )
	0.05 mg EE	1 mg NETA (7.-21. ZT)
Deposiston <sup>R</sup>	1 mg EE-PS <sup>1</sup> (1x/Wo)	5 mg NETA (2 Tbl. 25. ZT)

<sup>1</sup> Ethinylestradiolpropansulfonat

<sup>2</sup> Zyklustag

## 1.2. Histopathologie

Die histomorphologischen Befunde wurden zum Zeitpunkt der Primärtherapie durch zwei unabhängige Pathologen ermittelt. Referenzschnitte gingen dabei im Rahmen der WHO-Studie an das WHO-Referenzzentrum. Die histomorphologischen Befunde des Referenzpathologen bildeten die Grundlage für die hier zugrundeliegende Erfassung der Tumorcharakteristika (Stalsberg et al. 1989).

Im Rahmen der Studie wurde für spätere Untersuchungen jeweils ein separater Paraffinblock asserviert, der in der vorliegenden Untersuchung für die Bestimmung der Östrogenrezeptoren (ER), der Progesteronrezeptoren (PR) und der Expression des proliferating cell nuclear antigens (PCNA) sowie des epidermal growth factor receptors (EGF-R), des c-erbB-2-Proteins und des p53-Proteins verwendet wurde.

### 1.2.1. Histomorphologie

Die Klassifikation des histologischen Tumortyps erfolgte nach der zum Zeitpunkt der Rekrutierung gültigen WHO-Nomenklatur (WHO 1981).

Das histologische Grading wurde nach der Methode von Bloom and Richardson ermittelt (Bloom and Richardson 1957).

Tumorgröße und LK-Status wurden entsprechend der TNM-Klassifikation bestimmt (UICC, TNM 1987).

### 1.2.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material durchgeführt. Die Fixierung erfolgte in 4% Formalin (pH 7.0) über einen Zeitraum von maximal 26 Stunden. Nach Schneiden der Blöcke in 3 µm Schnitte wurden diese auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern 20 min bei 50°C getrocknet. Zur Vermeidung von Bestimmungsfehlern durch Denaturierung der Liganden wurden primär verschiedene Präparationsmodalitäten (24 h Lufttrocknung, Trocknung über 2 h bei 37°C oder über 20 min bei 50°C) getestet. Es ergaben sich dabei keine relevanten Differenzen in der Qualität und Quantität der immunhistochemischen Bestimmungen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Bestimmung der ER-/PR- und der PCNA-Expression wurden mit Hilfe der APAAP-Methode unter Verwendung von Neufuchsin als



Chromogen durchgeführt (Cordell et al. 1984).

Die Bestimmung der c-erbB-2-Protein- und der EGF-R-Expression erfolgten nach der Streptavidin-Biotin-Methode, die der p53-Protein Expression nach der Avidin-Biotin-Methode. Die Färbung wurde mit einem Diethylaminobenzidin (DAB) enthaltenden Substratgemisch durchgeführt. Eine Übersicht der verwendeten Methoden und Antikörper findet sich in Tabelle 1.2-1.

In allen Untersuchungsreihen wurden entsprechende Kontrollschnitte mitgeführt.

In 8 Fällen war für die Bestimmung des c-erbB-2-Proteins kein Material mehr verfügbar. In 6 Fällen war dies für die Bestimmung des p53-Proteins der Fall. Für die EGF-R Bestimmung stand in 12 Fällen kein Material zur Verfügung. In einem Fall konnte die EGF-R-Expression nicht eindeutig bestimmt werden und wurde daher nicht berücksichtigt.

Tabelle 1.2-1 Immunhistochemische Methodik

Faktor	Antikörper	Methode
ER	MAK ER-ICA Kit (Abott Denmark) unverdünnt, 1h, Raumtemperatur	APAAP
PR	MAK anti-PR (mPRI, Dianova Germany) 1:100, 1h, Raumtemperatur	APAAP
PCNA	MAK PC10 (DAKO Denmark) 1:20, 1h, Raumtemperatur	APAAP
c-erbB-2	MAK c-neu (Ab2, Dianova Germany) 1:100, 1h, Raumtemperatur	Streptavidin-Biotin
EGF-R	Anti-EGFR (Ab 4) polyklonal (Dianova Germany), 1:50, 1h, Raumtemperatur	Streptavidin-Biotin
p53	MAK BP53-12-1 (Biogenex USA), 1:20, 1h, Raumtemperatur	Avidin-Biotin

### *Labortechnische Methodik*

*ER - Immunhistochemischer Nachweis:* Nach Entparaffinierung in Xylol (2x3 min) und Rehydratation, Inkubation der Schnitte mit 0.1% Pronase (Merck Germany) für 5 min bei Raumtemperatur zur Demaskierung des Antigens.

Applikation des Primärantikörpers (ER-ICA Abbott Denmark) unverdünnt für 1 h bei Raumtemperatur gefolgt von einem mouse anti-rat IgG Brücken-AK (Dianova Germany) 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur. Inkubation mit einem rabbit anti-mouse Sekundär-AK (Dako Denmark) 1:40 für 30 min bei Raumtemperatur. Applikation des monoklonalen APAAP-Komplexes (Dako Denmark) 1:40 für 30 min bei Raumtemperatur. Wiederholung des 2. und 3. Inkubationsschrittes (Sekundär-AK und APAAP-Komplex) für jeweils 10 min Inkubation mit chromogener Substratlösung unter Verwendung von Neufuchsin. Leichte Gegenfärbung mit Harris Hämatoxylin. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten Spülung mit TRIS Puffer (0.05 m, pH 7.4-7.6). In jeder Versuchsreihe wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

*PR und PCNA - Immunhistochemischer Nachweis:* Entparaffinierung und Rehydratation in Xylol (2x3 min) und absteigender Alkoholreihe.

Applikation des Primärantikörpers anti-PR MAK (Dako Denmark) in einer Verdünnung von 1:200 oder des PC10 MAK (Dako Denmark) in einer Verdünnung 1:20 für 1 h bei Raumtemperatur. Inkubation mit einem rabbit anti-mouse Sekundär-AK (Dako Denmark) 1:40 für

30 min bei Raumtemperatur. Applikation des monoklonalen APAAP-Komplexes (Dako Denmark) 1:40 für 30 min bei Raumtemperatur. Wiederholung des 2. und 3. Inkubationsschrittes (Sekundär-AK und APAAP-Komplex) für jeweils 10 min. Inkubation mit chromogener Substratlösung unter Verwendung von Neufuchsin. Leichte Gegenfärbung mit Harris Hämatoxylin. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten Spülung mit TRIS Puffer (0.05 m, pH 7.4-7.6). In jeder Versuchsreihe wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

*EGF-R und c-erbB-2-Protein - Immunhistochemischer Nachweis:* Entparaffinierung und Rehydratation in Xylol (2x3 min) und absteigender Alkoholreihe. Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min bei Raumtemperatur. Applikation von Schwein-Normalserum 1:5 für 20 min bei Raumtemperatur zur Blockierung der unspezifischen Bindungsorte. Keine Spülung.

Applikation des Primär-AK Anti-EGF-R (Ab 4) polyklonal (Dianova Germany) 1: 50 für 1 h oder des c-neu MAK (Dianova Germany) 1:100 für 1 h bei Raumtemperatur. Inkubation mit biotinyliertem horseradish anti-mouse Sekundär-AK (Amersham Netherlands) 1:200 für 45 min bei Raumtemperatur. Applikation eines Streptavidin-Biotin-Peroxidase Komplexes (Amersham Netherlands) 1:200 für 15 min bei Raumtemperatur. Inkubation mit chromogener Substratlösung unter Verwendung von DAB. Leichte Gegenfärbung mit Harris Hämatoxylin.

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten Spülung mit PBS (0.01 m, pH 7.2). In jeder Versuchsreihe wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

*p53-Protein - Immunhistochemischer Nachweis:* Entparaffinierung und Rehydratation in Xylol (2x3 min) und absteigender Alkoholreihe. Vorbehandlung mit 0.05% Saponin für 30 min. Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min bei Raumtemperatur. Präinkubation mit Kaninchen-Normalserum (Dako Denmark) 1:10 für 20 min bei Raumtemperatur zur Blockierung der unspezifischen Bindungsorte. Keine Spülung. Applikation des Primär-MAK BP53-12-1 (Biogenex USA) 1:20 für 1 h bei Raumtemperatur. Inkubation mit biotinyliertem rabbit anti-mouse Brücken-AK (Dako Denmark) 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur. Applikation eines Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes (Dako Denmark) für 30 min bei Raumtemperatur. Inkubation mit chromogener Substratlösung unter Verwendung von DAB. Leichte Gegenfärbung mit Harris Hämatoxylin. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten Spülung mit TRIS Puffer (0.01 m, pH 7.2). In jeder Versuchsreihe wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

### Scoring

Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Olympus-Lichtmikroskops bei 40facher Vergrößerung durch zwei unabhängige Untersucher. Bei unterschiedlichen Einschätzungen wurde unter Verwendung eines Diskussionsmikroskops ein Konsensus erzielt. Es wurden mindestens 1000 Zellen pro Präparat ausgewertet. Für die Bestimmung der ER- und PR-Expression wurde die Anzahl eindeutig rot gefärbter Nuklei unabhängig vom Färbungsmuster als prozentualer Anteil aller Tumorzellnuklei ausgedrückt. Die PCNA-Expression zeigte eine charakteristische diffuse oder granuläre nukleäre Färbung. Eindeutig rot gefärbte Nuklei wurden unabhängig von Färbungsmuster und Intensität als positiv bewertet. Die Klassifikation erfolgte für die Steroidrezeptoren und die PCNA-Expression in drei semiquantitativen Gruppierungen (<20%/20%-50%/>50%) nach existierenden Laborstandards. Entsprechend der klinischen Relevanz wurde eine ER/PR-Expression von <20% als Rezeptor-negativ beurteilt. Eine Bestimmung der nukleären Färbungsintensität der ER/PR wurde primär durchgeführt, jedoch brachte deren Erfassung mit Hilfe eines Scores keine zusätzliche prognostische Aussage, so daß für die weiteren Analysen darauf verzichtet wurde.

Die Einschätzung der c-erbB-2-Proteinüberexpression, des EGF-R und des p53-Proteins erfolgte qualitativ nach positiver oder negativer Expression. Bei Reaktivität von mehr als 10% der Zellen wurde der Tumor als positiv bewertet.

In der Beurteilung der c-erbB-2-Proteinüberexpression wurden nur eindeutig membrangebundene Färbungen als positiv eingeschätzt. Die EGF-R-Färbung war nahezu

ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert. Für die Bewertung der p53-Expression wurden nur deutlich nukleäre Färbungen als positiv beurteilt.

### 1.3. Methodische Verfahren

#### 1.3.1. *Statistische Methodik*

Die primäre Datenerfassung und -haltung wurde mit Hilfe des Datenbanksystems dBasell plus durchgeführt. Die weiteren statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung der SPSS/Win 6.0 und BMDP-Software.

Der Effekt verschiedener OH-Einnahmecharakteristika und Gestagenkomponenten auf die Häufigkeitsverteilung histomorphologischer und tumorbiologischer Prognosefaktoren wurde durch die Schätzung von Odds Ratios (ORs) unter Nutzung von log-linearen Modellen dargestellt. Die exakten 95% Konfidenzintervalle (95% KI) wurden nach der Methode von Baptista und Pike ermittelt (Baptista and Pike 1977). Die Auswahl der Kovariablen erfolgte durch Vorwärtsselektion und Rückwärtselimination auf der Grundlage eines p-Wertes von 0.1 und 0.15 respektive.

Alle Faktoren wurden als binäre Variablen in den Analysen berücksichtigt. Der Einfluß rangkategorialer Variablen wurden mit Hilfe binärer Hilfsvariablen untersucht. Die Klassifikation aller verwendeten Variablen ist aus Tabelle 1.3-1 ersichtlich.

Tabelle 1.3-1 Verwendete Variablen und deren Kodierung

Variable	Kodierung
<i>Allgemeine Variablen</i>	
Alter (Jahre)	<35/≥35; <40/≥40; <45/≥45; <50/≥50
Menopausenstatus	prämenopausal/postmenopausal
Operationsmodus	Mastektomie/Brusterhaltung
Chemotherapie	nein/ja
<i>Histomorphologische Faktoren</i>	
Histologischer Tumortyp	DCI/andere; LCI/andere
Histologisches Grading	GI / GII+GIII; GI+GII / GIII
Tumorgröße	≤2cm/>2cm
Lymphknoten (LK)-Status	N0 / ≥1N+; ≤3N+ / ≥4N+
<i>Zellulär exprimierte Faktoren</i>	
ER-Expression	<20%/20%-50%/>50%
PR-Expression	<20%/20%-50%/>50%
PCNA-Expression	<20%/20%-50%/>50%
c-erbB-2-Proteinüberexpression	negativ/positiv
EGF-Rezeptor-Expression	negativ/positiv
p53-Proteinexpression	negativ/positiv
<i>Ovulationshemmer (OH)</i>	
OH-Einnahme	nein/ja
Dauer der Einnahme	keine OH/1-60 Monate/≥61 Monate
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose	keine OH/bis Diagnose/2-60Monate/>60
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose	keine OH/≤96/≥97 Monate
Alter bei 1. Einnahme	keine OH/<20/20-24/25-29/≥30 Jahre
OH-Typ (Gestagen)	keine OH/CMA/LNG/NETA/SP-NETA
<i>Epidemiologische Risikofaktoren</i>	
Menarchealter	≤12/13-14/≥15 Jahre
Alter bei erster Lebendgeburt	keine Lebendgeburt/≤19/20-29/≥30 Jahre
Anzahl der Lebendgeburten	keine/1-3/≥4
Alter bei erstem Stillen	nie gestillt/≤19/20-29/≥30 Jahre
Anzahl der gestillten Lebendgeburten	keine/1-3/≥4
Mammabiopsie	nein/ja
Mammakarzinom in Familie	nein/ja
Ausbildungszeit (Schule/Universität)	≤8/9-10/11-15/≥16 Jahre
Zervixzytologien (Anzahl)	keine/≥1 pro Jahr/zweijährlich/weniger

Das mediane Follow-up für die gesamte Patientengruppe belief sich auf 107 (5-151) Monate. Für lebende Patientinnen umfaßte das mediane Follow-up einen Zeitraum von 117 (48-151) Monaten, für verstorbene Patientinnen betrug die mediane Überlebenszeit 44.5 (5-130) Monate. Die Überlebensanalysen basierten auf dem Zeitraum zwischen beginnender Primärtherapie und dem Tod der Patientin oder dem letzten verzeichneten Kontakt. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Analyse waren 162 (34.4%) aller Patientinnen verstorben.

Univariate Überlebensanalysen wurden nach der Kaplan-Meier Methode durchgeführt (Kaplan and Meier 1958) und die Differenzen in den Überlebenskurven unter Verwendung des Logrank-Testes auf Signifikanz geprüft (Peto et al. 1977).

Für die multivariaten Überlebensanalysen wurde das proportionale Hazard-Modell nach Cox verwendet (Cox 1972).

Die primäre Auswahl der Kovariablen erfolgte unter Einschluß aller histomorphologischen (Tumortyp, Grading, Tumorgröße, LK-Status) und zellulär exprimierten (ER, PR, PCNA, EGF-R, c-erbB-2, p53) Prognosefaktoren, des Alters in 5-Jahresgruppen, des Menarchealters, des Menopausenstatus und der Therapiemodalitäten. Sämtliche Variablen, die in dieser Analyse signifikant waren, wurden als Kovariable für alle weiteren multivariaten Überlebensanalysen

berücksichtigt (Tab. 2.3-4).

Um die Korrelation zwischen Paaren von Einzelfaktoren berücksichtigen zu können, wurden, wenn notwendig, Wechselwirkungsfaktoren in das Modell eingefügt.

Zur Analyse der zeitabhängigen Veränderung der Wertigkeit von Prognosefaktoren wurden die Hazard Ratios (HRs) für die einzelnen Prognosefaktoren in jährlichen Abständen jeweils für das n-te Jahr nach der Diagnose des Mammakarzinoms ermittelt. Nach längerem Follow-up war es für manche Faktoren aufgrund der abnehmenden Fallzahl nicht mehr möglich konsistente Schätzungen durchzuführen. Die Analysen wurden in diesen Fällen nicht weitergeführt.

### 1.3.2. *Methodenkritik*

#### 1.3.2.1. Epidemiologische Methodik

Die Rekrutierung der Patientinnen für die vorliegende Studie erfolgte durch die konsekutive Erfassung aller nach 1930 geborenen Frauen, die im Beobachtungszeitraum wegen eines Mammakarzinoms stationär aufgenommenen und primär operiert wurden. Die Therapie erfolgte an einer Einrichtung nach während der Laufzeit der Studie gleichbleibenden Richtlinien. Der Versorgungsbereich der Einrichtung erstreckte sich über die gesamte Region Berlin-Ost/Brandenburg. Selection Bias durch gezielte Zuweisungen können in diesem Zusammenhang weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die primäre Erfassung der Daten erfolgte auf der Grundlage eines standardisierten Fragebogens durch geschulte Interviewer zum Zeitpunkt des ersten stationären Aufenthaltes. Von ursprünglich erfaßten 502 Patientinnen, lehnten drei Patientinnen die Teilnahme an der Studie ab. Neun Frauen wurden wegen eines bereits früher diagnostizierten Mammakarzinoms aus der Studie ausgeschlossen. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Interviewer und Response Bias kann aufgrund dieses Vorgehens als gering angesehen werden.

Im Rahmen der Befragung wurde eine komplette gynäkologisch-geburtshilfliche Anamnese aufgenommen. Darüberhinaus wurden das Kontrazeptionsverhalten und die Einnahme hormoneller Präparate möglichst vollständig erfaßt. Zu diesem Zweck standen den Patientinnen Kalender und visuelles Anschauungsmaterial zu allen im Handel befindlichen Präparaten zur Verfügung. Wesentliche anamnestische Angaben und Daten zur OH-Einnahme wurden durch Rückfragen bei behandelnden Ärzten validiert (Nischan et al. 1993). Auf diese Weise wurden Recall Bias als eine wesentliche Fehlerquelle bei retrospektiver Datenerfassung weitgehend reduziert.

Zum Ausschluß von Confounding Effekten wurde eine möglichst weitreichende Erfassung von Confounding Faktoren (Störvariable) durchgeführt. Dabei handelt es sich um Faktoren, die potentiell sowohl mit der Erkrankung als auch mit der analysierten Einflußgröße assoziiert sind und dadurch bei Nichtberücksichtigung zu Verzerrungen der untersuchten kausalen Zusammenhänge führen. Als klassische Confounder im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Problematik der OH kommen Variablen wie Geschlecht, Alter, sozioökonomischer Status sowie die Menstruations- und Reproduktionsanamnese in Frage (Chilvers and Deacon 1990). Diese Faktoren wurden in den durchgeführten Analysen berücksichtigt. Die Altersstandardisierung erfolgte in 5-Jahresgruppen.

Als weitere Fehlerquelle epidemiologischer Studien wird die Möglichkeit des Auftretens von Surveillance Bias angesehen. Patientinnen, die OH eingenommen haben, befanden sich zumindest über diesen Zeitraum in regelmäßiger ärztlicher Betreuung, was potentiell eine bessere Diagnostik und damit Vorverschiebung des Diagnosezeitpunktes zur Folge haben kann. Eine echte Früherkennung wie sie heute durch die Verbreitung der Mammographie verstärkt erfolgt, war allerdings zum Zeitpunkt der Rekrutierung noch nicht möglich. Die Stadienverteilung in der vorliegenden Studie zeigte keine signifikanten Unterschiede zugunsten der Patientinnen,

die OH eingenommen hatten, so daß das Vorliegen von Surveillance Bias weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Theoretisch können andere Selektionsmechanismen, die mit der OH-Einnahme verbunden sind, zu weiteren systematischen Fehlern in Studien zu diesem Thema führen (Hemminki 1996). So werden OH zumeist von fertilen Frauen mit aktivem Sexualleben verwendet. Frauen, die niemals OH eingenommen haben, könnten ein von diesen verschiedenes hormonelles Profil aufweisen, was letztlich zur Prägung eines biologisch anderen Tumortyps beitragen könnte. Der Anteil von Frauen ohne Schwangerschaften und auch der ohne Lebendgeburten ist in der vorliegenden Studie allerdings gering und zeigte keine Abhängigkeit von der OH-Einnahme, so daß das Vorliegen derartiger Selektionsmechanismen eher unwahrscheinlich erscheint.

In der Studie entsprechen die Häufigkeitsverteilung der histomorphologischen Faktoren Tumortyp, Tumorgroße, LK-Status und Grading sowie die Expressionsraten aller bestimmten zellulär exprimierten Faktoren ER/PR, PCNA, EGF-R, c-erbB-2 und p53 für die Gesamtgruppe den für repräsentative, statistisch gut abgesicherte Studien erwarteten Häufigkeiten (Lipponen et al. 1992, Pujol et al. 1994, Gasparini et al. 1998). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Fehler in der Zusammensetzung der Studienpopulation durch mögliche Selektionsmechanismen weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

#### 1.3.2.2. Histomorphologie und Immunhistochemie

Das histologische Grading ist aufgrund der der Methode innewohnenden subjektiven Komponente am häufigsten Gegenstand fachlicher Diskussionen zur Reproduzierbarkeit histomorphologischer Befunde (Dalton et al. 1994, Kronqvist et al. 1997). In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Klassifikation des histologischen Gradings und des Tumortyps durch den bestätigten Referenzpathologen der WHO-Studie (Stalsberg et al. 1989). Die umfangreiche Erfahrung des pathologischen Referenzentrums lieferte eine weitgehende Garantie für die Erstellung reproduzierbarer und international vergleichbarer Befunde.

Das immunhistochemische Scoring folgt international einer Vielzahl unterschiedlicher Scoringssysteme, die bis heute die Erstellung gültiger Standards und die Validierung von Prognosefaktoren erschweren. In Anlehnung an die Mehrzahl internationaler Studien zur Validierung immunhistochemisch bestimmter Faktoren wurde das Scoring in der vorliegenden Studie auf der Grundlage der Analyse von mindestens 1000 Zellen durchgeführt. Nach Ermittlung des prozentualen Anteils positiv gefärbter Zellen erfolgte die semiquantitative (ER/PR/PCNA) oder qualitative Klassifikation der Faktoren EGF-R/c-erbB-2/p53 nach intern existierenden Laborstandards. Entsprechend den Anforderungen zur Validierung von Prognosefaktoren waren diese anhand von Pilotserien aufgestellt und später in der Routine an repräsentativen Serien kontrolliert worden (Clark 1994). Auf die Erfassung der Färbungsintensität wurde verzichtet, da deren Berücksichtigung durch Scoring-Indices im Rahmen der Validierung der Methode keine zusätzlichen Informationen erbracht hatte (Schönborn et al. 1995).

Untersuchungen zum Einfluß der Fixation auf die immunhistochemische Reaktivität weisen auf die Gefahr der kontinuierlichen Abnahme der Immunoreaktivität mit zunehmender Fixationsdauer hin (Hall et al. 1990, Fisher et al. 1994). Darüberhinaus kann eine inhomogene Gewebsfixierung des histologischen Materials zur nachfolgenden Beeinträchtigung der Immunoreaktivität im heterogenen Tumorgewebe führen. Diesem Effekt wird ein Teil der hohen Variabilität der Färbungsintensität bei immunhistochemischen Bestimmungen zugeschrieben (Visscher et al. 1992). Unterschiedliche Fixationslösungen können ebenso zu Differenzen in der immunhistochemischen Anfärbbarkeit führen (Fisher et al. 1994). In der vorliegenden Studie wurde das Gewebe über maximal 26 Stunden in 4% Formalin fixiert. Nach publizierten Untersuchungen sind infolge dieses Procederes keine signifikanten Einschränkungen der Immunoreaktivität durch den Verlust und die Maskierung von Liganden zu erwarten. Eine Veränderung der Immunoreaktivität durch die inhomogene Fixierung einzelner Gewebe kann dadurch jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Darüberhinaus existieren kontroverse Auffassungen zum denaturierenden Einfluß der Antrocknung von Paraffinschnitten bei höheren Temperaturen und zur Lagerung solcher Präparate (Fisher 1994, Prioleau 1995). Zur Vermeidung von Bestimmungsfehlern durch Denaturierung von Liganden wurden primär verschiedene Präparationsmodalitäten getestet. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den erzielten immunhistochemischen Befunden zwischen Präparaten nach Lufttrocknung über 24 h bei Raumtemperatur, nach Trocknung über 2 h bei 37°C und Trocknung über 20 min bei 50°C (Schönborn et al. 1995). Eine langfristige Lagerung von beschichteten Objektträgern zur späteren Durchführung der immunhistochemischen Bestimmungen fand nicht statt.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Deskription

#### 2.1.1. Ovulationshemmer - Einnahmecharakteristika

Von den 471 Patientinnen, die für die Studie rekrutiert worden waren, hatten 297 Frauen (63.1%) zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose des Mammakarzinoms Ovulationshemmer (OH) eingenommen. Tabelle 2.1-1 faßt die Charakteristika der OH-Einnahme aller Patientinnen zusammen.

Tabelle 2.1-1 Ovulationshemmer (OH)-Einnahmecharakteristika

Ovulationshemmer	Anzahl 297	(%) (100)
<hr/>		
Dauer der Einnahme (Monate)		
1 - 24	63	(21.2)
25 - 60	50	(16.8)
61 - 120	92	(31.0)
> 120	92	(31.0)
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose (Monate)		
≤ 1	92	(31.0)
2 - 24	53	(17.8)
25 - 60	61	(20.5)
61 - 120	56	(18.9)
> 120	35	(11.8)
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose (Monate)		
1 - 96	50	(16.8)
97 - 132	57	(19.2)
133 - 168	84	(28.3)
> 168	104	(35.0)
unbekannt	2	( 0.7)
Alter bei erster Einnahme (Jahre)		
< 20	7	( 2.4)
20 - 24	43	(14.5)
25 - 29	63	(21.2)
30 - 34	86	(29.0)
35 - 39	59	(19.9)
> 39	39	(13.1)
Einnahme vor 1. Lebendgeburt		
ja	14	( 4.7)
nein	260	(87.5)
keine Lebendgeburt	23	( 7.7)

Wurden die Patientinnen mit OH-Einnahme als Gesamtgruppe betrachtet, so hatten 113 Frauen (38%) nur maximal 5 Jahre OH verwendet und jeweils 92 Patientinnen (je 31.0%) verwendeten OH über 5 bis 10 Jahre und über mehr als 10 Jahre.



Die verwendeten OH waren überwiegend Kombinationspräparate. Nur 8 Frauen (2.7%) hatten zur Kontrazeption ausschließlich Sequenzpräparate eingenommen. Die im Zeitraum der Studie verfügbaren OH enthielten entweder Ethinylestradiol oder Mestranol als Östrogen und Chlormadinon (CMA), Norethisteronacetat (NETA) oder Levonorgestrel (LNG) als Gestagenkomponente. Am häufigsten wurden CMA-oder NETA-haltige Kombinationspräparate benutzt. Die Charakteristika der Gestagen-Einnahme sind in Tabelle 2.1-2 zusammengefaßt.

Tabelle 2.1-2 Gestagenkomponenten und Einnahmecharakteristika

Gestagenkomponente	Anzahl (%)	
	297	(100)
<b>Ersteinnahme</b>		
NETA	83	(27.9)
NETA in SP <sup>1</sup>	15	( 5.1)
CMA	171	(57.6)
LNG	24	( 8.1)
unbekannt	4	( 1.3)
<b>ausschließlich</b>		
NETA	34	(11.4)
NETA in SP <sup>1</sup>	8	( 2.7)
CMA	53	(17.8)
LNG	19	( 6.5)
mehrere OH	183	(61.6)
<b>überwiegend</b>		
NETA	116	(39.0)
NETA in SP <sup>1</sup>	22	( 7.4)
CMA	100	(33.7)
LNG	57	(19.2)
unbekannt	2	( 0.7)
<b>jemals</b>		
NETA	182	(61.3)
NETA in SP <sup>1</sup>	60	(20.0)
CMA	189	(63.6)
LNG	126	(42.4)

<sup>1</sup> Sequenzpräparate

### 2.1.2. Epidemiologische Risikofaktoren

Epidemiologische Faktoren, die einen direkten Einfluß auf biologische Veränderungen der Brustdrüse haben und solche, die mittelbar zu einer Beeinflussung des Erkrankungsverlaufes führen können, wurden in die Untersuchungen einbezogen. Somit wurden Angaben zu Eigen- und Familienanamnese (FA), Menarche, Geburts- und Stillverhalten, Menopause und zum Vorsorgeverhalten als auch zur schulischen und universitären Ausbildung erfaßt. Eine Übersicht zur Häufigkeitsverteilung der in diesen Analysen berücksichtigten Faktoren geben die Tabellen 2.1-3 und 2.1-4.

Tabelle 2.1-3 Häufigkeitsverteilung epidemiologischer Risikofaktoren: Schwangerschaft und Stillen

Faktor	n	(% )
	471	(100)
<hr/>		
Alter bei 1. Lebendgeburt (Jahre)		
<20	82	(17.4)
20 - 24	205	(43.5)
25 - 29	88	(18.7)
>29	34	( 7.2)
keine Lebendgeburt	14	( 3.0)
nie schwanger	48	(10.2)
Anzahl der Lebendgeburten		
keine	62	(13.2)
1 - 3	373	(79.2)
≥4	36	( 7.6)
Alter bei erstmaligem Stillen		
≤19	73	(15.5)
20 - 24	188	(39.9)
25 - 29	76	(16.1)
>29	22	( 4.7)
nicht gestillt	50	(10.6)
keine Lebendgeburt	62	(13.2)
Anzahl gestillter Lebendgeburten		
1 - 3	333	(70.7)
≥4	26	( 5.5)
nicht gestillt	50	(10.6)
keine Lebendgeburt	62	(13.2)

Tabelle 2.1-4 Häufigkeitsverteilung epidemiologischer Risikofaktoren

Faktor	(n)	(%)
	471	(100)
<hr/>		
Menarchealter (Jahre)		
<13	104	(22.1)
13 - 14	232	(49.3)
>14	135	(28.7)
Menopausenstatus		
prämenopausal	373	(79.2)
postmenopausal	98	(20.8)
Mammabiopsien		
ja	59	(12.5)
nein	412	(87.5)
Mammakarzinom bei Verwandten I. Grades		
ja	29	( 6.2)
nein	419	(89.0)
unbekannt	23	( 4.9)
Mammakarzinom bei Verwandten II. Grades		
ja	17	( 3.6)
nein	346	(73.5)
unbekannt	108	(22.9)
Ausbildungsjahre der Patientinnen		
≤8	263	(55.8)
9 - 10	75	(15.9)
11 - 15	86	(18.3)
>15	47	(10.0)
Ausbildungsjahre der Partner		
≤8	234	(49.7)
9 - 10	59	(12.5)
11 - 15	53	(11.3)
>15	94	(20.0)
unbekannt	31	( 6.6)

### 2.1.3. Histomorphologische und immunhistochemische Faktoren

Die überwiegende Anzahl der untersuchten Mammakarzinome (327/69.4%) waren vom duktal invasiven Typ. 133 (28.2%) Tumoren waren gut-, 187 (39.7%) mäßig- und 151 (32.1%) schlecht differenziert. Die Tumoren wiesen in 216 (45.9%) Fällen keinen LK-Befall auf und waren in 135 (28.7%) Fällen nicht größer als 2 cm. Die Tabelle 2.1-5 gibt einen detaillierten Überblick zur Häufigkeitsverteilung der erfaßten histomorphologischen Faktoren.

Tabelle 2.1-5 Häufigkeitsverteilung histomorphologischer Faktoren

Faktor	n	(%)
	471	(100)
<hr/>		
Histologischer Tumortyp		
duktal invasiv	327	(69.4)
lobulär invasiv	67	(14.2)
andere	77	(16.3)
Histologisches Grading		
I	133	(28.2)
II	187	(39.7)
III	151	(32.1)
Tumorgröße		
≤2 cm	135	(28.7)
> 2 cm	336	(71.3)
Anzahl positiver LK		
keine	216	(45.9)
1 - 3	111	(23.6)
≥4	144	(30.6)

Die Bestimmung der ER/PR-Expression, der PCNA-Expression, der Expression des EGF-R sowie des c-erbB-2- und p53-Proteins erfolgte immunhistochemisch.

In 28% der Fälle zeigten die Tumoren eine geringe ER-Expression von weniger als 20% und in 31.2% der Fälle lag die PR-Expression der Tumoren unter 20%.

Die PCNA-Proliferationsfraktion zeigte in 26.3% der Fälle eine niedrige (<20%), in 60.3% eine mäßige (20%-50%) und in 13.4% eine hohe (>50%) Expression. 21% aller Mammakarzinome zeigten eine positive c-erbB-2-Proteinüberexpression, 44.6% der Tumoren waren EGF-R-positiv und 29.7% waren positiv für das p53-Protein. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Häufigkeitsverteilung der zellulär exprimierten Faktoren gibt Tabelle 2.1-6.

Tabelle 2.1-6 Häufigkeitsverteilung zellulär exprimierter Faktoren

Faktor	n	(%)
	471	(100)
<hr/>		
ER-Expression		
<20%	132	(28.0)
20% - 50%	251	(53.3)
>50%	88	(18.7)
PR-Expression		
<20%	147	(31.2)
20% - 50%	271	(57.5)
>50%	53	(11.3)
PCNA-Expression		
<20%	124	(26.3)
20% - 50%	284	(60.3)
>50%	63	(13.4)
c-erbB-2-Proteinüberexpression		
negativ	364	(77.3)
positiv	99	(21.0)
unbekannt	8	( 1.7)
EGF-R-Expression		
negativ	248	(52.7)
positiv	210	(44.6)
unbekannt	13	( 2.8)
p53-Proteinexpression		
negativ	325	(69.0)
positiv	140	(29.7)
unbekannt	6	( 1.3)

## 2.2. Ovulationshemmer (OH) und Tumorcharakteristika

Die OH-Einnahme wurde hinsichtlich individueller Einnahmecharakteristika aufgeschlüsselt. Dabei wurden Unterschiede in der Einnahmedauer, im Einnahmezeitpunkt und im Einnahmeverhalten betreffend verschiedener Präparate herausgearbeitet. Diese Faktoren wurden in ihrer Wirkung auf die Häufigkeitsverteilung histomorphologischer Faktoren und zellulär exprimierter Marker untersucht.

Alle Untersuchungen wurden sowohl uni-als auch multivariat durchgeführt. Die multivariaten Analysen wurden nach Alter bei Diagnose, Anzahl der Lebendgeburten, Alter bei der ersten Lebendgeburt, Anzahl gestillter Kinder und stattgehabten Mammabiopsien adjustiert, womit der Einfluß wesentlicher Confounding-Faktoren im Ansatz berücksichtigt wurde.

### 2.2.1. Einfluß von OH-Einnahmedauer und Einnahmezeitpunkt

Die Gesamtdauer der OH-Einnahme, der zeitliche Abstand der letzten OH-Einnahme und der zeitliche Abstand der ersten OH-Einnahme zur Diagnose waren wesentliche Faktoren zur Charakterisierung des Einnahmeverhaltens der Patientinnen in der Studiengruppe.

### 2.2.1.1. Histomorphologische Faktoren

Eine tabellarische Übersicht zur Häufigkeitsverteilung histomorphologischer Faktoren in Abhängigkeit von den erfaßten OH-Einnahmecharakteristika gibt Tabelle 2.2-1 (ergänzend Anhang Tab. A2.2-1 bis A2.2-9).

#### *Einnahme jemals*

Die OH-Einnahme zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose des Mammakarzinoms zeigte keinen Einfluß auf die Häufigkeitsverteilung etablierter histomorphologischer Faktoren wie Tumortyp, Grading, Tumorgroße und LK-Befall.

#### *Einnahmedauer*

Nach OH-Langzeiteinnahme (>60 Monate) war das Risiko für das Auftreten schlecht differenzierter Tumoren signifikant erhöht (OR 1.69). Dagegen zeigte die Häufigkeitsverteilung der anderen histomorphologischen Faktoren Tumortyp, Tumorgroße und LK-Status keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Dauer der OH-Einnahme.

#### *Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose*

Patientinnen, die OH bis zur Diagnose eingenommen hatten, wiesen gegenüber denen ohne OH-Einnahme eine signifikante Risikoerhöhung für das Auftreten von LK-positiven (OR 2.14) und schlecht differenzierten Tumoren auf (OR 2.01).

#### *Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose*

Weder der histologische Tumortyp, noch das histologische Grading, die Tumorgroße oder der LK-Befall zeigten statistisch signifikante Veränderungen in der Häufigkeit ihres Auftretens in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der ersten OH-Einnahme zur Diagnose.

### Einnahmezeitraum

Die Häufigkeitsverteilung der histomorphologischen Faktoren zeigte keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose des Mammakarzinoms im Vergleich zur Einnahme zu anderen Zeiten vor der Diagnose oder ohne OH-Einnahme.

Tabelle 2.2-1 Adjustierte Odds Ratios für die Häufigkeit des Auftretens histomorphologischer Faktoren in Abhängigkeit von verschiedenen OH-Einnahmecharakteristika

OH-Variable	Prognosefaktoren OR (95% KI) <sup>1</sup>			
	Tumortyp	Grading	Tumorgröße	LK-Status
OH-Einnahme jemals				
nein	1.00	1.00	1.00	1.00
ja	ns	ns	ns	ns
Einnahmedauer (Monate)				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
1 - 60	ns	ns	ns	ns
>60	ns	1.69 (1.00-2.84) <sup>2</sup>	ns	ns
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose (Monate)				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
OH bis zur Diagnose	ns	2.01 (1.08-3.75) <sup>2</sup>	ns	2.14 (1.16-3.94) <sup>3</sup>
2 - 60	ns	ns	ns	ns
>60	ns	ns	ns	ns
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose (Monate)				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
≤96	ns	ns	ns	ns
≥97	ns	ns	ns	ns
Einnahmezeitraum (5.-8. Jahr vor der Diagnose)				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
5.-8. Jahr	ns	ns	ns	ns
andere Zeiten	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Odds Ratios (OR) adjustiert nach Alter (5-Jahresgruppen), Mammabiopsien (ja/nein), Alter bei erster Lebendgeburt (<19/20-29/>29 Jahre), Anzahl der Lebendgeburten (0/1-3/≥4), Anzahl gestillter Kinder (0/1-3/≥4); Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (95%KI) nur bei Signifikanz angegeben: (0.95 - >1.00 KI mit aufgeführt); nicht signifikant als ns abgekürzt; Referenzgruppe 'keine OH' mit OR=1

<sup>2</sup> GI+GII / GIII

<sup>3</sup> LK-negativ / LK-positiv

### 2.2.1.2. Hormonrezeptoren und Proliferationsverhalten

Die Expression der ER/PR-Rezeptoren sowie die der PCNA-Proliferationsfraktion wurde in Abhängigkeit von verschiedenen OH-Einnahmecharakteristika untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2-2 zusammengefasst.

#### *Einnahme jemals*

Patientinnen, die jemals OH eingenommen hatten, zeigten signifikant häufiger Tumoren mit stark-positiver ER-Expression (OR 2.40) und mäßig erhöhter Proliferationsaktivität (OR 1.75). Die PR-Expression zeigte keine Unterschiede zu den Tumoren von Patientinnen, die niemals OH eingenommen hatten.

#### *Einnahmedauer*

Die OH-Einnahme war mit einer signifikanten Zunahme der Häufigkeit für das Auftreten von Tumoren mit stark positiver ER-Expression (>50%) verbunden (OR 2.40). Diese Korrelation war sowohl nach der OH-Einnahme bis zu 60 Monaten (OR 2.67) als auch darüberhinaus (OR 2.22) nachweisbar. Nach OH-Einnahme zeigte sich eine Erhöhung des Risikos für die Diagnose von Tumoren mit mittlerer Proliferationsfraktion (PCNA 20%-50%) gegenüber der Häufigkeit für die Gruppe ohne OH-Einnahme. Dieser Effekt war für Patientinnen mit einer OH-Einnahmedauer von ≤60 Monaten statistisch signifikant (OR 1.93), während das Ergebnis für die Langzeiteinnahme die Grenze zur statistischen Signifikanz knapp verfehlte. Die PR-Expression zeigte keine Abhängigkeit von der Dauer der OH-Einnahme.

#### *Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose*

Patientinnen, die ihre OH-Einnahme bereits vor der Diagnosestellung beendet hatten, wiesen signifikant häufiger Tumoren mit hoher ER-Expression auf (OR 2.94 bzw. 2.35) als Patientinnen, die OH bis zur Diagnose verwendet hatten oder jene, die niemals OH eingenommen hatten. Für Patientinnen, die bis zur Diagnose des Mammakarzinoms OH eingenommen hatten, war neben der signifikanten Zunahme der Anzahl von Tumoren mit mäßiger Proliferationsaktivität (OR 2.69) auch die Häufigkeit von Tumoren mit sehr hoher PCNA-Expression (PCNA>50% OR 2.13) deutlich erhöht (ergänzend Anhang Tab. A2.2-5). Es fanden sich keine Differenzen in der PR-Expression der Tumoren zwischen den untersuchten Gruppen.

#### *Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose*

Die Assoziation von OH-Einnahme und stark positivem ER-Status war sowohl nach der ersten OH-Einnahme bis zu acht Jahre vor der Diagnose (OR 3.69) als auch nach der ersten OH-Einnahme mehr als acht Jahre vor der Diagnose (OR 2.16) statistisch signifikant. Beide Untergruppen zeigten ebenso eine Risikozunahme für das Auftreten von Tumoren mit mittlerer PCNA-Expression (20%-50%). Dieses Ergebnis erreichte jedoch nur bei erster OH-Einnahme mehr als acht Jahre vor der Diagnose statistische Signifikanz (OR 1.75). Die PR-Expression zeigte keine Korrelationen zur OH-Einnahme.

#### *Einnahmezeitraum*

Die Zunahme der Anzahl stark ER-positiver Tumoren war sowohl nach der Einnahme von OH im 5. bis 8. Jahr vor der Diagnose (OR 2.53) als auch nach der OH-Einnahme zu anderen Zeiten vor der Diagnose (OR 2.29) statistisch signifikant. Die PR-Expression zeigte keine Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit vom OH-Einnahmezeitraum. Die Risikoerhöhung für das Auftreten von Tumoren mit mittlerer Proliferationsaktivität erreichte nach der OH-Einnahme im 5. bis 8. Jahr vor der Diagnose statistische Signifikanz (OR 1.78), während diese Korrelation nach der OH-Einnahme zu anderen Zeiten vor der Diagnose (OR 1.73) die statistische Signifikanzgrenze nur knapp verfehlte.



Tabelle 2.2-2 Adjustierte Odds Ratios für die Häufigkeit der Expression der Estrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und der PCNA-Proliferationsfraktion in Abhängigkeit von verschiedenen OH-Einnahmecharakteristika

OH-Variable	Prognosefaktoren OR (95%KI) <sup>1</sup>		
	ER-Status	PR-Status	PCNA
OH-Einnahme jemals			
nein	1.00	1.00	1.00
ja	2.40 (1.33-4.33) <sup>2</sup>	ns	1.75 (1.07-2.86) <sup>3</sup>
Einnahmedauer (Monate)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
1 - 60	2.67 (1.35-5.26) <sup>2</sup>	ns	1.93 (1.06-3.51) <sup>3</sup>
>60	2.22 (1.17-4.23) <sup>2</sup>	ns	1.64 (0.95-2.81) <sup>3</sup>
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose (Monate)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
bis zur Diagnose	ns	ns	2.13 (0.95-4.81) <sup>4</sup>
2 - 60	2.94 (1.50-5.79) <sup>2</sup>	ns	ns
>60	2.35 (1.17-4.74) <sup>2</sup>	ns	ns
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose (Monate)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
≤96	3.69 (1.62-8.42) <sup>2</sup>	ns	ns
≥97	2.16 (1.18-3.98) <sup>2</sup>	ns	1.75 (1.05-2.91) <sup>3</sup>
Einnahmezeitraum (5.-8. Jahr vor der Diagnose)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
5.-8. Jahr	2.53 (1.30-4.90) <sup>2</sup>	ns	1.78 (1.01-3.13) <sup>3</sup>
andere Zeiten	2.29 (1.19-4.40) <sup>2</sup>	ns	1.73 (0.99-3.01) <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Odds Ratios (OR) adjustiert nach Alter (5-Jahresgruppen), Mammabiopsien (ja/nein), Alter bei erster Lebendgeburt (<19/20-29/>29 Jahre), Anzahl der Lebendgeburten (0/1-3/≥4), Anzahl gestillter Kinder (0/1-3/≥4); Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (95%KI) nur bei Signifikanz angegeben: (0.95 - >1.00 KI mit aufgeführt); nicht signifikant als ns abgekürzt; Referenzgruppe 'keine OH' mit OR=1

<sup>2</sup> ER ≤50%/>50%

<sup>3</sup> PCNA <20%/≥20%

<sup>4</sup> PCNA ≤50%/>50%

### 2.2.1.3. Wachstumsfaktoren und Protoonkogene

Die EGF-R-Expression, die c-erbB-2-Proteinüberexpression und die p53-Proteinexpression wurden in Abhängigkeit von der OH-Einnahmedauer, vom Abstand der ersten/letzten OH-Einnahme zur Diagnose sowie vom Einnahmezeitraum untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2-3 zusammengefasst (ergänzend Anhang Tab. A2.2-1 bis A2.2-9).

#### *Einnahme jemals*

Patientinnen, die irgendwann vor der Diagnose OH eingenommen hatten, wiesen signifikant häufiger Tumoren mit positiver EGF-R-Expression auf (OR 1.60).

#### *Einnahmedauer*

Patientinnen, die bis zu 5 Jahren OH eingenommen hatten, zeigten eine Risikoerhöhung für das Auftreten EGF-R-positiver Mammakarzinome (OR 1.73) gegenüber Patientinnen, die keine OH eingenommen hatten.

Die c-erbB-2-Proteinüberexpression und die p53-Proteinexpression zeigten dagegen keine Korrelation zur Einnahmedauer.

#### *Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose*

Patientinnen, die mehr als fünf Jahre vor der Diagnose letztmalig OH eingenommen hatten, zeigten ein signifikant erhöhtes Risiko für die Diagnose EGF-R-positiver Tumoren (OR 2.00) gegenüber Patientinnen, die niemals OH eingenommen hatten.

Die c-erbB-2-Proteinüberexpression und die p53-Proteinexpression zeigten keine Veränderungen in der Häufigkeit ihres Auftretens in Abhängigkeit vom Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose.

#### *Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose*

Patientinnen, die mit der OH-Einnahme mehr als acht Jahre vor der Diagnose begonnen hatten, wiesen ebenfalls eine signifikante Risikoerhöhung für die Diagnose EGF-R-positiver Tumoren auf (OR 1.77), während sich in Bezug auf die c-erbB-2-Proteinüberexpression und die p53-Proteinexpression keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen, die OH eingenommen hatten und denen, die keine OH verwendet hatten, zeigten.

#### *Einnahmezeitraum*

Bei OH-Einnahme im 5. bis 8. Jahr vor der Diagnose ergaben sich keine Differenzen in der EGF-R-Expression gegenüber der Gruppe ohne OH-Einnahme. Die OH-Einnahme zu anderen Zeiten war dagegen mit einer signifikanten Risikoerhöhung für das Auftreten EGF-R-positiver Tumoren verbunden (OR 1.86).

Die c-erbB-2-Proteinüberexpression und die p53-Proteinexpression zeigten keine Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit vom OH-Einnahmezeitraum.

Tabelle 2.2-3 Adjustierte Odds Ratios für die Häufigkeit der c-erbB-2-Proteinüberexpression, EGF-R-Expression und p53-Proteinexpression in Abhängigkeit von verschiedenen OH-Einnahmecharakteristika

OH-Variable	Prognosefaktoren OR (95%KI) <sup>1</sup>		
	c-erbB-2	EGF-R	p53
OH-Einnahme jemals			
nein	1.00	1.00	1.00
ja	ns	1.60 (1.03-2.48) <sup>2</sup>	ns
Einnahmedauer (Monate)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
1 - 60	ns	1.73 (1.02-2.94) <sup>2</sup>	ns
>60	ns	ns	ns
Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose (Monate)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
bis Diagnose	ns	ns	ns
2 - 60	ns	ns	ns
> 60	ns	2.00 (1.15-3.48) <sup>2</sup>	ns
Abstand der ersten Einnahme zur Diagnose (Monate)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
≤96	ns	ns	ns
≥97	ns	1.77 (1.12-2.80) <sup>2</sup>	ns
Einnahmezeitraum (5.-8. Jahr vor der Diagnose)			
keine OH	1.00	1.00	1.00
5.-8. Jahr	ns	ns	ns
andere Zeiten	ns	1.86 (1.13-3.05) <sup>2</sup>	ns

<sup>1</sup> Odds Ratios (OR) adjustiert nach Alter (5-Jahresgruppen), Mammabiopsien (ja/nein), Alter bei erster Lebendgeburt (<19/20-29/>29 Jahre), Anzahl der Lebendgeburten (0/1-3/≥4), Anzahl gestillter Kinder (0/1-3/≥4); Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (95%KI) nur bei Signifikanz angegeben: (0.95 - >1.00 KI mit aufgeführt); nicht signifikant als ns abgekürzt; Referenzgruppe 'keine OH' mit OR=1

<sup>2</sup> EGF-R-negativ/EGF-R-positiv

### 2.2.2. *Einfluß verschiedener Gestagenkomponenten*

Die Gestagenkomponenten der verwendeten OH wurden durch Chlormadinon (CMA), Levonorgestrel (LNG) oder Norethisteronacetat (NETA) gestellt. Alle LNG- und NETA-haltigen OH enthielten das Östrogen Ethinylestradiol, während Mestranol als östrogenen Bestandteil des CMA-haltigen OH verwendet wurde. Die biologische Wirkform des Mestranols entsteht ebenfalls in Form von Ethinylestradiol nach C<sub>3</sub>-Demethylierung in der Leber. Tabelle 2.2-4 gibt eine Zusammenfassung der Ausprägung histomorphologischer Befunde in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten.

#### 2.2.2.1. *Histomorphologische Faktoren*

Der histologische Tumortyp, die Tumorgroße und der LK-Befall wiesen keine Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit von den verschiedenen eingesetzten Gestagenkomponenten auf. Dagegen zeigte die Verteilung des histologischen Gratings Differenzen in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten.

##### *Einnahme jemals*

Bei OH-Einnahme zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose des Mammakarzinoms war die Einnahme CMA-haltiger OH mit einem statistisch signifikant erhöhten Risiko für das Auftreten schlecht differenzierter Tumoren verbunden (OR 1.89). Die Einnahme LNG- oder NETA-haltiger OH hatte dagegen keinen Einfluß auf das histologische Grading.

##### *Einnahmedauer*

Bei überwiegender Einnahme eines NETA-haltigen kombinierten OH zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung des Risikos für die Diagnose schlecht differenzierter Mammakarzinome (OR 2.14) gegenüber der Gruppe ohne OH-Einnahme. Weder CMA-haltige noch LNG-haltige OH zeigten bei überwiegender Einnahme einen Einfluß auf das histologische Grading. Auch die Einnahme NETA-haltiger Sequenzpräparate hatte keinen Einfluß auf den histologischen Differenzierungsgrad der Tumoren.

##### *Ersteinnahme*

Wurden NETA-haltige kombinierte OH als erste aller jemals verwendeten OH eingenommen, war das Risiko für das Auftreten schlecht differenzierter Mammakarzinome signifikant erhöht (OR 2.43). Die Einnahme NETA-haltiger Sequenzpräparate zeigte dagegen keinen Einfluß auf den histologischen Differenzierungsgrad. Weder CMA-haltige- noch LNG-haltige OH zeigten bei Ersteinnahme einen Einfluß auf das histologische Grading.

Tabelle 2.2-4 Adjustierte Odds Ratios für die Häufigkeit des Auftretens histomorphologischer Faktoren in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten

Gestagentyp	Prognosefaktoren OR (95%KI) <sup>1</sup>			
	Tumortyp	Grading	Tumorgroße	LK-Status
<b>jemals</b>				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
CMA	ns	1.89 (1.06-3.40) <sup>2</sup>	ns	ns
LNG	ns	ns	ns	ns
NETA	ns	ns	ns	ns
NETA in SP <sup>3</sup>	ns	ns	ns	ns
<b>überwiegend</b>				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
CMA	ns	ns	ns	ns
LNG	ns	ns	ns	ns
NETA	ns	2.14 (1.20-9.80) <sup>2</sup>	ns	ns
NETA in SP <sup>3</sup>	ns	ns	ns	ns
<b>Ersteinnahme</b>				
keine OH	1.00	1.00	1.00	1.00
CMA	ns	ns	ns	ns
LNG	ns	ns	ns	ns
NETA	ns	2.43 (1.30-4.54) <sup>2</sup>	ns	ns
NETA in SP <sup>3</sup>	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Odds Ratios (OR) adjustiert nach Alter (5-Jahresgruppen), Mammabiopsien (ja/nein), Alter bei erster Lebendgeburt (<19/20-29/>29 Jahre), Anzahl der Lebendgeburten (0/1-3/≥4), Anzahl gestillter Kinder (0/1-3/≥4); Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (95%KI) nur bei Signifikanz angegeben: (0.95 - >1.00 KI) mit aufgeführt; nicht signifikant als ns abgekürzt; Referenzgruppe 'keine OH' mit OR=1

<sup>2</sup> GI+GII / GIII

<sup>3</sup> Sequenzpräparate mit Norethisteronacetat (NETA)

### 2.2.2.2. Hormonrezeptoren und Proliferationsverhalten

ER-Expression und PCNA-Proliferationsaktivität zeigten signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der OH-Einnahme, ohne Zuordnung zu einem spezifischen Gestagenbestandteil. Die PR-Expression wies dagegen keine statistisch signifikanten Veränderungen in den Häufigkeitsverteilungen auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.2-5 zusammengefasst.

#### *Einnahme jemals*

**ER:** Die OH-Einnahme zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose war unabhängig von der Einnahmedauer für alle Gestagenkomponenten mit dem Auftreten einer signifikant erhöhten Anzahl hoch ER-positiver Mammakarzinome verbunden (ORs 2.28 - 3.02).

**PR:** Die PR-Expression war nur nach der Einnahme von NETA-haltigen kombinierten OH zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose des Mammakarzinoms deutlich erhöht (OR 1.77), wobei diese Korrelation jedoch die Signifikanzgrenze knapp verfehlte.

**PCNA:** Bei Einnahme von OH zu irgendeinem Zeitpunkt war das Risiko für das Auftreten von Tumoren mit mittlerer Proliferationsaktivität nach der Einnahme CMA-haltiger OH (OR 1.97),

LNG-haltiger kombinierter OH (OR 1.82) und NETA-haltiger Sequenzpräparate (OR 1.67), nicht jedoch nach der Einnahme NETA-haltiger Kombinationspräparate, signifikant erhöht.

### *Einnahmedauer*

*ER:* Nach der Einnahme CMA-haltiger- und LNG-haltiger Kombinationspräparate zeigte sich bei überwiegender Einnahme eine signifikante Zunahme von Tumoren mit starker ER-Expression (OR 2.18; OR 3.44). Der gleiche Effekt war nach einer überwiegender Einnahme NETA-haltiger Sequenzpräparate nachweisbar (OR 4.55). NETA-haltige kombinierte OH waren dagegen bei überwiegender Einnahme ohne Einfluß auf die ER-Expression der Tumoren.

*PR:* Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen der PR-Expression und der Einnahme eines bestimmten Gestagens.

*PCNA:* Bei überwiegender Einnahme von NETA-haltigen kombinierten OH fand sich eine signifikante Risikoerhöhung für die Diagnose eines Mammakarzinoms mit mittlerer Proliferationsaktivität (OR 2.12). Für NETA-haltige Sequenzpräparate und CMA-haltige Kombinationspräparate war diese Risikoerhöhung ebenso nachweisbar (OR 3.30; OR 1.64). Das Ergebnis verfehlte jedoch die statistische Signifikanzgrenze.

### *Ersteinnahme*

*ER:* Bei Ersteinnahme hatten wiederum alle Gestagene einen deutlich positiven Effekt auf die ER-Expression. Dabei war die Ersteinnahme LNG-haltiger kombinierter OH (OR 7.60) und NETA-haltiger Sequenzpräparate (OR 5.52) mit einer signifikanten Erhöhung der Anzahl stark ER-positiver Tumoren verbunden, während der Einfluß sowohl CMA-haltiger-OH (OR 1.89) als auch NETA-haltiger kombinierter OH (OR 2.12) die Signifikanzgrenze knapp verfehlte.

*PR:* Die Häufigkeit von Tumoren mit starker PR-Expression war nur bei Ersteinnahme von LNG-haltigen OH erhöht (OR 3.19), ohne daß diese Korrelation jedoch statistische Signifikanz erreichte.

*PCNA:* Die Ersteinnahme CMA-oder NETA-haltiger OH war mit einem signifikant erhöhten Risiko für das Auftreten von Tumoren mit mittlerer PCNA-Expression verbunden (OR 1.71; OR 2.25). Die Ersteinnahme von LNG-haltigen OH und NETA-haltigen SP zeigte dagegen keinen Einfluß auf die PCNA-Expression.

Tabelle 2.2-5 Adjustierte Odds Ratios für die Häufigkeit der Expression der Estrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und der PCNA-Proliferationsfraktion in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten

Gestagentyp	Prognosefaktoren OR (95% KI) <sup>1</sup>		
	ER-Status	PR-Status	PCNA
<b>jemals</b>			
keine OH	1.00	1.00	1.00
CMA	2.78 (1.38-5.63) <sup>2</sup>	ns	1.97 (1.05-3.70) <sup>4</sup>
LNG	2.47 (1.33-4.60) <sup>2</sup>	ns	1.82 (1.07-3.10) <sup>4</sup>
NETA	3.02 (1.57-5.83) <sup>2</sup>	1.77 (0.97-3.22) <sup>3</sup>	ns
NETA in SP <sup>5</sup>	2.28 (1.24-4.18) <sup>2</sup>	ns	1.67 (1.01-2.77) <sup>4</sup>
<b>überwiegend</b>			
keine OH	1.00	1.00	1.00
CMA	2.18 (1.07-4.43) <sup>2</sup>	ns	ns
LNG	3.44 (1.49-7.91) <sup>2</sup>	ns	ns
NETA	ns	ns	2.12 (1.13-3.99) <sup>4</sup>
NETA in SP <sup>5</sup>	4.55 (1.62-12.8) <sup>2</sup>	ns	ns
<b>Ersteinnahme</b>			
keine OH	1.00	1.00	1.00
CMA	1.89 (0.98-3.65) <sup>2</sup>	ns	1.71 (1.00-2.94) <sup>4</sup>
LNG	7.60 (2.63-22.0) <sup>2</sup>	3.19 (0.95-10.7) <sup>3</sup>	ns
NETA	2.12 (0.96-4.66) <sup>2</sup>	ns	2.25 (1.12-4.53) <sup>4</sup>
NETA in SP <sup>5</sup>	5.52 (1.64-18.6) <sup>2</sup>	ns	ns

<sup>1</sup> Odds Ratios (OR) adjustiert nach Alter (5-Jahresgruppen), Mammabiopsien (ja/nein), Alter bei erster Lebendgeburt (<19/20-29/>29 Jahre), Anzahl der Lebendgeburten (0/1-3/≥4), Anzahl gestillter Kinder (0/1-3/≥4); Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (95%KI) nur bei Signifikanz angegeben (0.95 - >1.00 KI mit aufgeführt); nicht signifikant als ns abgekürzt; Referenzgruppe 'keine OH' mit OR=1

<sup>2</sup> ER ≤50%/>50%

<sup>3</sup> PR ≤50%/>50%

<sup>4</sup> PCNA <20%/≥20%

<sup>5</sup> NETA-haltige Sequenzpräparate

### 2.2.2.3. Wachstumsfaktoren und Protoonkogene

Weder die Häufigkeitsverteilung der c-erbB-2-Proteinüberexpression noch die der p53-Proteinexpression veränderte sich in Abhängigkeit von der Einnahme bestimmter Gestagenkomponenten, während die EGF-R-Expression von Tumoren nach der Einnahme verschiedener OH statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der EGF-R-Expression der Tumoren von Patientinnen ohne OH-Einnahme zeigte. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse gibt Tabelle 2.2-6.

#### *Einnahme jemals*

**EGF-R:** Bei Einnahme LNG-haltiger OH und NETA-haltiger Sequenzpräparate zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose hatten die Patientinnen ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten von EGF-R-positiven Mammakarzinomen (OR 1.68; OR 1.61). Die Einnahme NETA-haltiger kombinierter OH oder CMA-haltiger OH zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose zeigte keine Korrelation zur EGF-R-Expression.

### Einnahmedauer

*EGF-R:* Auch bei überwiegender Einnahme von CMA-haltigen OH zeigte sich eine signifikante Risikoerhöhung für das Auftreten EGF-R-positiver Mammakarzinome (OR 1.92). Andere Gestagenbestandteile hatten bei überwiegender Einnahme keinen Einfluß auf die EGF-R-Expression.

### Ersteinnahme

*EGF-R:* Bei Ersteinnahme von CMA-haltigen OH war das Risiko für die Diagnose EGF-R-positiver Tumoren signifikant erhöht (OR 1.73). Andere Gestagenbestandteile hatten keinen Einfluß auf die EGF-R-Expression.

Tabelle 2.2-6 Adjustierte Odds Ratios (OR) für die Häufigkeit der c-erbB-2-Proteinüberexpression, EGF-R-Expression und p53-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten

Gestagentyp	Prognosefaktoren OR (95% KI) <sup>1</sup>		
	c-erbB-2	EGF-R	p53
jemals			
keine OH	1.00	1.00	1.00
CMA	ns	ns	ns
LNG	ns	1.68 (1.05-2.70) <sup>2</sup>	ns
NETA	ns	ns	ns
NETA in SP <sup>3</sup>	ns	1.61 (1.02-2.54) <sup>2</sup>	ns
überwiegend			
keine OH	1.00	1.00	1.00
CMA	ns	1.92 (1.12-3.30) <sup>2</sup>	ns
LNG	ns	ns	ns
NETA	ns	ns	ns
NETA in SP <sup>3</sup>	ns	ns	ns
Ersteinnahme			
keine OH	1.00	1.00	1.00
CMA	ns	1.73 (1.07-2.81) <sup>2</sup>	ns
LNG	ns	ns	ns
NETA	ns	ns	ns
NETA in SP <sup>3</sup>	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Odds Ratios (OR) adjustiert nach Alter (5-Jahresgruppen), Mammabiopsien (ja/nein), Alter bei erster Lebendgeburt (<19/20-29/>29 Jahre), Anzahl der Lebendgeburten (0/1-3/≥4), Anzahl gestillter Kinder (0/1-3/≥4); Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle (95%KI) nur bei Signifikanz angegeben: (0.95 - >1.00 KI mit aufgeführt); nicht signifikant als ns abgekürzt; Referenzgruppe 'keine OH' mit OR=1

<sup>2</sup> EGF-R-negativ/EGF-R-positiv

<sup>3</sup> NETA-haltige Sequenzpräparate

## 2.3. Ovulationshemmer (OH) und Prognose des Mammakarzinoms

### 2.3.1. Histomorphologische und tumorbiologische Prognosefaktoren



### 2.3.1.1. Univariate Überlebensanalysen

In den univariaten Überlebensanalysen war das Gesamtüberleben signifikant mit dem histologischen Tumortyp ( $p=0.020$ ), dem histologischen Grading (0.004), dem LK-Status ( $p<0.0001$ ), der Tumorgroße ( $p=0.0005$ ) und dem PR-Status (0.009) korreliert. Die ER-Expression, die PCNA-Expression, die c-erbB-2-Proteinüberexpression, die EGF-R-Expression und die p53-Proteinexpression waren ohne signifikanten Einfluß auf das Gesamtüberleben der Patientinnen. Eine Übersicht der 10-Jahresüberlebensraten geben die Tabellen 2.3-1 und 2.3-2.

Tabelle 2.3-1 10-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit von histomorphologischen Tumorcharakteristika

Faktor	Anzahl (Ereignisse)	10-Jahres Überlebensrate (%)	p-Wert <sup>1</sup>
Histologischer Tumortyp			0.020
ductal invasiv	327 (106)	64.1	
lobulär invasiv	67 ( 33)	46.6	
andere	77 ( 23)	69.8	
Histologisches Grading			0.004
I	133 ( 32)	71.6	
II	187 ( 77)	53.9	
III	151 ( 53)	64.2	
Tumorgroße			0.0005
≤2cm	135 ( 30)	72.6	
>2cm	336 (132)	58.1	
Anzahl positiver LK			<0.0001
0	216 ( 43)	77.6	
1 - 3	111 ( 33)	66.1	
≥4	144 ( 86)	37.4	

<sup>1</sup> Univariate Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier, p-Werte aus Logrank Test

Tabelle 2.3-2 10-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit von zellulär exprimierten Tumorcharakteristika

Faktor	Anzahl (Ereignisse)	10-Jahres Überlebensrate (%)	p-Wert <sup>1</sup>
ER-Expression			0.241
<20%	132 ( 48)	61.4	
20% - 50%	251 ( 90)	59.8	
>50%	88 ( 24)	70.8	
PR-Expression			0.009
<20%	147 ( 60)	55.9	
20% - 50%	271 ( 93)	62.8	
>50%	53 ( 9)	82.6	
PCNA-Expression			0.134
<20%	124 ( 36)	66.9	
≥20%	347 (126)	60.8	
c-erbB-2-Protein			0.106
negativ	364 (120)	63.7	
positiv	99 ( 39)	58.4	
EGF-R-Expression			0.176
negativ	248 ( 79)	64.4	
positiv	210 ( 78)	60.1	
p53-Protein			0.612
negativ	325 (114)	60.1	
positiv	140 ( 45)	67.2	

<sup>1</sup> Univariate Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier, p-Werte aus Logrank Test

### 2.3.1.2. Multivariate Überlebensanalysen

Für die Gesamtgruppe aller Patientinnen mit Mammakarzinom stellten sich der histologische Tumortyp, das histologische Grading, die Tumorgröße, der LK-Status, die PR-Expression und das Alter (<50/≥50 Jahre) als signifikante unabhängige Prognosefaktoren dar (Tab. 2.3-3). Diese Faktoren wurden bei allen weiteren multivariaten Analysen als Kofaktoren berücksichtigt. In die Analyse eingegangen waren alle erfaßten histomorphologischen Faktoren, die Hormonrezeptoren, die zellulär exprimierten Faktoren (PCNA, EGF-R, c-erbB-2, p53) sowie wesentliche klinische Parameter (Alter, Menopause, Therapiemodalitäten). ER-Status, PCNA-Expression, c-erbB-2-Proteinüberexpression, EGF-R-Expression und p53-Proteinexpression blieben ohne unabhängige prognostische Bedeutung. Der Einfluß des operativen Vorgehens verfehlte knapp die Grenze zur statistischen Signifikanz. Dabei war die brusterhaltende Therapie in der Tendenz mit einer besseren Prognose verbunden als die Mastektomie (HR 0.71; 95% KI 0.50-1.02).

Tabelle 2.3-3 Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von histomorphologischen, zellulär exprimierten und klinischen Faktoren (nur signifikante Faktoren aufgeführt)

Faktor	p-Wert multivariat	Hazard Ratio (95% KI) <sup>1</sup>
Histologischer Typ (andere/lobulär invasiv)	<0.001	2.17 (1.46-3.23)
Grading (I+II / III)	0.003	1.86 (1.24-2.79)
Tumorgröße (≤2 cm/>2 cm)	0.028	1.58 (1.05-2.38)
LK-Status (negativ/positiv)	<0.001	2.63 (1.85-3.74)
PR-Status (<20%/20-50%/>50%)	0.008	0.69 (0.52-0.91)
Alter (<50 Jahre/≥50 Jahre)	0.012	1.57 (1.10-2.23)

<sup>1</sup> p-Werte und Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) aus proportionalem Hazardmodell nach Cox mit folgenden Variablen: Tumortyp, Grading, LK-Status, Tumorgröße, ER- und PR-Expression, PCNA-Expression, EGF-R-Expression, c-erbB-2-Proteinüberexpression, p53-Proteinexpression, Alter in 5-Jahresgruppen, Menopausenstatus, Operationsmodus, Chemotherapie

### 2.3.2. Die OH-Einnahme als Prognosefaktor

#### 2.3.2.1. Univariate Überlebensanalysen

Mammakarzinompatientinnen, die zu irgendeinem Zeitpunkt vor der Diagnose OH eingenommen hatten, wiesen in den univariaten Überlebensanalysen günstigere Gesamtüberlebensraten auf (p=0.083). Diese positive Korrelation erreichte nach OH- Langzeiteinnahme (>60 Monate) statistische Signifikanz (p=0.008).

#### 2.3.2.2. Multivariate Überlebensanalysen

Die oben genannten unabhängigen Prognosefaktoren bestätigten ihren Einfluß auch nach Berücksichtigung der OH-Einnahme in der Analyse. Dabei war die Langzeiteinnahme von OH (>60 Monate) verglichen mit keiner Einnahme mit einer 40%igen Reduktion des Risikos für den Tod am Mammakarzinom verbunden (HR 0.60) und erwies sich als zusätzlicher unabhängiger prognostischer Faktor für die gesamte Patientengruppe (Tabelle 2.3-4).

Tabelle 2.3-4 Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von der OH-Einnahmedauer, histomorphologischen, zellulär exprimierten und klinischen Faktoren (nur signifikante Faktoren aufgeführt)

Faktor	p-Wert multivariat	Hazard Ratio (95% KI) <sup>1</sup>
OH- Einnahme (≤60/>60 Monate)	0.015	0.60 (0.40-0.91)
Histologischer Typ (andere/lobulär invasiv)	0.001	2.16 (1.45-3.21)
Grading (I+II / III)	0.003	1.86 (1.24-2.79)
Tumorgröße (≤2cm/>2cm)	0.055	1.48 (0.99-2.22)
LK-Status (negativ/positiv)	<0.001	2.08 (1.72-2.51)
PR-Status (<20%/20%-50%/>50%)	0.011	0.70 (0.53-0.92)
Alter (<50 Jahre/≥50 Jahre)	0.056	1.44 (0.99-2.09)

<sup>1</sup> p-Werte und Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) aus proportionalem Hazardmodell nach Cox mit folgenden Variablen: OH-Einnahmedauer, Tumortyp, Grading, LK-Status, Tumorgröße, ER- und PR-Expression, PCNA-Expression, EGF-R-Expression, c-erbB-2-Proteinüberexpression, p53-Proteinexpression, Alter in 5-Jahresgruppen, Menopausenstatus, Operationsmodus, Chemotherapie

### 2.3.3. Charakteristika der OH-Einnahme als Prognosefaktoren

#### 2.3.3.1. OH-Einnahmedauer

Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den 10-Jahresüberlebensraten in Abhängigkeit von der Einnahmedauer zugunsten der OH-Langzeiteinnahme (p=0.04). Im multivariaten Ansatz bestätigte sich die Langzeiteinnahme als unabhängiger Prognosefaktor für die Gesamtgruppe. Dabei war insbesondere die OH-Einnahme über 5 bis 10 Jahre mit einer signifikanten Verbesserung der Prognose verbunden (HR 0.55). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 2.3-5 zusammengefasst.

#### 2.3.3.2. Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose

Die univariaten Gesamtüberlebensraten zeigten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose. Allerdings wiesen Patientinnen, die OH letztmalig 2 bis 5 Jahre vor der Diagnose eingenommen hatten, bessere Gesamtüberlebensraten auf als die übrigen Patientinnen. Bei Abstand der letzten Einnahme von mehr als zwei bis zu fünf Jahren zur Diagnose war die OH-Einnahme auch in der multivariaten Analyse mit einer besseren Prognose assoziiert. Diese Korrelation verfehlte die Grenze zur statistischen Signifikanz nur geringfügig (p=0.077). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 2.3-5 dargestellt.

#### 2.3.3.3. Abstand der ersten OH-Einnahme zur Diagnose

Hinsichtlich des Abstandes der ersten OH-Einnahme zur Diagnose waren die Überlebensraten für Patientinnen, die vor acht bis vierzehn Jahren erstmals OH eingenommen hatten, deutlich günstiger als die anderer Patientinnen ( $p=0.063$ ).

In den multivariaten Überlebensanalysen war der positive Einfluß der OH-Einnahme ebenfalls deutlich nachweisbar, wenn die Ersteinnahme länger als 8 Jahre vor der Diagnose stattgefunden hatte. Den stärksten Einfluß als unabhängiger Prognosefaktor erlangte die Ersteinnahme vor acht bis elf Jahren, die mit einer mehr als 50%igen Reduktion des Sterberisikos für den Tod am Mammakarzinom verbunden war (HR 0.49). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 2.3-5 dargestellt.

#### 2.3.3.4. Alter bei der ersten OH-Einnahme

Bei OH-Einnahme vor dem 20. Lebensjahr waren die univariaten Überlebensraten schlechter als die nach OH-Einnahme in einem späteren Lebensalter oder als die der Gruppe ohne OH-Einnahme. Die Differenzen erreichten bei den zugrundeliegenden sehr kleinen Zahlen jedoch keine statistische Signifikanz.

Im multivariaten Ansatz ließ sich der ungünstige Effekt einer OH-Einnahme vor dem 20. Lebensjahr nach Adjustierung für alle anderen unabhängigen Prognosefaktoren nicht mehr nachweisen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 2.3.-5. dargestellt.

#### 2.3.3.5. OH-Einnahme vor der ersten Lebendgeburt

Für Patientinnen, die vor der ersten Lebendgeburt bereits OH eingenommen hatten, zeigten die univariaten Gesamtüberlebensraten keine statistisch signifikanten Unterschiede zu denen von Patientinnen mit späterer Einnahme oder ohne OH-Einnahme.

Die OH-Einnahme vor der ersten Lebendgeburt zeigte auch im multivariaten Ansatz keinen Einfluß auf die Prognose der Erkrankung. Die Einnahme nach der ersten Lebendgeburt hatte dagegen einen deutlich positiven Effekt auf die Prognose (HR 0.71). Dieses Ergebnis verfehlte nur knapp die Grenze zur statistischen Signifikanz. Allerdings war diese Gruppe in hohem Maße identisch mit der Gesamtgruppe der Patientinnen, die OH verwendet hatten. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 2.3-5 dargestellt.

Tabelle 2.3-5: 10-Jahresüberlebensraten und Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von verschiedenen OH-Einnahmecharakteristika

Faktor	Anzahl (Ereignisse)	p-Wert <sup>1</sup> univariat	10-Jahres- Überlebensrate (%) <sup>1</sup>	p-Wert multivariat <sup>2</sup>	Hazard Ratio (95% KI) <sup>2</sup>
keine OH	174 (68)		54.4		1.00
OH-Einnahmedauer (Monate)		<b>0.040</b>			
1 - 24	63 (19)		69.7	0.509	0.84 (0.49-1.43)
25 - 60	50 (24)		52.0	0.609	1.14 (0.69-1.90)
61 - 120	92 (24)		73.2	<b>0.015</b>	<b>0.55 (0.34-0.90)</b>
≥121	92 (27)		70.1	0.088	0.66 (0.41-1.07)
Abstand letzter Einnahme zur Diagnose (Monate)		0.435			
≤1	92 (31)		65.8	0.140	0.70 (0.44-1.12)
2 - 24	53 (19)		63.5	0.607	0.86 (0.50-1.50)
25 - 60	61 (15)		73.9	<b>0.077</b>	<b>0.59 (0.33-1.06)</b>
61 - 120	56 (18)		67.8	0.503	0.83 (0.48-1.43)
≥121	35 (11)		68.4	0.786	0.91 (0.47-1.76)
Abstand erster Einnahme zur Diagnose (Monate)		<b>0.051</b>			
1 - 96	50 (21)		58.0	0.821	0.94 (0.57-1.57)
97 - 132	57 (12)		78.9	<b>0.018</b>	<b>0.49 (0.26-0.92)</b>
133 - 168	84 (24)		70.6	<b>0.079</b>	<b>0.66 (0.40-1.06)</b>
≥169	104 (35)		66.1	0.480	0.86 (0.55-1.33)
Alter bei der ersten OH-Einnahme (Jahre)		0.409			
≤19	7 ( 3)		57.1	0.439	1.61 (0.48-5.41)
20 - 29	106 (33)		68.2	0.134	0.69 (0.42-1.12)
30 - 39	145 (44)		69.2	<b>0.083</b>	<b>0.70 (0.47-1.05)</b>
≥40	39 (14)		63.8	0.933	1.03 (0.55-1.94)
Einnahme vor der ersten Lebendgeburt		0.346			
Ja	12 ( 4)		66.7	0.612	0.76 (0.26-2.20)
Nein	262 (82)		68.2	<b>0.052</b>	<b>0.71 (0.50-1.00)</b>
OH ohne Lebendgeburt	23 ( 8)		65.2	0.966	0.98 (0.45-2.14)

<sup>1</sup> Kaplan-Meier Überlebensanalysen, zugehörige p-Werte (Logrank-Test) vergleichen jeweils die Überlebenskurven aller zu den einzelnen Faktoren gehörigen Untergruppen

<sup>2</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox: HR für den Tod am Mammakarzinom verglichen mit der Referenzgruppe 'keine OH-Einnahme' (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumgröße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und OH-Einnahmedauer

### 2.3.4. Zeitraum der Einnahme von Ovulationshemmern (OH) und Prognose

#### 2.3.4.1. OH-Einnahme in definierten Zeitintervallen

Zur besseren Darstellung des zeitlichen Bezugs der OH-Einnahme zur Erkrankung wurden Untergruppen gebildet, die durch definierte Korrelationen zwischen dem Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose und der Dauer der Einnahme charakterisiert waren. In diesen Analysen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Risikos für den Tod am Mammakarzinom nach OH-Langzeiteinnahme bis unmittelbar zum Diagnosezeitpunkt (HRs 0.38 bis 0.58). Eine Risikoreduktion fand sich jedoch auch nach OH-Kurzzeiteinnahme bis zu einer Dauer von fünf Jahren, sofern die Einnahme spätestens im dritten Jahr vor der Diagnose des Mammakarzinoms beendet wurde (HRs 0.28 bis 0.45). Für einige dieser Gruppen verfehlten die Ergebnisse bei kleiner Fallzahl knapp die statistische Signifikanzgrenze.

Das gemeinsame Charakteristikum der Patientinnen nach Langzeiteinnahme und der nach Kurzzeiteinnahme bestand darin, daß alle betroffenen Patientinnen irgendwann zwischen dem fünften und zehnten Jahr vor der Karzinomdiagnose OH eingenommen hatten. Dabei wiesen Patientinnen nach OH-Einnahme gegenüber denen ohne OH-Einnahme eine bis zu 70%ige Reduktion des Sterberisikos für den Tod am Mammakarzinom auf (Tabelle 2.3-6). Im Gegensatz hierzu war eine Einnahmedauer von weniger als fünf Jahren, die bis zum zweiten Jahr vor der Diagnose oder aber bis zum Diagnosezeitpunkt fortgeführt wurde, mit einer signifikanten Erhöhung des Risikos für den Tod am Mammakarzinom verbunden (HRs 2.06 bis 3.80).

Tabelle 2.3-6: Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von definierten Zeitintervallen, charakterisiert durch Einnahmedauer und Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose

Dauer der Einnahme	Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose				
	0-1 Monat	2-24 Monate	25-60 Monate	61-120 Monate	≥121 Monate
1-24 Monate	HR=2.060 (0.735-5.80) p=0.169 n=7	HR=0.87 (0.206-3.68) p=0.85 n=6	HR=2.18 (0.717-6.65) p=0.169 n=7	HR=0.285 (0.069-1.17) p=0.082 n=16	HR=0.764 (0.342-1.70) p=0.510 n=27
25-60 Monate	HR=2.290 (1.02-5.17) p=0.046 n=8	HR=3.80 (1.45-9.97) p=0.007 n=7	HR=0.45 (0.158-1.29) p=0.136 n=16	HR=1.06 (0.441-2.56) p=0.892 n=14	HR=0.907 (0.216-3.81) p=0.894 n=5
61-120 Monate	HR=0.379 (0.165-0.872) p=0.022 n=32	HR=0.425 (0.151-1.19) p=0.104 n=17	HR=0.654 (0.26-1.64) p=0.366 n=22	HR=0.806 (0.345-1.89) p=0.619 n=18	HR=2.43 (0.507-11.65) p=0.267 n=3
>120 Monate	HR=0.578 (0.306-1.09) p=0.091 n=45	HR=0.948 (0.437-2.06) p=0.892 n=23	HR=0.290 (0.070-1.19) p=0.086 n=16	HR=1.786 (0.635-5.02) p=0.272 n=8	n=0

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox: HR für den Tod am Mammakarzinom verglichen mit der Referenzgruppe 'keine OH-Einnahme' (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumorgroße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und der OH-Einnahmedauer

### 2.3.4.2. OH-Einnahme in definierten Jahren vor der Diagnose

Nach den vorangegangenen Analysen war die Prognose der Patientinnen deutlich günstiger, wenn die OH-Einnahme zu irgendeinem Zeitpunkt zwischen dem 5. und 10. Jahr vor der Diagnose des Mammakarzinoms erfolgt war.

Daher wurde eine detaillierte Untersuchung der Wirkung der OH-Einnahme im jeweils n-ten Jahr vor der Diagnose des Mammakarzinoms durchgeführt. Die Gesamtdauer der OH-Einnahme wurde dabei nicht berücksichtigt.

In dieser Analyse war die OH-Einnahme zwischen dem dritten und zehnten Jahr vor der Diagnose mit einer signifikanten Reduktion des Sterberisikos verbunden. Die OH-Einnahme im 8. Jahr vor der Diagnose war mit einer etwa 50%igen Reduktion des Sterberisikos gegenüber der Gruppe ohne OH-Einnahme am deutlichsten.

Bei Betrachtung sich überlappender, mehrjähriger Zeitintervalle zeigte sich eine signifikante Risikoreduktion für den Tod am Mammakarzinom, wenn die OH-Einnahme zu irgendeinem Zeitpunkt in den Jahren drei bis neun vor der Diagnose erfolgt war. Der Effekt verstärkte sich für diese Gruppen bei längerer Einnahmedauer. Die stärkste Reduktion des Sterberisikos wiesen Patientinnen auf, die OH kontinuierlich vom 5. bis einschließlich 8. Jahr vor der Diagnose eingenommen hatten ( Tab. 2.3-7).

Tabelle 2.3-7: Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von definierten Zeitintervallen für die OH-Einnahme vor der Diagnose

Einnahme OH im				n	p-Wert	HR <sup>1</sup> (95% KI)			
n-ten Jahr vor der Diagnose									
3	4	5	6	121	0.017	0.57 (0.36-0.90)			
3	4	5	6	7	117	0.011	0.55 (0.35-0.87)		
	4	5	6	7	137	0.006	0.54 (0.34-0.84)		
	4	5	6	7	8	129	0.002	0.47 (0.30-0.75)	
		5	6	7	8	145	<0.001	0.44 (0.28-0.70)	
		5	6	7	8	9	129	0.001	0.46 (0.29-0.74)
			6	7	8	161	0.002	0.50 (0.33-0.77)	
			6	7	174	0.006	0.57 (0.38-0.85)		
			7	8	181	0.004	0.55 (0.36-0.82)		
			7	8	9	162	0.010	0.57 (0.38-0.88)	
			8	9	171	0.015	0.60 (0.40-0.90)		

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox verglichen mit der Referenzgruppe 'keine OH-Einnahme' (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumorgroße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und der OH-Einnahmedauer

Dieser prognostische Einfluß der OH-Einnahme setzte sich gegenüber dem der histomorphologischen und hormonell-reproduktiven Faktoren durch (Tab. 2.3-8).



Tabelle 2.3-8: Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von der OH-Einnahmedauer<sup>1</sup> oder der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose<sup>2</sup>, hormonell-reproduktiven- und histomorphologischen Faktoren

Faktor	p-Wert	HR (95% KI) <sup>1</sup>	p-Wert	HR (95% KI) <sup>2</sup>
OH Einnahmedauer (keine OH/>60 Monate)	0.0554	0.66 (0.44-1.01)		
OH Einnahmezeitraum (andere/5.-8. Jahr)			0.0002	0.46 (0.31-0.70)
Alter bei 1.gestilltem Kind (nie/≤19/20-29/>29 Jahre)	0.0020	0.55 (0.38-0.80)	0.0029	0.57 (0.39-0.82)
Anzahl gestillter Kinder (nie gestillt/1-3/≥4)	0.0182	2.14 (1.14-4.02)	0.0260	2.01 (1.09-3.73)
Histologischer Typ (andere/lobulär invasiv)	0.0001	2.25 (1.50-3.38)	<0.0001	2.35 (1.56-3.55)
Grading (I+II / III)	0.0009	1.99 (1.33-2.99)	0.0008	2.00 (1.33-3.01)
LK-Status (negativ/positiv)	<0.0001	2.21 (1.70-2.87)	<0.0001	2.19 (1.68-2.86)
PR-Status (<20%/20%-50%/>50%)	0.0070	0.68 (0.51-0.90)	0.0077	0.68 (0.51-0.90)
Alter (<50/≥50 Jahre)	0.0340	1.49 (1.03-2.15)	0.0137	1.62 (1.10-2.37)
Tumorgroße (≤2 cm/>2cm)	0.1590	1.35 (0.89-2.06)	0.1880	1.32 (0.87-2.02)

1 Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox unter Einbeziehung der OH-Einnahmedauer und aller in der Tabelle aufgeführten Faktoren, adjustiert nach Anzahl der Lebendgeburten, Alter bei 1. Lebendgeburt, Operationsmodus, Chemotherapie

2 Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox unter Einbeziehung des OH-Einnahmezeitraumes (5.-8. Jahr vor Diagnose) und aller in der Tabelle aufgeführten Faktoren, adjustiert nach Anzahl der Lebendgeburten, Alter bei 1. Lebendgeburt, Operationsmodus, Chemotherapie

### 2.3.5. Gestagenkomponenten und Prognose

Die verwendeten Kombinations- und Sequenzpräparate enthielten entweder CMA, LNG oder NETA als Gestagenderivat. Lediglich ein Depotpräparat, das jedoch von nur 2 Patientinnen verwendet wurde, unterschied sich von dieser Zusammensetzung. Von allen Präparaten war nur die Einnahme NETA-haltiger kombinierter OH mit einer besseren Prognose für die betroffenen Patientinnen verbunden (Tab. 2.3-9)

### 2.3.5.1. Univariate Überlebensanalysen

In den univariaten Überlebensanalysen waren die 10-Jahresüberlebensraten nach Ersteinnahme ( $p=0.001$ ), nach überwiegender Einnahme ( $p=0.018$ ) und bei ausschließlicher Einnahme ( $p=0.018$ ) eines NETA-haltigen Einphasenpräparates signifikant besser als die von Patientinnen ohne OH-Einnahme oder nach Einnahme anderer OH.

Auch die Einnahme NETA-haltiger kombinierter OH zu einem beliebigen Zeitpunkt, unabhängig von der Einnahme anderer OH zu einem anderen Zeitpunkt, war im Vergleich zur Nichteinnahme mit einem signifikant besseren Überleben verbunden ( $p=0.012$ ). Ein positiver Effekt im Vergleich zur Nichteinnahme zeigte sich auch nach der überwiegenden Einnahme aller anderen OH, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erlangen (Tab. 2.3-9).

### 2.3.5.2. Multivariate Überlebensanalysen

Die Einnahme von NETA-haltigen OH war mit einer signifikanten Verbesserung der 10-Jahresüberlebensraten verbunden. Dieser Effekt bestätigte sich auch im multivariaten Ansatz. Dabei war insbesondere bei Ersteinnahme als auch bei überwiegender Einnahme von NETA-haltigen Kombinationspräparaten das Risiko, am Mammakarzinom zu sterben, um 62% bzw 55% geringer als ohne OH-Einnahme (HR 0.38; HR 0.45).

Die Einnahme CMA-oder LNG-haltiger Präparate hatte keine Bedeutung für die Prognose der Patientinnen. Auch nach der Einnahme NETA-haltiger Sequenzpräparate fanden sich auf der Grundlage sehr kleiner Zahlen keine statistisch signifikanten Differenzen gegenüber den Sterberisiken der Gruppe ohne OH-Einnahme (Tab. 2.3-9).

Tabelle 2.3-9: 10-Jahresüberlebensraten und Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten

Gestagenkomponente	Anzahl (Ereignisse)	p-Wert univariat <sup>1</sup>	10-Jahresüberlebensrate (%) <sup>1</sup>	p-Wert multivariat <sup>2</sup>	HR (95% KI) <sup>2</sup>
<b>Ersteinnahme</b>		<b>0.0001</b>			
keine OH	174 (68)		54.4		1.00
CMA	171 (58)		65.5	0.370	0.84 (0.57-1.24)
LNG	24 (14)		41.7	0.105	1.75 (0.92-3.34)
NETA	83 (13)		84.3	<b>0.002</b>	<b>0.38 (0.20-0.73)</b>
NETA (SP)	15 ( 7)		53.3	0.631	0.80 (0.31-2.07)
unbekannt	4				
<b>überwiegend</b>		<b>0.018</b>			
niemals	174 (68)		54.4		1.00
<b>OH</b>					
CMA	100 (39)		60.7	0.867	1.04 (0.68-1.58)
LNG	57 (22)		61.4	0.948	1.02 (0.61-1.71)
NETA	116 (26)		76.9	<b>0.001</b>	<b>0.45 (0.27-0.73)</b>
NETA (SP)	22 ( 6)		72.7	0.248	0.62 (0.26-1.47)
unbekannt	2				
<b>jemals</b>					
keine OH	174 (68)		54.4		1.00
CMA	189 (62)	0.189	66.6	0.179	0.78 (0.54-1.12)
LNG	126 (40)	0.205	68.2	0.183	0.74 (0.48-1.51)
NETA	182 (49)	<b>0.012</b>	72.6	<b>0.018</b>	<b>0.62 (0.41-0.92)</b>
NETA (SP)	60 (19)	0.254	68.3	0.323	0.76 (0.44-1.31)
<b>ausschließlich</b>		<b>0.018</b>			
keine OH	174 (68)		54.4		1.00
CMA	53 (20)		62.0	0.988	0.10 (0.59-1.67)
LNG	19 (11)		42.1	0.149	1.67 (0.83-3.33)
NETA	34 ( 5)		85.1	<b>0.011</b>	<b>0.30 (0.12-0.76)</b>
NETA (SP)	8 ( 3)		62.5	0.869	1.11 (0.33-3.74)

<sup>1</sup> Kaplan-Meier Überlebensanalysen, zugehörige p-Werte (Logrank-Test) vergleichen jeweils die Überlebenskurven aller zu den einzelnen Faktoren gehörigen Untergruppen

<sup>2</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox: HR für den Tod am Mammakarzinom verglichen mit der Referenzgruppe 'keine OH-Einnahme' (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumorgroße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und OH-Einnahmedauer

### 2.3.6. *Epidemiologische Risikofaktoren und Prognose*

Alle erfaßten epidemiologischen Risikofaktoren mit potentielltem Einfluß auf hormonelle Veränderungen des Mammagewebes und andere für die Erkrankung und den Erkrankungsverlauf bedeutende Faktoren wurden in die Analyse einbezogen. Dabei wurden Menarche, Schwangerschaft, Stillverhalten, Menopause, vorangegangene Mammabiopsien, familiäre Belastung, sozialer Status und Vorsorge-Verhalten jeweils in separaten multivariaten Ansätzen geprüft.

#### 2.3.6.1. Hormonell-reproduktive Faktoren

##### *Schwangerschaft und Stillen*

###### *Alter bei erster Lebendgeburt*

Patientinnen, die bei der ersten Lebendgeburt zwischen 20 und 29 Jahren alt waren, hatten gegenüber anderen Patientinnen signifikant höhere 10-Jahresüberlebensraten ( $p=0.005$ ). Im multivariaten Ansatz war für diese Gruppe eine signifikante Reduktion des Sterberisikos (HR 0.50) gegenüber der Gruppe ohne Lebendgeburt nachweisbar (Tab. 2.3-10).

###### *Anzahl der Lebendgeburten*

Patientinnen mit 4 und mehr Lebendgeburten hatten signifikant schlechtere Gesamtüberlebensraten als solche mit weniger oder ohne Lebendgeburten ( $p=0.017$ ). In der multivariaten Analyse zeigte sich für diese Gruppe nahezu eine Verdopplung des Sterberisikos im Vergleich zu der ohne Lebendgeburten (HR 1.92). Die Prognose von Patientinnen mit bis zu 3 Lebendgeburten wies dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der von Frauen ohne Lebendgeburten auf (Tab. 2.3-10).

###### *Alter beim Stillen des 1. Kindes*

Patientinnen, die beim Stillen des ersten Kindes 20 Jahre und älter waren, zeigten in der univariaten Überlebensanalyse signifikant bessere Überlebensraten als jüngere Patientinnen oder jene, die nie gestillt hatten (0.009). In den multivariaten Analysen hatten Frauen, die beim erstmaligen Stillen zwischen 20 und 29 Jahren alt waren, ein signifikant reduziertes Sterberisiko (HR 0.48) im Vergleich zu denen, die nie gestillt hatten (Tab. 2.3.-10).

###### *Anzahl gestillter Kinder*

Patientinnen, die vier und mehr Kinder gestillt hatten, wiesen verglichen mit denen, die niemals oder weniger gestillt hatten, signifikant schlechtere 10-Jahresüberlebensraten auf ( $p=0.0001$ ). Das Stillen von bis zu drei Kindern erwies sich dagegen als eher protektiv. Dieser günstige Effekt bestätigte sich in den multivariaten Analysen und äußerte sich in einer etwa 30%igen Reduktion des Sterberisikos für Patientinnen, die bis zu drei Kinder gestillt hatten (HR 0.69). In der multivariaten Analyse überwog allerdings der ungünstige Effekt des Stillens von 4 und mehr Kindern deutlich gegenüber der protektiven Wirkung des Stillens von bis zu drei Kindern (Tab. 2.3-10). Dabei war das Stillen von 4 und mehr Kindern mit einer 3fachen Erhöhung des Sterberisikos verbunden (HR 2.88).

Tabelle 2.3-10: 10-Jahresüberlebensraten und Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von hormonell-reproduktiven Faktoren

Faktor	Anzahl (Ereignisse)	p-Wert <sup>1</sup> univariat	10-Jahres-Überlebensrate (%) <sup>1</sup>	p-Wert <sup>2</sup> multivariat	HR (95% KI) <sup>2</sup>
<b>Alter bei 1. Lebendgeburt</b>					
keine	62 ( 23)	<b>0.005</b>	61.8		1.00
≤19	82 ( 40)		45.6	0.517	1.19 (0.71-3.06)
20 - 29	293 ( 86)		67.6	<b>0.0004</b>	<b>0.50 (0.34-0.73)</b>
>29	34 ( 13)		61.8	0.112	1.65 (0.89-3.06)
<b>Anzahl der Lebendgeburten</b>					
keine	62 ( 23)	<b>0.017</b>	61.8		1.00
1 - 3	373 (120)		63.9	0.204	0.70 (0.40-1.22)
≥4	36 ( 19)		47.2	<b>0.014</b>	<b>1.92 (1.14-3.24)</b>
<b>Alter beim Stillen des 1. Kindes</b>					
nie gestillt	112 ( 44)	<b>0.009</b>	56.1		1.00
≤19	73 ( 35)		46.5	0.244	1.31 (0.83-2.07)
20 - 29	264 ( 77)		68.8	<b>0.0005</b>	<b>0.48 (0.32-0.72)</b>
>29	22 ( 6)		72.7	0.940	1.03 (0.44-2.44)
<b>Anzahl gestillter Kinder</b>					
nie gestillt	112 ( 44)	<b>0.0001</b>	56.1		1.00
1 - 3	333 (101)		66.7	<b>0.044</b>	<b>0.69 (0.48-0.99)</b>
≥4	26 ( 17)		34.2	<b>0.0001</b>	<b>2.88 (1.70-4.89)</b>

<sup>1</sup> Kaplan-Meier Überlebensanalysen, zugehörige p-Werte (Logrank-Test) vergleichen die Überlebenskurven aller zu den einzelnen Faktoren aufgeführten Untergruppen

<sup>2</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox: Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom verglichen mit der Referenzgruppe 'keine OH-Einnahme' (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumorgröße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und der OH-Einnahmedauer

### *Menarche und Menopause*

Das Alter bei Menarche und der Menopausenstatus hatten keinen Einfluß auf das Überleben der Patientinnen. Bei einem Durchschnittsalter der untersuchten Frauen von 45 Jahren waren lediglich 22 der postmenopausalen Patientinnen 50 Jahre und älter. Diese Altersgruppe hatte eine etwas schlechtere Prognose als die anderen Patientinnen. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (Tab. 2.3.-11).

#### 2.3.6.2. Familiäre Belastung und benigne Mammaveränderungen

In der Anamnese angegebene Mammabiopsien oder Probeentnahmen wegen benignen Veränderungen des Mammagewebes waren sowohl uni-als auch multivariat ohne Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms.

Eine positive Familienanamnese mit Mammakarzinomkrankungen bei Verwandten I. oder II. Grades war ebenfalls ohne Bedeutung für das Gesamtüberleben der Patientinnen (Tab. 2.3.-11).

Tabelle 2.3-11: 10-Jahresüberlebensraten und Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von epidemiologischen Risikofaktoren

Faktor	Anzahl (Ereignisse)	p-Wert uni-variater <sup>1</sup>	10-Jahres Überlebensrate (%) <sup>1</sup>	p-Wert multivariat <sup>2</sup>	HR (95% KI) <sup>2</sup>
Menarchealter		0.164			
<13	104 ( 40)		55.0	ns	1.00 (0.66-1.52)
13-14	232 ( 69)		68.4		1.00
>14	135 ( 53)		57.6		1.34 (0.92-1.96)
Menopause		ns			
nein	373 (128)		62.2	ns	1.00
ja	98 ( 34)		64.2		0.89 (0.59-1.36)
Mammakarzinom FA I.Grad		ns			
nein	419 (142)		64.5		1.00
ja	29 ( 8)		56.9	ns	0.73 (0.34-1.55)
Mammakarzinom FA II. Grad		ns			
nein	346 (108)		66.2		1.00
ja	17 ( 4)		76.5	ns	0.81 (0.29-2.28)
Mammabiopsien		ns			
nein	412 (144)		61.6		1.00
ja	59 ( 18)		69.0	ns	1.11 (0.61-2.02)

<sup>1</sup> Kaplan-Meier Überlebensanalysen, zugehörige p-Werte (Logrank-Test) vergleichen die Überlebenskurven aller zu den einzelnen Faktoren aufgeführten Untergruppen

<sup>2</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox: HR für den Tod am Mammakarzinom verglichen mit der Referenzgruppe (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumorgroße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und der OH-Einnahmedauer

### 2.3.6.3. Sozioökonomische Faktoren

#### *Ausbildungsjahre*

Die univariaten 10-Jahresüberlebensraten zeigten keine statistisch signifikanten Differenzen in Abhängigkeit von der Anzahl der schulischen/universitären Ausbildungsjahre der Patientinnen. Dagegen hatten Patientinnen, deren Partner mehr als 10 Ausbildungsjahre absolviert hatten, ein deutlich besseres Gesamtüberleben als andere ( $p=0.063$ ).

Dieses Ergebnis bestätigte sich multivariat mit einer statistisch signifikanten Reduktion des Sterberisikos für Patientinnen, deren Partner 11 bis 15 Ausbildungsjahre absolviert hatten (HR 0.42), gegenüber denen, deren Partner bis zu 8 Ausbildungsjahren beendet hatten. Für Patientinnen, deren Partner längere Ausbildungszeiten nachweisen konnten, war der Unterschied nicht mehr statistisch signifikant. (Tab. 2.3-12).

#### *Ärztliche Betreuung und Vorsorge*

Die jährliche Anzahl der zytologischen Zervixabstriche wurde als Kriterium für die Häufigkeit ärztlicher Vorsorgeuntersuchungen herangezogen. In den univariaten Überlebensanalysen hatten Patientinnen ohne zytologische Abstriche deutlich niedrigere- und solche mit mehr als einem Abstrich pro Jahr etwas höhere Überlebensraten als Patientinnen mit einer geringeren

Anzahl zytologischer Vorsorgeuntersuchungen. Diese Differenzen waren jedoch in den multivariaten Analysen nach Adjustierung für etablierte Prognosefaktoren und Alter nicht mehr nachweisbar (Tab. 2.3-12).

Tabelle 2.3-12: 10-Jahresüberlebensraten und Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von sozioökonomischen Faktoren

Faktor	Anzahl (Ereignisse)	p-Wert univariat <sup>1</sup>	10-Jahres Überlebensrate (%) <sup>1</sup>	p-Wert multivariat <sup>2</sup>	HR (95% KI) <sup>2</sup>
Zervixscreening (Anzahl)		<b>0.048</b>			
keine Pap-Abstriche	24 ( 11)		29.2		1.00
≥1 pro Jahr	278 ( 82)		69.6	ns	0.96 (0.47-1.96)
1x zweijährlich	76 ( 29)		55.6	ns	1.41 (0.63-3.17)
weniger	93 ( 40)		54.1	ns	0.97 (0.46-2.02)
Ausbildungsjahre		ns			
≤8	263 (102)		57.7		1.00
9 - 10	75 ( 23)		63.6	ns	0.76 (0.48-1.20)
11 -15	86 ( 25)		70.9	ns	1.02 (0.64-1.63)
≥16	47 ( 12)		74.3	ns	0.74 (0.40-1.37)
Ausbildungsjahre Partner		<b>0.010</b>			
≤8	234 ( 93)		54.8		1.00
9 - 10	59 ( 25)		56.2	ns	1.20 (0.76-1.90)
11 -15	53 ( 9)		83.0	<b>0.014</b>	0.42 (0.21-0.83)
≥16	94 ( 27)		71.2	ns	0.93 (0.59-1.46)
nie verheiratet	31 ( 8)		74.2	ns	0.70 (0.33-1.47)

<sup>1</sup> Kaplan-Meier Überlebensanalysen, zugehörige p-Werte (Logrank-Test) vergleichen die Überlebenskurven aller zu den einzelnen Faktoren aufgeführten Untergruppen

<sup>2</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox: HR für den Tod am Mammakarzinom verglichen mit der Referenzgruppe (HR=1.0) adjustiert nach Tumortyp, Grading, Tumorgröße, LK-Status, PR-Expression, Alter (<50/≥50) und der OH-Einnahmedauer

### 2.3.7. Prognostische Wertigkeit hormoneller Faktoren

#### 2.3.7.1. Hormonell-reproduktive Faktoren und Zeitraum der OH-Einnahme

Wurden das Alter bei der ersten Lebendgeburt, die Anzahl der Lebendgeburten und respektive Angaben zum Stillen gemeinsam analysiert, erwiesen sich das Alter beim Stillen des ersten Kindes und die Anzahl der gestillten Kinder als unabhängige Prognosefaktoren im multivariaten Ansatz (Tab. 2.3-13).

Tabelle 2.3-13: Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von hormonell-reproduktiven Faktoren, der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose und histomorphologischen Prognosefaktoren

Faktor	p-Wert	HR (95% KI) <sup>1</sup>
Alter 1.Stillen (Jahre) (nie/≤19/20-29/≥30)	0.003	0.568 (0.391-0.824)
Anzahl der gestillten Kinder (keine/≤3/≥4)	0.026	2.014 (1.088-3.730)
OH 5.-8. Jahr (andere Zeiten/5.-8. Jahr)	0.0002	0.465 (0.311-0.695)
Histologischer Tumortyp (andere/lobulär invasiv)	<0.0001	2.351 (1.556-3.552)
Grading (I+II / III)	0.0008	2.004 (0.333-3.014)
LK-Status (negativ/positiv)	<0.0001	2.191 (1.675-2.865)
PR-Expression (<20%/20%-50%/>50%)	0.008	0.681 (0.513-0.903)
Alter (<50/≥50 Jahre)	0.014	1.618 (1.104-2.371)

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox (nur statistisch signifikante Faktoren gelistet) zusätzlich adjustiert nach Anzahl der Lebendgeburten (keine, 1-2, 3-4, >4), Alter bei 1. Lebendgeburt (keine, ≤19, 20-29, ≥30 Jahre), Tumorgroße, Operationsmodus, Chemotherapie

Die OH-Einnahme im 5. bis 8. Jahr vor der Diagnose erlangte jedoch eine größere prognostische Bedeutung als die erfaßten Reproduktionsvariablen. Sowohl exogene als auch endogene hormonelle Einflüsse waren damit von unabhängiger Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms. In der Gesamtanalyse war die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose nach dem LK-Status und dem histologischen Tumortyp stärkster unabhängiger Prognosefaktor (Tab. 2.3-13)

### 2.3.7.2. Gestagenkomponenten und Zeitraum der OH-Einnahme

NETA-haltige kombinierte OH hatten unabhängig vom Einnahmezeitpunkt oder der Einnahmedauer einen signifikanten Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms. Damit erwies sich die Einnahme NETA-haltiger OH als unabhängiger Prognosefaktor neben den etablierten histomorphologischen Faktoren. Die Ersteinnahme NETA-haltiger Kombinationspräparate war im Vergleich zur Nichteinnahme mit einer etwa 60%igen Reduktion der Sterberisiken für Mammakarzinompatientinnen verbunden (HR 0.38). Sowohl die Einnahme NETA-haltiger OH als auch die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose waren einzeln betrachtet mit einer signifikanten 60%-65%igen Reduktion des Risikos, am Mammakarzinom zu sterben (HR 0.30 - 0.45; HR 0.44), verbunden (Tab. 2.3-7, 2.3-9). Bei Analyse dieser Faktoren im gleichen Ansatz bewirkten beide eine etwa 65%ige Reduktion des Risikos, am Mammakarzinom zu sterben (HR 0.37; HR 0.34). Die Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose erwies sich jedoch als der stärkere prognostische Faktor (Tab. 2.3-14).



Tabelle 2.3-14: Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose, der überwiegenden Einnahme NETA-haltiger OH und histomorphologischen Prognosefaktoren

Faktor (n=297)	p-Wert multivariat	HR (95% KI) <sup>1</sup>
OH im 5.-8. Jahr vor Diagnose (andere Zeit/5.-8. Jahr)	<0.001	0.37 (0.21-0.66)
NETA-haltige OH (andere OH/NETA-OH)	0.002	0.34 (0.17-0.67)
WW (OH-Typ · Zeitraum) <sup>2</sup>	0.064	2.51 (0.95-6.65)
Tumortyp (andere/ lobulär invasiv)	<0.001	2.73 (1.62-4.83)
Grading (I+II / III)	0.007	2.22 (1.24-3.98)
LK-Status (negativ/positiv)	<0.0001	2.37 (1.68-3.35)
PR-Status (<20%/20%-50%/>50%)	0.053	0.68 (0.46-1.01)

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox (nur statistisch signifikante Faktoren aufgeführt) zusätzlich adjustiert nach Tumorgroße, Alter (<50/≥50 Jahre), Anzahl gestillter Lebendgeburten, Operationsmodus und Chemotherapie

<sup>2</sup> Wechselwirkungsfaktor zwischen OH-Typ und dessen Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose

Ein Wechselwirkungsfaktor zur Analyse des Zusammenhangs zwischen beiden Faktoren verfehlte knapp die Grenze zur statistischen Signifikanz, so daß eine gewisse Überlappung der Effekte beider Gruppen in Bezug auf die Prognose des Mammakarzinoms nicht ausgeschlossen werden kann. Von den 145 Frauen, die im 5.-8. Jahr vor der Diagnose OH eingenommen hatten, gaben 66 (45.5%) an, in ihrem Leben überwiegend NETA-haltige OH verwendet zu haben. Die übrigen 54.5% verteilten sich etwa gleichmäßig auf die übrigen Präparate (CMA 21.4%, LNG 22.1%, NETA-SP 11.0%).

Bei der Analyse der Einnahmehäufigkeit NETA-haltiger OH im 5.-8. Jahr vor der Diagnose zeigte es sich, daß der Anteil von NETA-haltigen OH an den anderen Präparaten in diesem Zeitraum signifikant höher war, als für alle anderen Einnahmezeiten ( $p < 0.01$ ).

## 2.4. Prognosefaktoren im Follow-up

Mit der Zunahme der Länge des Follow-up ändert sich die Wertigkeit prognostischer Faktoren. Daher wurde die Bedeutung der erfaßten Prognosefaktoren in jährlichen Abständen jeweils für das n-te Jahr nach der Diagnose des Mammakarzinoms erfaßt.

Für aufeinanderfolgende Jahre wurden jeweils alle Patientinnen, die im vorherigen Jahr nicht am Mammakarzinom verstorben waren und die für das gesamte laufende Jahr nachbeobachtet werden konnten, als neue Studiengruppe aufgefaßt. Für diese Untergruppen wurden unabhängige multivariate Überlebensanalysen durchgeführt. Der Zeitraum erstreckte sich über maximal 10 Jahre. Da die Gruppengröße mit fortschreitendem Follow-up abnahm, war für einige Prognosefaktoren wegen kleiner Fallzahlen nach langjährigem Follow-up keine konsistente Schätzung mehr möglich.

### 2.4.1. *Histomorphologische Faktoren*

Der LK-Befall war der einzige unabhängige Prognosefaktor, dessen Bedeutung sich bis zum 10. Jahr nach Diagnose nicht veränderte (Tab. 2.4-1). Der LK-Status war jeweils auch der stärkste prognostische Faktor gefolgt vom histologischen Tumortyp und vom histologischen Grading. Der histologische Tumortyp behielt seine prognostische Aussage bis zum 7. Jahr nach der Diagnose, während das histologische Grading schon im 4. Jahr keinen signifikanten Einfluß mehr zeigte. Tumorgöße und PR-Status waren nur in den ersten zwei Jahren von untergeordneter Wertigkeit für die Prognose der Erkrankung.

Tabelle 2.4-1: Zeitabhängige Entwicklung der Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von histomorphologischen und zellulär exprimierten Faktoren im Follow-up

Prognosefaktoren					
Jahre nach Diagnose	Tumortyp andere/LCI HR (95%KI) <sup>1</sup> p-Wert <sup>2</sup>	Grading I und II/III HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	TumorgroÙe ≤2cm/>2cm HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	LK-Status (-)/(+) HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	PR (%) <20%/20- 50/>50% HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>
1 (n=471)	2.130 (1.43-3.17) p=0.0002	1.912 (1.28-2.86) p=0.002	1.519 (1.02-2.27) p=0.042	2.058 (1.70-2.49) p<0.0001	0.725 (0.55-0.95) p=0.021
2 (n=462)	2.044 (1.35-3.09) p=0.0007	1.783 (1.19-2.68) p=0.005	1.441 (0.96-2.16) p=0.078	2.050 (1.69-2.49) p<0.0001	0.743 (0.56-0.98) p=0.037
3 (n=435)	2.087 (1.33-3.29) p=0.002	1.625 (1.05-2.51) p=0.028	1.363 (0.88-2.10) p=0.162	1.906 (1.54-2.36) p<0.0001	0.773 (0.57-1.05) p=0.098
4 (n=409)	2.273 (1.38-3.75) p=0.001	1.450 (0.91-2.32) p=0.121	1.465 (0.90-2.39) p=0.127	1.886 (1.49-2.39) p<0.0001	0.815 ns
5 (n=381)	2.976 (1.71-5.21) p=0.0001	1.206 ns	1.424 ns	2.073 (1.56-2.77) p<0.0001	0.756 (0.50-1.13) p=0.174
6 (n=356)	2.522 (1.21-5.24) p=0.013	1.059 ns	1.211 ns	2.192 (1.55-3.11) p<0.0001	0.886 ns
7 (n=341)	2.325 (0.92-5.88) 0.075	1.512 ns	0.903 ns	2.378 (1.56-3.62) p=0.0001	0.770 ns
8 (n=326)	1.239 ns	1.010 ns	2.148 ns	1.719 (1.02-2.90) p=0.043	0.781 ns
9 (n=268)	1.693 ns	1.437 ns	1.029 ns	2.159 (1.06-4.40) p=0.034	0.959 ns
10 (n=204)	0.967 ns	1.089 ns	0.687 ns	2.553 (1.00-6.53) p=0.050	0.552 ns

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox unter Einschluß aller in der Tabelle aufgeführten Faktoren zusätzlich adjustiert nach OH-Einnahme (ja/nein), Alter (<50/≥50 Jahre), Operationsmodus und Chemotherapie

<sup>2</sup> nicht signifikante Konfidenzintervalle mit p-Werten >0.2 als ns abgekürzt

#### 2.4.2. OH-Einnahmezeitraum und Gestagenkomponenten

Die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose und die Einnahme NETA-haltiger OH hatten sich hinsichtlich der OH-Einnahme als stärkste unabhängige Prognosefaktoren erwiesen. Bei der Untersuchung der Wertigkeit dieser Prognosefaktoren mit Zunahme der Follow-up Periode erwies sich die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose der Einnahme NETA-haltiger OH deutlich überlegen (Tab. 2.4-2 und 2.4-3). Während die Einnahme NETA-haltiger OH schon nach 4 Jahren keinen prognostischen Einfluß mehr hatte, blieb dieser Effekt für die OH-Einnahme zwischen dem 5. und 8. Jahr vor der Diagnose über das gesamte Follow-up deutlich nachweisbar und war nur im 6. und 7. Jahr statistisch nicht signifikant. Die Risiken für den Tod am Mammakarzinom waren für diese Patientengruppe über das gesamte Follow-up um etwa 45% bis 70% geringer als für alle anderen Patientinnen (Tabelle 2.4-2).

Diese Analysen waren zunächst für Patientinnen mit OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose oder mit OH-Einnahme zu einem anderen Zeitpunkt sowie für die Einnahme NETA-haltiger OH oder die Einnahme anderer OH getrennt durchgeführt worden. Die Referenzgruppe wurde dabei jeweils von Patientinnen gebildet, die niemals OH eingenommen hatten. Da die Ergebnisse jedoch keine signifikanten Differenzen zwischen der Gruppe ohne OH-Einnahme und der mit einer OH-Einnahme zu einem anderen Zeitpunkt oder auch zwischen der Gruppe ohne OH-Einnahme und der mit einer Einnahme von anderen als NETA-haltigen OH erbrachten, wurden diese Gruppen jeweils als Referenzgruppe zusammengefaßt (Anhang Tab. A2.4-1, Tab. A2.4-2).

Insgesamt zeigte sich auch hier der LK-Status als stärkster unabhängiger Prognosefaktor noch nach 8-jährigem Follow-up. Analysen über längere Zeiträume waren aufgrund der kleinen Untergruppen nicht möglich.

Zusammenfassend war die Einnahme von OH im 5.-8. Jahr vor der Diagnose über den gesamten Beobachtungszeitraum mit einer durchschnittlichen Reduktion der Sterberisiken um 54% verbunden. Nach dem LK-Status erwies sich damit die Einnahme von OH über diesen Zeitraum gemeinsam mit dem histologischen Tumortyp als stärkster Prognosefaktor über eine langjährige Nachbeobachtungszeit.

Tabelle 2.4-2: Zeitabhängige Entwicklung der Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor Diagnose, histomorphologischen und zellulär exprimierten Faktoren im Follow-up

Prognosefaktoren						
Jahre nach Diagnose	OH 5.-8. Jahr andere/5.-8. HR (95%KI) <sup>1</sup> p-Wert <sup>2</sup>	Tumortyp andere/LCI HR(95%KI) <sup>1</sup> p-Wert <sup>2</sup>	Grading I und II/III HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	Tumorgröße ≤2cm/>2cm HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	LK-Status (-)/(+) HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	PR (%) <20/20-50/>50 HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>
1 (n=471)	0.43 (0.28-0.65) 0.0005	2.09 (1.41-3.10) 0.0003	1.80 (1.20-2.69) 0.004	1.49 (1.00-2.23) 0.053	2.11 (1.75-2.55) <0.0001	0.69 (0.52-0.91) 0.009
2 (n=462)	0.41 (0.27-0.64) 0.0001	2.00 (1.33-3.02) 0.001	1.67 (1.11-2.52) 0.013	1.41 (0.94-2.12) 0.096	2.11 (1.74-2.56) <0.0001	0.71 (0.53-0.94) 0.018
3 (n=435)	0.43 (0.27-0.69) 0.0005	2.04 (1.30-3.20) 0.002	1.54 (1.00-2.37) 0.052	1.35 (0.87-2.08) 0.179	1.97 (1.59-2.43) <0.0001	0.74 (0.54-1.01) 0.061
4 (n=409)	0.46 (0.27-0.77) 0.003	2.23 (1.36-3.66) 0.002	1.38 (0.86-2.21) 0.177	1.45 (0.89-2.38) 0.135	1.94 (1.53-2.46) <0.0001	0.79 (0.56-1.12) 0.184
5 (n=381)	0.54 (0.30-0.98) 0.042	2.93 (1.68-5.11) 0.002	1.16 ns	1.42 ns	2.12 (1.60-2.82) <0.0001	0.73 (0.49-1.11) 0.142
6 (n=356)	0.52 (0.25-1.09) 0.084	2.48 (1.20-5.13) 0.015	1.02 ns	1.20 ns	2.24 (1.58-3.17) <0.0001	0.87 ns
7 (n=341)	0.45 (0.19-1.06) 0.069	2.24 (0.89-5.66) 0.087	1.10 ns	0.88 ns	2.45 (1.61-3.74) <0.0001	0.75 ns
8 (n=326)	0.23 (0.06-0.88) 0.031	1.27 ns	0.94 ns	2.16 ns	1.79 (1.07-3.02) <0.028	0.74 ns

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox unter Einschluß aller in der Tabelle aufgeführten Faktoren, zusätzlich adjustiert nach OH-Einnahme (ja/nein) und Alter (<50/≥50 Jahre)

<sup>2</sup> nicht signifikante Konfidenzintervalle mit p-Werten>0.2 als ns abgekürzt

Tabelle 2.4-3: Zeitabhängige Entwicklung der Hazard Ratios für den Tod am Mammakarzinom in Abhängigkeit von der Einnahme NETA-haltiger OH und von histomorphologischen Faktoren im Follow-up

Jahre nach Diagnose	Prognosefaktoren					
	NETA-OH andere/NETA HR(95%KI) <sup>1</sup> p-Wert <sup>2</sup>	Tumortyp andere/LCI HR(95%KI) <sup>1</sup> p-Wert <sup>2</sup>	Grading I und II/III HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	Tumorgröße ≤2cm/>2cm HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	LK-Status (-)/(+) HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>	PR (%) <20/20-50/>50 HR (95%KI) p-Wert <sup>2</sup>
1 (n=471)	0.448 (0.29-0.69) 0.0003	2.024 (1.36-3.00) 0.0005	2.001 (1.34-3.00) 0.0007	1.577 (1.06-2.36) 0.026	2.076 (1.72-2.51) <0.0001	0.700 (0.54-0.92) 0.010
2 (n=462)	0.455 (0.29-0.71) 0.0004	1.921 (1.27-2.90) 0.002	1.887 (1.26-2.84) 0.002	1.491 (0.99-2.23) 0.053	2.074 (1.70-2.52) <0.0001	0.721 (0.55-0.95) <0.020
3 (n=435)	0.458 (0.28-0.74) 0.001	1.960 (1.25-3.08) 0.004	1.728 (1.12-2.67) 0.014	1.404 (0.92-2.16) 0.123	1.934 (1.57-2.39) <0.0001	0.751 (0.56-1.02) 0.063
4 (n=409)	0.572 (0.35-0.95) 0.030	2.167 (1.32-3.57) 0.002	1.526 (0.95-2.44) 0.079	1.496 (0.92-2.44) 0.106	1.909 (1.51-2.42) <0.0001	0.798 (0.57-1.12) 0.194
5 (n=381)	0.702 ns	2.855 (1.63-4.99) 0.0002	1.255 ns	1.441 ns	2.092 (1.58-2.77) <0.0001	0.747 (0.50-1.12) 0.156
6 (n=356)	0.532 (0.25-1.12) 0.098	2.324 (1.12-4.80) 0.023	1.142 ns	1.238 ns	2.217 (1.57-3.14) <0.0001	0.869 (0.53-1.42) 0.058
7 (n=341)	0.572 ns	2.102 (0.84-5.27) 0.113	1.270 ns	0.923 ns	2.408 (1.59-3.66) <0.0001	0.767 ns
8 (n=326)	0.492 ns	1.154 ns	1.120 ns	2.274 (0.65-7.95) 0.198	1.774 (1.03-2.94) 0.037	0.773 ns
9 (n=268)	0.423 ns	2.076 ns	1.413 ns	1.107 ns	2.102 (0.98-4.15) 0.056	0.917 ns
10 (n=204)	0.32 ns	1.640 ns	1.094 ns	0.868 ns	2.294 (0.91-5.77) 0.078	0.552 ns

<sup>1</sup> Hazard Ratios (95% Konfidenzintervalle) und zugehörige p-Werte aus proportionalem Hazardmodell nach Cox unter Einschluß aller in der Tabelle aufgeführten Faktoren, zusätzlich adjustiert nach OH-Einnahme (ja/nein) und Alter (<50/≥50 Jahre)

<sup>2</sup> Konfidenzintervalle mit einem p-Wert>0.2 als ns abgekürzt

### 3. Diskussion

Nach der Einnahme von Ovulationshemmern (OH) zeigten sich signifikante Veränderungen in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms. Die nachgewiesenen Unterschiede in der Ausprägung histomorphologischer und insbesondere zellulär exprimierter Faktoren in Abhängigkeit von der OH-Einnahme lassen vermuten, daß die exogene Hormonzufuhr wesentliche Regulationsmechanismen des Mammakarzinoms beeinflusst.

Der Zusammenhang zwischen der Einnahme von OH und tumorassoziierten Prognosefaktoren wurde bisher nicht häufig untersucht und vorliegende Studien zu dieser Thematik beschränkten sich in der Regel auf die Erfassung nur weniger etablierter Faktoren (UK 1989, Schlesselmann et al. 1992, Collaborative Group 1996, Hulman et al. 1992, Stalsberg et al. 1989, Miller N et al. 1989, Romieu et al. 1989). Studien, die neuere molekularbiologische Faktoren in Abhängigkeit von der OH-Einnahme untersucht haben, sind noch seltener und beziehen sich meist auf kleine Patientenzahlen (Olsson et al. 1991a, Olsson et al. 1991b, van der Kooy et al. 1996, Treurniet et al. 1992). Die Komplexität möglicher Wechselwirkungen zwischen der Einnahme von OH und der Biologie des Mammakarzinoms wurde daher durch die bekannten Studien nur sehr eingeschränkt erfaßt.

#### Tumorcharakteristika

##### *Histomorphologische Faktoren*

Die überwiegende Anzahl aller Patientinnen wurde an einem duktal invasiven Karzinom operiert. Neben diesen 327 duktal invasiven Tumoren (69.4%), wurden 67 lobulär invasive Karzinome (14.2%) und 77 Tumoren anderer Typen (16.3%) histologisch gesichert. Das duktal invasive Karzinom ist das am häufigsten diagnostizierte Karzinom der Mamma (Bässler et al. 1978, Berg and Hutter 1995, Stegner 1996). Die Häufigkeit lobulärer Karzinome einschließlich ihrer Subtypen wird in der Literatur mit 14% bis 20% beschrieben (Donegan et al. 1972, Fisher et al. 1973, Martinez et al. 1979, Stalsberg et al. 1989, Querzoli et al. 1998). Dabei ist in den entwickelten westlichen Ländern die Häufigkeit des Auftretens lobulärer Karzinome gegenüber der in weniger entwickelten Ländern Afrikas und Asiens offenbar höher (Rosen et al. 1977, Correa and Johnson 1978, Black et al. 1979, Stalsberg et al. 1989). Vermutet wird, daß hormonelle Faktoren wie Pubarche und Geburtsverhalten die Größe des lobulären Zellpools und damit die Zahl der Zellen, die verstärkt auf karzinogene Einflüsse reagieren, verringern (Moolgavkar et al. 1980, Thomas 1984). Lobuläre Zellen reagieren am deutlichsten auf hormonelle Stimuli im menstruellen Zyklus, während der Schwangerschaft oder menopausal (Longrace and Bartow 1986). In westlichen Ländern kommt nach relativ früher Menarche der differenzierungsfördernde Einfluß von Schwangerschaft und Stillen später zum Tragen. Auch die Menopause mit konsekutiver Obliteration lobulärer Strukturen hat sich zum höheren Lebensalter verschoben. Diese Differenzen in den hormonell wirksamen Ereignissen zwischen Patientinnen westlicher Länder und denen weniger entwickelter Staaten könnten für die beschriebenen Unterschiede in den histologischen Typen verantwortlich sein (Stalsberg et al. 1989).

Die Mehrzahl der Mammakarzinome (39.7%) zeigte eine mittlere histologische Differenzierung, 28.2% der Tumoren waren gut- und 32.1% der Tumoren schlecht differenziert. Diese Verteilung entspricht im wesentlichen den in der Originaluntersuchung von Bloom und Richardson (1957) dargestellten Häufigkeiten. Die relativ hohe Anzahl von gut differenzierten Mammakarzinomen könnte auf die oben beschriebene Häufigkeit lobulär invasiver Karzinome zurückzuführen sein, die in der Regel ein günstiges Grading aufweisen.

Zum Zeitpunkt der Diagnose waren die Tumoren in 71% der Fälle größer als 2 cm im Durchmesser und in 54% der Fälle handelte es sich um LK-positive Mammakarzinome. Diese Häufigkeitsverteilung ist für den Rekrutierungszeitraum der Studie repräsentativ und resultiert aus der überwiegend klinischen Diagnosestellung vor der verbreiteten Nutzung der Mammographie im Rahmen der Diagnostik und Vorsorge. Andere Studien, die über die gleichen Zeiträume angelegt waren, zeigen ähnliche Verteilungen der histopathologischen Befunde (Nicholson et al. 1991, Lipponen et al. 1992, Noguchi et al. 1993, Pujol et al. 1994, Gasparini et

al. 1998, Molina et al. 1998).

#### *Zellulär exprimierte Faktoren*

*ER/PR - Expression:* In der vorliegenden Studie waren 72% der Tumoren ER-positiv und 68% waren PR-positiv. In großen Studien liegen prozentuale Angaben zum Anteil rezeptorpositiver Tumoren zwischen 50%-79% für die ER-Expression und 50%-68% für die PR-Expression (Rosner and Lane 1986, Granata et al. 1991, Wyss et al. 1992, Aaltomaa et al. 1993, Pujol et al. 1994, Haerslev et al. 1996). Der Anteil rezeptorpositiver Mammakarzinome ist prämenopausal geringer als postmenopausal. Dabei sind Mammakarzinome in westlichen Ländern offenbar häufiger ER-positiv als in fernöstlichen Ländern (Nomura et al. 1977). Prämenopausal werden ER-positive Tumoren abhängig von der Studienpopulation in 49% bis 71% der Fälle diagnostiziert, während in den zitierten Untersuchungen die Angaben für die ER-Expression postmenopausal zwischen 73% und 83% lagen. PR-positive Mammakarzinome wurden prämenopausal in 39%-69% und postmenopausal in 41%-78% der Fälle beschrieben (Vihko and Isotalo 1981, Chevallier et al. 1988, Brocklehurst et al. 1989, Clark and McGuire 1989, Wyss et al. 1992, Pujol et al. 1998).

Verschiedene Studien haben auf eine Zunahme der ER-positiven Mammakarzinome in den letzten 20 Jahren hingewiesen (Glass and Hoover 1990, Di Fronzo et al. 1990, Harris et al. 1992, Pujol et al. 1994). Die umfangreichste dieser Untersuchungen wies nicht nur eine Zunahme des prozentualen Anteils ER-positiver Tumoren sondern auch eine Erhöhung der ER-Expression des einzelnen Mammakarzinoms nach (Pujol et al. 1994). Die Autoren waren der Meinung, daß es sich dabei um eine echte Zunahme handelt, wobei die Ursache am ehesten in Änderungen der Tumorbiologie durch hormonelle Schlüsselereignisse in der Karzinogenese zu suchen sein soll. Diese Tatsache ist in Anbetracht der Einführung von OH in den 60iger Jahren und der zunehmenden Verbreitung der hormonellen Substitutionstherapie in der Perimenopause und Menopause von besonderem Interesse.

*PCNA-Expression:* Die hier untersuchten Tumoren zeigten in 26.3% aller Fälle eine geringe, in 60.3% eine mäßige und in 13.4% der Fälle eine hohe PCNA-Expression. Wie auch durch andere Autoren beschrieben, waren stark PCNA-exprimierende Tumoren signifikant häufiger ER/PR-negativ und schlecht differenziert (Gasparini et al. 1993, Narita et al. 1993, Siitonen et al. 1993, Montesco et al. 1995, Haerslev et al. 1996, Sheen et al. 1997). PCNA ist ein DNA  $\delta$ -Polymerase assoziiertes Antigen, das hauptsächlich in der G1/S-Phase der Zelle exprimiert wird und eng mit der Proliferationsaktivität der Zelle verknüpft ist. Die PCNA-Expression erlangte auch beim Mammakarzinom Bedeutung zur Charakterisierung der Proliferationsfraktion (Leonardi et al. 1992, Shrestha et al. 1992, Aaltomaa et al. 1993, Narita et al. 1993, Noguchi et al. 1993, Siitonen et al. 1993) und wurde in zahlreichen Studien als Prognosefaktor verifiziert (Aaltomaa et al. 1993, Siitonen et al. 1993, Montesco et al. 1995, Schönborn et al. 1995, Sheen et al. 1997, Yu et al. 1995). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse in ihren Serien nicht nachvollziehen, wobei die Studien insgesamt sehr unterschiedliche Follow-up Perioden überblickten (Schmitt et al. 1994, Haerslev et al. 1996).

*EGF-R-Expression:* Die hier untersuchten Mammakarzinome zeigten in 47.3% eine positive Expression des EGF-R. Publierte Angaben zur EGF-R-Positivität beim Mammakarzinom haben eine große Schwankungsbreite und reichen von 22% bis 67% der Fälle in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Studie, von der Preservation des untersuchten Materials und der angewandten Methodik (Möller et al. 1989, Gasparini et al. 1992, Dittadi et al. 1993, Murray et al. 1993, Gompel et al. 1996, Walker and Dearing 1999).

Der EGF-R gehört zur erbB-Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und spielt als transmembranärer Rezeptor eine wesentliche Rolle für die Wachstumsregulation der Zelle. Es handelt sich beim EGF-R um ein 170kD Glycoprotein, dessen intrazelluläre Domäne eine hohe Sequenzhomologie zum c-erbB-2-Protein aufweist (Bargmann et al. 1986). In-vitro Studien an Mammakarzinom-Zelllinien haben EGF-R und seinen Liganden eine wesentliche Rolle im Transformationsprozeß zugeschrieben (Pierce et al. 1991). Eine erhöhte EGF-R-Expression kann durch Genamplifikation mit oder ohne Beeinflussung von Transkriptionsvorgängen und auch durch Überexpression der EGF-R ohne Genamplifikation hervorgerufen werden, wobei die



Genamplifikation beim Mammakarzinom eher selten zu sein scheint (Gullick 1991a). Die Bedeutung des EGF-R als prognostischer Faktor für das Mammakarzinom wurde vielfach untersucht und wird noch immer kontrovers beurteilt (Klijn et al. 1992, Gasparini et al. 1994a, Fox et al. 1994, Beckmann et al. 1996, Pirinen et al. 1995).

*C-erbB-2-Protein:* In der vorliegenden Studie zeigten 21% der Mammakarzinome eine Überexpression des c-erbB-2-Proteins. In repräsentativen Studien wird die Häufigkeit der c-erbB-2-Proteinüberexpressionen mit 20%-30% der Tumoren angegeben (Slamon et al. 1987, Gullick et al. 1991b, O'Reilly et al. 1991, Perren 1991, Hynes et al. 1993, Molina et al. 1998, Révillion et al. 1998).

Das c-erbB-2-Protein gehört wie auch der EGF-R zur erbB-Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Seine Überexpression erfolgt entweder über eine c-erbB-2 Amplifikation und/oder über die Überexpression seiner mRNA, die eine erhöhte und unregulierte Aktivität der c-erbB-2 Tyrosinkinase zur Folge hat (Slamon et al. 1988, De Bortoli 1992). Die Rolle des c-erbB-2 im Prozeß der Karzinogenese ist jedoch trotz umfangreicher Untersuchungen bis heute nicht erschöpfend geklärt (Reese and Slamon 1997, Rohan et al. 1998). Neben seiner Bedeutung für die Proliferations- und Differenzierungsregulation wurde dem c-erbB-2 Gen eine regulatorische Funktion für die Zellmotilität und damit für alle Invasions- und Metastasierungsprozesse zugeschrieben (De Potter 1995). Seit der ersten größeren klinischen Studie zur prognostischen Bedeutung des Protoonkogens und seines kodierten Rezeptors (Slamon et al. 1987), hat sich c-erbB-2 als anerkannter Prognosefaktor insbesondere für das LK-positive Mammakarzinom durchgesetzt (Gullick 1991b, Seshradi et al. 1993, Lonn et al. 1996, Eissa et al. 1997, Sjögren et al. 1998). Dennoch ergeben die publizierten Ergebnisse kein homogenes Bild, was unter anderem den unterschiedlichen Follow-up Perioden oder dem Einfluß sich ändernder adjuvanter Therapiemodalitäten zugeschrieben wird (Révillion et al. 1998). Auch für das LK-negative Mammakarzinom konnte c-erbB-2 inzwischen in einigen Studien mit genügend hoher Fallzahl und entsprechendem Follow-up seine Wertigkeit als Prognosefaktor nachweisen (Quenel et al. 1995, Andrulis 1998). Allerdings sind die Diskussionen um die prognostische Bedeutung des c-erbB-2 für das LK-negative Mammakarzinom noch immer kontrovers (Hartmann et al. 1992, Gasparini et al. 1994b, Haerslev et al. 1995, Rosen et al. 1995a, Révillion et al. 1998).

*p53-Protein:* In der vorliegenden Untersuchung waren 29.7% der Tumoren p53-Protein positiv. Eine publizierte Studie zur p53-Expression bei prämenopausalen Patientinnen mit ähnlicher Altersstruktur beschrieb identische Expressionsraten zu den hier vorgestellten Ergebnissen (Pratap and Shousha 1998). P53-Mutationen treten in bis zu 58% aller Mammakarzinome bei Patientinnen mit familiärer Belastung und in 30%-50% aller sporadischen Mammakarzinome auf (Elledge and Allred 1994, Norberg 1996, Gasparini et al. 1998, Merchant et al. 1999). Möglicherweise gibt es rassenspezifische Unterschiede in den betroffenen Genloci und auch in der p53-Proteinexpression, die zu noch höheren Expressionsraten in unterschiedlich zusammengesetzten Populationen führen können (Sommer et al. 1992, Shiao et al. 1995, Nayak et al. 1996). In verschiedenen Studien reichen die Angaben zur p53-Protein-Expression beim Mammakarzinom von 23%-82% abhängig vom verwendeten Material, verschiedenen AK und der angewandten Methodik (Bosari et al. 1992, Barnes et al. 1993, Silvestrini et al. 1993, Pratap and Shousha 1998).

Das p-53 Tumorsuppressorgen spielt eine wesentliche Rolle für die Proliferationsregulation und Apoptoseinduktion der Zelle. P53-Mutationen führen zum Verlust seiner Supressorfunktion und haben in einem hohen Prozentsatz die Expression eines veränderten Proteinproduktes zur Folge, welches in der Zelle akkumuliert und dem immunhistochemischen Nachweis zugänglich ist (Nigro et al. 1989, Rodrigues et al. 1990, Nayak et al. 1996, Norberg et al. 1996, Levine 1997, Rohan et al. 1998, Kaelin 1999, Prives and Hall 1999). Im Prozeß der Karzinogenese sind p53-Mutationen die am häufigsten beobachteten genetischen Alterationen beim Mammakarzinom (Nigro et al. 1989, Levine 1997, Rohan et al. 1998). Die Bedeutung des p53 als Prognosefaktor wird unterschiedlich beurteilt, wobei dem p53 jedoch eine wesentliche Rolle für die Progression des Mammakarzinoms zugeschrieben wird (Elledge et al. 1993, Rosen et al. 1995b, Bianchi et al. 1997, Eissa et al. 1997, Kristen et al. 1997, Gasparini et al. 1998, Levesque et al. 1998, Bertheau et al. 1998, Elledge and Allred 1998, Segui et al. 1998)

## OH und Tumorcharakteristika

Es ist bekannt, daß Steroide in Abhängigkeit davon, ob sie vor der Tumorinduktion oder danach eingesetzt werden, völlig gegensätzliche Wirkungen haben können (Rutteman 1992, King et al. 1993). In tierexperimentellen Studien verdoppelte sich die Inzidenz des Mammakarzinoms bei Einwirkung von MPA kurz vor der Tumorinduktion. Wurde das MPA länger vor der Initiierung gegeben, kam es zu einer Inzidenzabnahme. Dieser Effekt war offenbar von dem erreichten Differenzierungsstadium der Mamma abhängig (Russo et al. 1989, Guzman et al. 1999). Unabhängig davon ist anzunehmen, daß sich vorhandene hormonelle Regelkreise im Prozeß der Karzinogenese verändern oder sogar zum Erliegen kommen (Darbre and King 1987, Markopoulos et al 1988, Poulin et al. 1990, Fuqua et al. 1991, Rutteman 1992, Freiss et al. 1993, Fuqua 1993, Horwitz 1993, King et al. 1993). Der biologische Effekt eines einwirkenden Agens wird somit nicht nur vom Agens selbst bestimmt sondern hängt in gleichem Maße vom Zeitpunkt der Exposition ab.

Zur Charakterisierung der Expositionsdauer und des Expositionszeitraumes wurde in der vorliegenden Studie die OH-Einnahme und ihr Einfluß auf prognostische Faktoren durch vier Einnahme-Kriterien genauer beschrieben. Untersucht wurden Veränderungen in Abhängigkeit

- von der Dauer der Einnahme,
- vom Abstand der letzten Einnahme,
- vom Abstand der ersten Einnahme und
- von der Bedeutung definierter Einnahmezeiten.

### *OH und histomorphologische Faktoren*

Signifikante Unterschiede histomorphologischer Befunde traten nur nach OH- Einnahme bis zum Zeitpunkt der Diagnose des Mammakarzinoms auf und betrafen den LK-Status und das histologische Grading. Dabei hatten Patientinnen, die OH bis zur Diagnose eingenommen hatten, gegenüber denen ohne OH-Einnahme ein zweifach erhöhtes Risiko, an einem schlecht differenzierten oder LK-positiven Mammakarzinom zu erkranken (OR 2.01). Auch nach OH-Langzeiteinnahme fand sich noch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines schlecht differenzierten Mammakarzinoms (OR 1.7). Allerdings verfehlte dieses Ergebnis knapp die Signifikanzgrenze. Die OH-Einnahme zu allen anderen Zeitpunkten hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Ausprägung histomorphologischer Faktoren.

Auch in der prospektiven „Nurses' Health Study“ wurden bei Patientinnen, die OH zum Zeitpunkt der Diagnose eingenommen hatten im Vergleich zu Patientinnen ohne OH-Einnahme, häufiger größere und LK-positive Mammakarzinome diagnostiziert (Romieu et al. 1989). Zwei weitere Studien beschrieben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen OH-Einnahme und ungünstigeren Tumorstadien, ohne jedoch die OH-Einnahme genauer zu spezifizieren. In diesen Untersuchungen waren die Mammakarzinome nach OH-Einnahme signifikant häufiger LK-positiv und hatten einen größeren Durchmesser (Royal College of General Practitioners 1981, Olsson and Ranstam 1989).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Metaanalyse der „Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer“ eine bessere Stadienverteilung der Mammakarzinome nach OH-Einnahme (Collaborative Group 1996). Dieses günstige Ergebnis spiegelt sich in einer Reihe von Einzelstudien wieder (Spencer et al. 1978, Vessey et al. 1979, Rosner and Lane 1986, Schlesselmann et al. 1992, Sauerbrei et al. 1998). Nach OH-Einnahme wurden dabei signifikant häufiger kleinere (Vessey et al. 1979, Matthews et al. 1981, UK 1989, Schlesselmann et al. 1992, Sauerbrei et al. 1998), LK-negative (Vessey et al. 1979, Matthews et al. 1981) und besser differenzierte Tumoren gefunden (Matthews et al. 1981). Eine Beeinflussung der Histomorphologie des Mammakarzinoms wurde ebenso nach Hormonsubstitution in der Peri- und Postmenopause beschrieben. Bei diesen Patientinnen soll es zu einer Häufung von Tumoren mit prognostisch günstigem histologischen Typ kommen (Gapstur et al. 1999). In der „WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives“ kam es nach OH-Einnahme im Vergleich zur Nichteinnahme häufiger zur Entwicklung tubulolobulärer und lobulärer Mammakarzinome, wobei die Differenz die Signifikanzgrenze jedoch knapp verfehlte (Stalsberg et al. 1989). Andere Studien wiederum erbrachten keinerlei signifikante Unterschiede

in den histomorphologischen Befunden von Tumoren in Abhängigkeit von der OH-Einnahme (Fechner 1970, Rosner et al. 1985, McPherson et al. 1987, Millard et al. 1987, Potten et al. 1988, Miller N et al. 1989, Stalsberg et al. 1989, Hulman et al. 1992). Die relativ hohe Anzahl lobulärer Karzinome in der vorliegenden Studie war ein allgemeiner Befund ohne Bezug zur Einnahme von OH.

Eine günstigere Stadienverteilung der Mammakarzinome bei Patientinnen, die OH verwendet haben, könnte die Folge einer engmaschigeren Kontrolle von Frauen sein, die OH einnehmen. Damit würde es sich um eine Vorverschiebung der Diagnose durch einen Früherkennungseffekt infolge besserer ärztlicher Betreuung handeln (surveillance bias). Es ist jedoch bekannt, daß selbst bei engmaschiger ärztlicher Kontrolle 85% aller Tumoren unabhängig von der OH-Einnahme von den Patientinnen selbst oder ihren Partnern festgestellt werden (Vessey et al. 1979). Auf den fehlenden oder verschwindend geringen Einfluß einer engeren ärztlichen Überwachung oder der häufigeren Selbstuntersuchung auf den Diagnosezeitpunkt wiesen auch andere Studien hin (UK 1989, Schlesselman et al. 1992, Holmberg et al. 1994, Auvinen et al. 1996, Richards et al. 1999).

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich für die Gesamtgruppe keine Unterschiede in der Tumorgroße oder dem LK-Status zugunsten der Patientinnen, die OH eingenommen hatten, so daß hier ein Vorliegen eines surveillance bias unwahrscheinlich erscheint. Darüberhinaus war eine echte Früherkennung wie sie heute durch den Einsatz der Mammographie möglich ist, aufgrund der überwiegend klinischen Diagnosestellung zum Zeitpunkt der Patientenrekrutierung kaum möglich. Auch andere Studien, die zu diesem Zeitpunkt ihre Patientinnen rekrutiert haben, weisen eine ähnliche Stadienverteilung auf (Nicholson et al. 1991, Lipponen et al. 1992, Noguchi et al. 1993, Pujol et al. 1994, Gasparini et al. 1998, Molina et al. 1998).

Während die Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen der OH-Einnahme und histomorphologischen Befunden eher spärlich und widersprüchlich sind, nehmen in letzter Zeit die Berichte zur Wirkung der peri- und postmenopausalen Hormonsubstitution auf das Mammakarzinom zu. Hier sind die Ergebnisse überwiegend positiv und homogener als sie sich für den Effekt der OH-Einnahme auf das Mammakarzinom darstellen. So präsentieren sich Mammakarzinome unter Hormonsubstitution signifikant häufiger mit günstigeren Stadien und besserem histologischen Grading als Tumoren von Frauen ohne hormonelle Substitutionstherapie (Bergkvist et al. 1989, Strickland et al. 1992, Squitieri et al. 1994, Bonnier et al. 1995, Magnusson et al. 1996, Reid et al. 1996). Dieser günstige Effekt ist möglicherweise eher der kombinierten Östrogen/Gestagenstherapie als der alleinigen Östrogenstherapie zuzuschreiben (Magnusson et al. 1996). Als Ursache der besseren Stadienverteilung werden sowohl biologische Wirkungen durch die exogene Hormonzufuhr als auch surveillance bias diskutiert.

#### *OH und zellulär exprimierte Faktoren*

*ER/PR-Expression:* Nach OH-Einnahme wurden für alle unterschiedlichen Einnahmecharakteristika mit Ausnahme von nur einer Untergruppe signifikant häufiger hoch ER-positive Tumoren gefunden. Lediglich bei OH-Einnahme bis zum Zeitpunkt der Diagnose fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Steroidrezeptoren im Vergleich zur Gruppe ohne OH-Einnahme. Die PR-Expression zeigte dagegen keinerlei signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der OH-Einnahme.

Ein genereller Anstieg in der Häufigkeit ER-positiver Mammakarzinome während der vergangenen zwei Jahrzehnte, möglicherweise infolge sich ändernder endogener und exogener hormoneller Einflüsse, wurde bereits durch verschiedene Autoren beschrieben (Glass and Hoover 1990, Di Fronzo et al. 1990, Harris et al. 1992, Pujol et al. 1994).

Die ER-Expression beim Mammakarzinom ist eines der wenigen Tumorcharakteristika, die im Zusammenhang mit der OH-Einnahme ausführlicher untersucht worden sind. In der Regel wurde bei der Untersuchung dieser Fragestellung keine Differenzierung der OH-Einnahmecharakteristika vorgenommen. Auch in der „Nurses' Health Study“ war die OH-Einnahme vor der Diagnose mit einer Zunahme der Anzahl ER-positiver Tumoren verbunden (Romieu et al. 1989). Angaben zur ER-Expression bei Patientinnen, die OH bis zur Diagnose eingenommen hatten, wurden nicht gemacht.

Eine prospektive Studie zur Steroidrezeptorexpression nach OH-Einnahme beschrieb eine Häufung von ER(+)/PR(-) und ER(-)/PR(-) Tumoren nicht jedoch von ER(+)/PR(+) Mammakarzinomen nach OH-Einnahme (Potter et al. 1995). Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Studie beschriebenen hohen Anzahl stark ER-positiver Mammakarzinome ohne gleichzeitige Zunahme der PR-Expression der Tumoren nach OH-Einnahme.

Die überwiegende Zahl der Studien zu dieser Thematik erbrachte jedoch keine Differenzen in der ER-Expression der Tumoren nach OH-Einnahme im Vergleich zu denen von Patientinnen ohne OH-Einnahme (Elwood et al. 1980, Hulka et al. 1984, McTiernan et al. 1986, Stanford et al. 1987, GIVIO 1988). Andere Untersuchungen wiederum beschrieben eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Diagnose ER-negativer Tumoren nach OH-Einnahme (Lesser et al. 1981, Osborne et al. 1983, Cooper et al. 1998).

Das häufigere Vorkommen hoch ER-positiver Mammakarzinome nach OH-Einnahme in der vorliegenden Studie steht im Gegensatz zu der für das normale Mammagewebe oder für Mammakarzinom-Zelllinien beschriebenen Suppression der ER-Expression unter OH (Mauvais-Jarvis et al. 1987, Makropoulos et al. 1988, Williams et al. 1991, Battersby et al. 1992, Soderquist et al. 1993). Das Ergebnis steht ebensowenig im Einklang mit der durch andere Untersucher beobachteten gleichbleibenden ER-Expression des Mammakarzinoms unter OH-Einnahme. Allerdings trifft dies nicht für die Untergruppe der Patientinnen mit OH-Einnahme bis zur Diagnose zu, bei denen in der vorliegenden Untersuchung keine Unterschiede in der ER-Expression gegenüber Patientinnen ohne OH-Einnahme zu verzeichnen waren. Es kam jedoch auch dann nicht zu einer Downregulation der ER im Tumor wie sie durch andere Untersucher beschrieben worden ist (Williams et al. 1991).

Möglicherweise erfolgte die beobachtete Zunahme der Häufigkeit stark ER-positiver Tumoren bei länger zurückliegender OH-Einnahme erst nach Beendigung der Einnahme als Ausdruck einer Anpassungsreaktion des Tumors. Andererseits könnte es sich um eine frühe hormonelle Prägung des Tumors handeln (Shoker et al. 1999), die bei späterer OH-Einnahme in einem anderen Stadium der Tumorentwicklung nicht stattfindet. Die PR-Expression der Tumoren zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der OH-Einnahme. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit denen anderer Untersuchungen zu dieser Problematik (Williams et al. 1991, Potter et al. 1995).

Die ER-Expression im Mammakarzinom unterliegt äußerst komplexen Regulationsmechanismen. So kann eine ausgeprägte Steroidrezeptor-Positivität Ausdruck des sich verändernden Phenotyps des Tumors bei Verlust seiner Hormonsensitivität sein (Darbre and King 1987, Encarnacion et al. 1993, Thorpe et al. 1993). Offenbar kann der Übergang vom hormonsensiblen zum hormonresistenten Tumor trotz Vorhandenseins eines funktionellen Steroidrezeptors stattfinden und ist über längere Zeiträume reversibel. Der tatsächliche Rezeptorverlust folgt möglicherweise viel später und erst nachdem es irreversibel zum Verlust der Hormonsensibilität gekommen ist. Somit ist der alleinige Rezeptornachweis weder ein Indikator für das endokrine Milieu noch ein zwingender Hinweis auf die Hormonsensitivität des Tumors.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte an Zellkulturen nachgewiesen werden, daß MCF-7 Zelllinien, die nach langer Östrogendprivation hormonunabhängiges Wachstum zeigten, dennoch hohe ER-Spiegel exprimierten und ihre Sensitivität gegenüber Antiöstrogenen behalten hatten (Katzenellenbogen et al. 1987, Welshons et al. 1987, Pink and Jordan 1996). Andererseits waren Östrogen-unabhängige ER-negative T47D-Zelllinien unter Östrogeneinfluß wieder in der Lage, ER zu exprimieren und eine gewisse Östrogen-Sensitivität zu entwickeln (Pink and Jordan 1996).

Tumoren sind klonal heterogen, wobei das hormonelle Milieu, in das sich die Zellen hineinbegeben, die Tumorentwicklung beeinflusst (Bulbrook and Thomas 1989, Jordan et al. 1992). Hormone können so die Proliferation von Tumoren durch klonale Selektion beeinflussen, womit die häufige Hormonresistenz der Mammakarzinome in den ersten fünf Jahren der Menopause erklärt wird (Bulbrook and Thomas 1989).

Für die Expression und Regulation des ER durch Östrogene sind zwei in vitro Modelle nach Studien an Mammakarzinom-Zelllinien postuliert worden (Pink and Jordan 1996). Im Modell I kommt es nach Östrogenzufuhr zu einer Hemmung der ER-mRNA-Level in Form eines negativen Feedback. Diese Form der Regulation führt zu einer Zunahme der ER bei Östrogenmangel und gestattet damit bei erneuter Östrogenzufuhr eine sehr schnelle und ausgeprägte Reaktion wie sie bei der Uterusschleimhaut beobachtet werden kann. In diesem Falle würde die Östrogen/Gestagen induzierte Downregulation des ER eine unkontrollierte Proliferation verhindern (Shupnik et al. 1989, Medlock et al. 1991). Im Modell II kommt es nach Östrogeneinfluß zu einer Zunahme der ER-mRNA-Synthese. Diese Form der Regulation würde lange Expositionszeiten erfordern, ehe eine maximale ER-Synthese und entsprechende Reaktion erfolgt wäre. Diese Art der Reaktion wäre mit Differenzierungsprozessen vereinbar. Somit könnte ein langjähriger hormoneller Stimulus beim Mammakarzinom in Abhängigkeit vom vorherrschenden Regulationsmechanismus sowohl mit einer hohen als auch mit einer reduzierten ER-Expression einhergehen.

Die hier beschriebene Zunahme stark ER-positiver Mammakarzinome nach OH-Einnahme, wenn die Hormonzufuhr bereits vor der Diagnosestellung beendet wurde, könnte durch die Beendigung der Einnahme induziert worden sein. In Anlehnung an Modell I käme es durch einen Östrogenabfall zu einer Induktion der ER-Expression. Diese Art der Regulation würde erklären, warum bei OH-Einnahme bis zur Diagnose keine derartigen Differenzen in der ER-Expression nachweisbar waren.

Wie bereits diskutiert, kommt es daneben auch beim Übergang eines Tumors vom hormonsensitiven zum hormonresistenten Status zur temporären Expression von ER auf hohem Niveau (Darbre and King 1987, Thorpe et al. 1993). Diese Reaktionsweise wurde für die Resistenzentwicklung unter Hormondeprivation beschrieben, somit unter Bedingungen wie sie in Abhängigkeit vom hormonellen Status der Patientin analog nach Absetzen von OH vorliegen könnten (Cullen and Lippman 1989).

Es bleibt offen, in welchem Maße diese umfangreichen Untersuchungen an Zellkulturen den Rückschluß auf hormonelle Regulationsmechanismen beim Mammakarzinom in vivo zulassen. Somit kann nicht abschließend beurteilt werden, inwieweit biologische Merkmale eines Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose das hormonelle Milieu zum Zeitpunkt der Induktion und Transformation oder aber andere Einflüsse während des okkulten Tumorwachstums präsentieren (Nandi et al. 1995).

*PCNA-Expression:* Nur Patientinnen, die OH bis zur Diagnose genommen hatten, zeigten ein stark erhöhtes Risiko (OR 2.13) für das Auftreten extrem hoch proliferierender Tumoren (PCNA-Expression >50%). Allerdings war auch die OH-Einnahme generell mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Diagnose von Tumoren mit mittlerer PCNA-Expression (PCNA 20%-50%) verbunden. Dieser Effekt zeigte sich deutlich sowohl für verschiedene Einnahme-Zeiträume als auch unabhängig von der Einnahmedauer. Für die Einnahmedauer bis zu fünf Jahren, die Ersteinnahme vor mehr als acht Jahren als auch die Einnahme im 5. bis 8. Jahr vor der Diagnose erreichte das Ergebnis statistische Signifikanz. In den anderen beiden Gruppen (Langzeiteinnahme und Einnahme außerhalb des 5. bis 8. Jahres vor Diagnose) verfehlte das Ergebnis die Signifikanzgrenze nur sehr knapp. Damit zeigte sich nach OH-Einnahme ein genereller proliferationsstimulierender Effekt, der allerdings bei Einnahme bis zur Diagnose wesentlich deutlicher zum Tragen kam, als bei der Einnahme zu anderen Zeiten.

Klinische Studien, die die Proliferationsraten beim Mammakarzinom nach OH-Einnahme untersucht haben, gibt es kaum. In einer skandinavischen Studie, die die Proliferationsaktivität beim prämenopausalen Mammakarzinom durch Bestimmung des Anteils der Zellen in der S-Phase erfaßt hat, sind signifikant höhere Proliferationsraten bei OH-Einnahme vor dem 25. Lebensjahr nachgewiesen worden (Olsson et al. 1991a). Eine Erhöhung der S-Phasen-Fraktion wurde ebenso bei Patientinnen mit postmenopausalem Mammakarzinom unter Hormonsubstitution beschrieben (Cobleigh et al. 1999). Diese erhöhte Proliferationsaktivität war nur bei ER-positiven nicht jedoch bei ER-negativen Mammakarzinomen zu beobachten. In der Eingangs erwähnten skandinavischen Studie zeigten die Proliferationsraten eine signifikante umgekehrte Korrelation zum Alter bei der Diagnose. Wurden die Patientinnen, die OH über mehr als 2 Jahre bereits vor dem 20. Lebensjahr eingenommen hatten, aus der

Analyse ausgeschlossen, verschwand der ungünstige Effekt. Das geschilderte Ergebnis unterstreicht die Bedeutung dieser relativ kleinen Gruppe sehr junger Frauen für die Gesamtanalyse. Möglicherweise bleibt nach einer Tumorinduktion in Phasen hoher Proliferation, wie der Pubertät, diese Proliferationspotenz erhalten und könnte durch die Wirkung endogener und exogener Hormone auf die Biologie des Tumors weiter verstärkt werden (Olsson 1989). Die Studie erlaubte jedoch keine weiteren Aussagen zum Einfluß einer OH-Einnahme über definierte Zeiten während des okkulten Tumorwachstums oder aber zum Zeitpunkt der Diagnose. In der erwähnten skandinavischen Studie wurde für die Patientinnen, die OH vor dem 20. Lebensjahr eingenommen hatten, das Durchschnittsalter bei Diagnose mit 36.5 Jahren und bei OH-Einnahme zwischen dem 20. und 25. Lebensjahr mit 46 Jahren angegeben. Bezogen auf das Alter bei Diagnose würde die Latenzzeit nach OH-Ersteinnahme damit im Durchschnitt 15 bis 20 Jahre betragen, was mit den in der Literatur diskutierten Angaben übereinstimmt (von Fournier et al. 1980, Koscielny et al. 1985, Bulbrook et al. 1989, Miller AB et al. 1989). In der hier vorliegenden Studie mit einem Durchschnittsalter von 45 Jahren bei Diagnose war eine länger zurückliegende OH-Ersteinnahme (>8 Jahre) ebenso mit einer signifikanten Risikoerhöhung für das Auftreten von Tumoren mit mittlerer Proliferationsaktivität verbunden. Zum Einfluß der OH-Einnahme vor dem 20. Lebensjahr kann allerdings aufgrund der kleinen Untergruppe, die nur 2.4% aller Patientinnen mit OH-Einnahme umfaßte, keine Aussage gemacht werden.

Eine andere klinische Studie zum Proliferationsverhalten der normalen Mamma nach kombinierter Gabe von Estradiol und Progesteron beschrieb dagegen signifikant geringere PCNA-Proliferationsraten im Vergleich zur alleinigen Estradiol- oder Progesterongabe. Die PCNA-Proliferationsraten unter der Östrogen/Gestagen-Kombination waren dabei vergleichbar mit denen unter Placebogabe (Chang et al. 1995).

Aus zahlreichen in vitro und in vivo Untersuchungen ist der direkte proliferationsfördernde Effekt von Östrogenen auf das Mammagewebe allgemein bekannt und akzeptiert (Jordan et al. 1992, Rutteman 1992, Freiss et al. 1993, King 1993). Große Diskrepanzen bestehen dagegen noch immer hinsichtlich der Wirkung der Gestagene (Clarke and Sutherland 1990, King 1991, Rutteman 1992, Stewart et al. 1992, Freiss et al. 1993, King 1993, Schindler 1997, Thijssen 1997).

Unter OH-Einnahme kommt es im menstruellen Zyklus der Frau zu einer deutlichen Erhöhung der Proliferationsaktivität des normalen Mammagewebes (Anderson et al. 1989, Williams et al. 1991, Soderquist et al. 1998, von Schoultz et al. 1998). Dabei stellt sich das Proliferationsmaximum offenbar bereits vor Zyklusmitte ein, ohne daß sich die Proliferationsfraktion absolut erhöht (Williams et al. 1991). Bei Nulliparae unter OH wurde eine konstant höhere basale Proliferationsfraktion mit einem deutlichen Anstieg in der späten Lutealphase beobachtet (Anderson 1989, Olsson et al. 1996). Der Anstieg der Proliferationsaktivität ist jedoch auch mit einer gesteigerten Apoptoserate verbunden, die im Gegensatz zur Proliferation nicht zum Zyklusende hin abnimmt (Anderson et al. 1982, Anderson et al. 1989, Sitruk-Ware 1996). Damit soll der Anstieg der Apoptoserate in der Lutealphase den der Proliferationsrate übersteigen, wobei ähnliche Effekte nach Einwirkung verschiedener Gestagene beschrieben worden sind (Sitruk-Ware 1996). Diese Tatsache spricht wiederum für einen kontrollierenden, antiproliferativen und differenzierenden Effekt der Gestagene, wie er auch durch andere Autoren beschrieben worden ist (Sutherland et al. 1988, Clarke and Sutherland 1990, Sutherland et al. 1995). Für den eher antiproliferativen Effekt spricht ebenfalls das verminderte Auftreten benignen proliferativer Veränderungen der Mamma unter OH-Einnahme (Cole 1977, Wingrave et al. 1982, Pastides et al. 1983, Hsieh et al. 1984, Hulman et al. 1992, Di Lieto et al. 1994).

Durch in vitro Untersuchungen wurde bekannt, daß Gestagene zu einer initialen Stimulation der Proliferation führen, bevor es bei Erreichen der G1 Phase zur Arretierung der Zellen kommt (Clarke and Sutherland 1990, Musgrove et al. 1991, Hulman et al. 1992). Bevor die antiproliferative Wirkung der Gestagene zum Tragen kommen kann, müßte in diesem Falle nahezu eine Verdopplung der Zellen vorangegangen sein. Weiterhin kann man davon ausgehen, daß das Mammagewebe erst nach einiger Zeit auf die Gestagenwirkung reagiert. Damit wäre der initiale Anstieg der Proliferation in der Lutealphase durch den erst verzögert einsetzenden antiproliferativen Gestageneffekt erklärbar (Chang et al. 1995, Wren et al. 1995).

Daß die Veränderungen des Östrogen- und Gestagenspiegels während des normalen Zyklus der Frau auch potentielle Bedeutung für das klinisch manifeste Mammakarzinom haben, wird an der kontroversen Diskussion zur Bedeutung des Operationszeitpunktes für den Erkrankungsverlauf deutlich.

Aufsehenerregend war dabei eine Studie, die Differenzen der 10-Jahresüberlebensraten von 30% zugunsten der prä- und perimenstruell operierten Patientinnen mit LK-positiven Mammakarzinomen beschrieb (Badwe et al. 1991). Vorangegangen waren einige tierexperimentelle und kleinere klinische Studien, die auf dieses Problem erstmals aufmerksam gemacht hatten (Ratajczak et al. 1988, Hrushesky et al. 1989). Inzwischen gibt es im Verlauf verschiedene Arbeiten, die ähnliche Überlebensvorteile oder aber Vorteile für die Dauer des krankheitsfreien Intervalls insbesondere für LK-positive Mammakarzinome beschreiben (Senie et al. 1991, Fentiman and Gregory 1993, Veronesi et al. 1994, von Minckwitz et al. 1994, Kurebayashi et al. 1995, Lemon and Rodriguez-Sierra 1996, Goldhirsch et al. 1997, Vanek et al. 1997, Chang et al. 1997). Allerdings konnten einige auch größere Studien diese Ergebnisse nicht nachvollziehen (Gelber and Goldhirsch 1989, Ville et al. 1990, Low et al. 1991, Powles and Smith 1991, Mondini et al. 1997, Harlap et al. 1998). Eine 1994 publizierte Metaanalyse hatte bereits auf die Heterogenität der Ergebnisse hingewiesen, fand jedoch insgesamt einen günstigen Effekt bei Operation in der Lutelphase des Zyklus (Fentiman et al. 1994). Basierend auf der "Unopposed Estrogen Hypothesis" befindet sich der Tumor in der Follikelphase in einem die Proliferation und Metastasierung fördernden östrogenbetonten Milieu. Östrogene induzieren die Bildung von lokalen Wachstumsfaktoren und Proteasen (Lippman et al. 1986, Clarke and Sutherland 1990, Manni et al. 1990, Dickson and Lippman 1995, Oliver and Ingram 1995, Reid et al. 1996). Bei Endometriumzelllinien wurde unter Östrogeneinfluß eine Abnahme der Adhäsivität beobachtet (Moyer et al. 1979), welche wiederum eine Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren darstellt. Durch die Bildung proteolytischer Enzyme könnte dabei neben dem Proliferationsstimulus die Stromainvasion und damit eine Implantation von metastatischen Tumorzellen begünstigt werden (Cullen and Lippman 1989, Fisher et al. 1989, McGuire 1991). Andererseits supprimieren Östrogene in Zelllinien offenbar die Aktivität von Killer-Zellen und erleichtern auf diese Weise die Metastasierung (Hanna et al. 1982). Die Heterogenität der Ergebnisse zum optimalen Operationszeitpunkt wird mit Differenzen im Studiendesign und Therapiemanagement erklärt. Nach biologischen Gesichtspunkten scheint eine Beeinflussung des Metastasierungs geschehens durch ein östrogenbetontes hormonelles Milieu zum Zeitpunkt einer potentiellen Dissemination von Tumorzellen während der Operation denkbar (Astrow 1994, McCulloch and Choy 1994, Reid et al. 1996). Eine abschließende Beurteilung dieser Problematik wird jedoch erst nach Vorlage prospektiver Untersuchungen möglich sein.

*EGF-R, c-erbB-2, p53-Proteinexpression:* Die Tumorentstehung und -progression sind durch die Dysregulation von Wachstumsfaktoren, Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen gekennzeichnet. Steroidhormone sind eng in die Regulation dieser Prozesse einbezogen (Fernandez-Pol 1991, Olsson et al. 1991b, Schuchard et al. 1993, Chrysogelos et al. 1994, Dickson and Lippman 1995, Schneider and Jackisch 1998, Hurd et al. 1999). Die hormonelle Kontrolle der Protoonkogen-Expression kann über direkte Interaktionen des Hormon-Rezeptor-Komplexes mit dem Protoonkogen über HRE's (hormone responsive elements) verlaufen, die direkt auf den hormonregulierten Genen plaziert sind. Steroidhormone entfalten ihre Wirkung dabei im Sinne der Tumorpromotion durch die physiologische hormonabhängige Regulation von durch Mutation veränderten Protoonkogenen. Weiterhin könnten genetische Veränderungen im Rahmen der Tumorentstehung durch die gemeinsame Ausrichtung von Protoonkogenen und HRE's zu einer unphysiologischen hormonellen Kontrolle dieser Protoonkogene durch Steroidhormone führen. Außerdem ist die Möglichkeit der Insertion viraler HRE's durch Retroviren diskutiert worden. Viele Retroviren, die in Tiermodellen zur Tumorentstehung führen und auch humane Retroviren wie das HPV-16 haben HRE's in ihrem Genom (Pater 1988). Diese viralen Sequenzen könnten nach Integration in das Genom der Zelle der hormonellen Tumorpromotion dienen. Über die gleichen Regulationsketten ist neben der hormonell regulativen Stimulation auch die Unterbrechung der inhibitorischen Funktion von Tumorsuppressorgenen durch Steroidhormone möglich (Sekeris et al. 1991).

Bisher ist vorwiegend der Einfluß der Östrogene auf hormonelle Regulationsmechanismen der EGF-R- und c-erbB-2-Expression des Mammakarzinoms untersucht worden. Zur Bedeutung der Gestagene für diese Regulationsvorgänge ist hingegen noch immer wenig bekannt (Press et al. 1990, Read et al. 1990, Fernandez-Pol 1991, Gompel et al. 1996).

*EGF-R-Expression:* In der vorliegenden Studie wurden nach OH-Einnahme signifikant häufiger EGF-R-positive Mammakarzinome diagnostiziert. Die Anzahl EGF-R-positiver Mammakarzinome war dann signifikant höher, wenn der Beginn der OH-Einnahme mindestens 8 Jahre zurücklag und die Einnahme spätestens 5 Jahre vor der Diagnose beendet wurde.

Es ist bekannt, daß Östrogene beim Mammakarzinom die Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren wie IGF-II, TGF $\alpha$ , PDGF (Rozenfurt et al. 1985, Dickson et al. 1986a, Dickson et al. 1986b, Bates et al. 1988, Yee et al. 1988, Osborne et al. 1989) und von deren Rezeptoren wie EGF-R oder IGF-II/IGF-I-R (Mukku et al. 1985, Ghahary and Murphy 1989) erhöhen. Östrogene können dabei durch direkte ER-vermittelte Interaktionen mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren Einfluss auf spezifische Transkriptionsprozesse nehmen und führen auf diesem Wege zur Proliferationsstimulation (Dickson et al. 1986b, Bates et al. 1988, Osborne et al. 1989, Stewart 1992).

An Karzinomzelllinien wurde unter Gestagenen eine Stimulation der EGF-R-Expression bei gleichzeitiger antiproliferativer Wirkung beobachtet (Murphy et al. 1986). Auch im normalen Mammagewebe wurde zyklusabhängig eine höhere EGF-R-Expression in der lutealen Phase beobachtet. Gestagene sollen ihre in vitro beobachteten wachstumshemmenden Effekte auf Mammakarzinomzellen ebenfalls durch die Modulation der Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren auf transkriptioneller Ebene ausüben (Murphy et al. 1986, Koga et al. 1989, Gompel et al. 1996).

Im Gegensatz zu malignen Zellen kommt es im normalen Gewebe in der Regel zur positiven EGF-R-Expression bei erhaltener Steroidrezeptorexpression (Dittadi et al. 1993). Das Mammakarzinom zeigt dagegen überwiegend eine umgekehrte Korrelation zwischen ER- und EGF-R-Expression. Mammatumoren, die keine inverse Korrelation zwischen ER und EGF-R aufweisen, sind zumeist ER- und EGF-R-positiv nicht jedoch negativ für beide Rezeptoren. Diese Konstellation läßt vermuten, daß es vor Verlust der Hormonsensibilität zu einer Stimulation der EGF-R-Expression kommt oder aber, daß es sich dabei um eine klonale Selektion EGF-R-positiver Zellen im Rahmen der Tumorprogression handelt (Chrysogelos et al. 1994).

Die hier beobachtete signifikante Zunahme EGF-R-positiver Mammakarzinome ging mit einem signifikanten Anstieg der Häufigkeit stark ER-positiver Tumoren einher. Dieses Ergebnis ist mit der in vitro beschriebenen EGF-R Stimulation bei erhaltener oder erhöhter ER-Expression vergleichbar und könnte Ausdruck eines durch Gestagene ausgelösten Differenzierungsprozesses sein. Allerdings spricht die mäßig erhöhte Proliferationsrate der Tumoren eher gegen eine differenzierungsfördernde und proliferationshemmende Wirkung. Unter diesem Aspekt scheint eine Stimulation der EGF-R-Expression bei erhaltener ER-Expression vor Verlust der hormonellen Abhängigkeit des Tumors wahrscheinlicher zu sein.

*C-erbB-2-Proteinüberexpression:* In der vorliegenden Studie fanden sich keine signifikanten Differenzen in der Häufigkeit von c-erbB-2-positiven Tumoren in Abhängigkeit von der OH-Einnahme. Dieses Ergebnis änderte sich auch unter Berücksichtigung der verschiedenen Einnahmekarakteristika nicht.

Eine Studie mit ähnlicher Fragestellung beschrieb eine signifikant höhere Zahl von Amplifikationen des c-erbB-2 Gens bei Patientinnen, die frühzeitig vor Abschluß des 20. Lebensjahres OH eingenommen hatten. Für alle anderen Altersgruppen zeigten sich keine Veränderungen der c-erbB-2 Amplifikation nach OH-Einnahme. Die Dauer der Einnahme hatte als einziges erfaßtes Einnahmekriterium ebenfalls keinen Einfluß auf das Ergebnis (Olsson et al. 1991b).



Steroidhormone sind in der Lage die Expression von Protoonkogenen zu regulieren (Schuchard et al. 1993). Mit 40%-50% ist eine beträchtliche Zahl der c-erbB-2 exprimierenden Mammakarzinome auch ER-positiv (McCann et al. 1991). Nach unseren Ergebnissen waren 58.6% (58/99) der c-erbB-2-Protein überexprimierenden Tumoren sowohl ER-positiv als auch c-erbB-2-positiv. Estradiol beeinflusst in ER-positiven Zelllinien die Expression spezifischer Gene und ihrer Genprodukte wie TGF $\alpha$ , IGF I, PDGF, c-myc oder c-fos, die an der Proliferationsregulation beteiligt sind (Dickson and Lippman 1986, Lamph et al. 1988, Cowley et al. 1989, Sekeris et al. 1991, Hurd et al. 1997). In Zellkulturen hemmt Estradiol die c-erbB-2-Expression durch Beeinflussung von Transkriptionsvorgängen, was zur Reduktion der mRNA und Proteinexpression führt (Dati et al. 1990, Read et al. 1990, De Bortoli et al. 1992, Russell et al. 1992, Antoniotti et al. 1994). Umgekehrt führt die Liganden-spezifische Aktivierung des c-erbB-2 zur Downregulation des ER und ist mit einer Proliferationshemmung und Differenzierungsinduktion verbunden (Dati et al. 1990, Peles et al. 1992, Lupu and Lippman 1993).

Die physiologische Rolle des c-erbB-2 besteht wahrscheinlich in der Proliferationsregulation und Differenzierungsinduktion (Dati et al. 1990, Marth et al. 1992, Lupu and Lippman 1993). Bei Überexpression des c-erbB-2 kommt es dagegen zur Proliferations- und Transformationsinduktion (Bradbury et al. 1993, Dougall et al. 1993). Möglicherweise besitzen ER-positive Tumoren in diesem Prozeß noch eine gewisse Fähigkeit, ihre c-erbB-2-Expression zu regulieren (Lupu and Lippman 1993). Zellen mit ER- und c-erbB-2-Expression stehen somit zwei alternative Mechanismen zur Proliferationsregulation zur Verfügung. Eine Downregulation der ER-mRNA und der Estradiolbindung am ER bei Tumoren mit c-erbB-2-Proteinüberexpression kann zum Verlust der Abhängigkeit von östrogenen Regulationsmechanismen und zu einem Wachstumsvorteil im östrogenfreien Medium führen. Diese c-erbB-2-positiven Tumoren besitzen damit ein hohes Maß an Flexibilität bei Änderungen des hormonellen Tumormilieus (Dati et al. 1990, Lupu and Lippman 1993, Pietras et al. 1995)

Gestagene sollen im Gegensatz zu Östrogenen zu einer Zunahme der c-erbB-2-Proteinexpression durch Aktivierung von Transkriptionsprozessen führen (Taverna et al. 1994). Allerdings sind auch gegensätzliche Untersuchungen bekannt, nach denen Gestagene keinen Effekt auf die c-erbB-2 mRNA- und Proteinexpression in Mammakarzinom-Zelllinien haben (Read et al. 1990)

Auch physiologische Spiegel endogener Steroidhormone beeinflussen möglicherweise die c-erbB-2-Expression im normalen Mammagewebe. So wurde eine stärkere c-erbB-2-Expression während der lutealen Phase des Zyklus im Vergleich zur folliculären Phase beobachtet (Gompel et al. 1996). In anderen Untersuchungen fanden sich jedoch keine Veränderungen der c-erbB-2-Proteinexpression in Abhängigkeit von zyklusbedingten endogenen Hormonschwankungen (Press et al. 1990).

*p53-Proteinexpression:* Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ergab sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der OH-Einnahme und der p53-Proteinexpression beim Mammakarzinom in vivo. Eine andere Arbeitsgruppe fand nach kürzerem Follow-up signifikant höhere p53-Expressionsraten in Tumoren von Patientinnen, die OH bis zur Diagnose eingenommen hatten. Auch bei länger zurückliegender OH-Einnahme war diese Korrelation noch nachweisbar (van der Kooy et al. 1996).

Die Rolle der Steroidhormone für die Regulation der Expression des Tumorsuppressorgens p53 ist noch immer weitestgehend unklar (Hurd et al. 1995, van der Kooy 96, Hurd et al. 1997). In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß normale p53-Spiegel in T47D Zellen nur unter Estradioleinfluß aufrechterhalten werden. Die Behandlung der Zellen mit synthetischen Gestagenen führte dagegen zu einer Downregulation von p53 begleitet von einer Abnahme der PR (Hurd et al. 1995). Die beobachtete p53-Expression in Zellkulturen korrelierte dabei mit der Proliferationsaktivität der untersuchten Zellen (Hurd et al. 1997).

## **Gestagenkomponenten und Tumorcharakteristika**

Die biologische Wirkung synthetischer Gestagene regelt sich über eine Vielzahl von Steroidrezeptoren. In Abhängigkeit vom Gestagen kommt dabei deren unterschiedliche Affinität gegenüber Androgen-, Progesteron-, Östrogen- und Glucocorticoidrezeptoren zum Tragen. Die organspezifische Wirkung der Gestagene unterliegt somit einer komplexen Regulation verschiedener Rezeptoren, wobei bei einigen synthetischen Gestagenen die Affinität gegenüber dem eigenen Rezeptor geringer ist als gegenüber anderen Steroidrezeptoren (Luthy et al. 1988, Poulin et al. 1990, Hackenberg et al. 1993). In den 70iger Jahren hatte die Tatsache, daß Chlormadinonacetat (CMA) als 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteronabkömmling nicht jedoch die 19-Nortestosteronderivate bei Beagle-Hunden eine Stimulation des Wachstums von benignen und auch malignen Mammatumoren verursachte, dazu geführt, daß CMA in zahlreichen Ländern vom Markt genommen wurde. Diese Ergebnisse konnten jedoch durch nachfolgende epidemiologische und experimentelle Studien nicht nachvollzogen werden (Nischan et al. 1984, Inano et al. 1999). Dennoch bleiben noch immer offene Fragen zur differenzierten Wirkung unterschiedlicher Gestagenkomponenten auf biologische Regulationsmechanismen des Mammakarzinoms.

### *Gestagenkomponenten und histomorphologische Faktoren*

In der vorliegenden Studie fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den histologischen Tumortypen von Patientinnen, die OH mit unterschiedlichen Gestagenkomponenten verwendet hatten. Auch hinsichtlich der Tumorgröße und des LK-Status gab es keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom eingenommenen Präparat. Allerdings hatten Patientinnen nach überwiegender und Ersteinnahme von NETA-haltigen kombinierten OH und auch nach Einnahme von CMA-haltigen OH signifikant häufiger schlecht differenzierte Tumoren.

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß eine hormonelle Exposition in Abhängigkeit vom eingesetzten Gestagen zur Induktion von Tumoren mit unterschiedlicher Histologie und Hormonsensitivität führen kann. So kam es in einer entsprechenden Untersuchung bei der Applikation von Progesteron fast ausschließlich zur Induktion lobulärer Mammakarzinome, während nach MPA überwiegend duktale Karzinome auftraten (Kordon et al. 1993).

Über eine Häufung schlecht differenzierter Karzinome nach OH-Einnahme wurde in nur einer Studie berichtet, allerdings verschwand dieses Ergebnis nach Altersstandardisierung. Es wurden keine Angaben zum Präparat oder zu den OH-Einnahmekriterien gemacht (Miller N et al. 1989). Umfassende Studien zu dieser Thematik wurden bisher nicht publiziert.

Der negative Einfluß von nur zwei OH-Untergruppen auf das histologische Grading könnte ebenso ein zufälliges Ergebnis darstellen, wobei die häufig diskutierte Subjektivität und eingeschränkte Reproduzierbarkeit des histologischen Gradings als zusätzlicher Faktor in Erwägung gezogen werden sollte (Stenkvist et al. 1979, Bässler et al. 1992, Dalton et al. 1994, Kronqvist et al. 1995, Kronqvist et al. 1997).

### *Gestagenkomponenten und zellulär exprimierte Faktoren*

*ER/PR-Expression:* Nach OH-Einnahme wurde eine signifikante Zunahme der Häufigkeit stark ER-positiver Mammakarzinome beobachtet. Diese Zunahme der ER-Expression war unabhängig von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten zu verzeichnen. Es fand sich keine signifikante Veränderung der PR-Expression in Abhängigkeit von der Einnahme unterschiedlicher Gestagenkomponenten. Nach der Einnahme von LNG- und NETA-haltigen kombinierten OH zeigte sich eine deutliche Zunahme stark PR-positiver Tumoren in je einer Untergruppe, ohne daß dieses Ergebnis statistische Signifikanz erlangte.

Der Gestagenanteil kombinierter OH bewirkt am Mammakarzinom möglicherweise eine Downregulation der ER bei gleichbleibender PR-Expression (Williams et al. 1991). Insbesondere 19-Nortestosteronderivaten wird jedoch neben ihrer gestagenen Wirkung auch eine gewisse östrogene Aktivität zugeschrieben (Jeng and Jordan 1991, Jeng et al. 1992, Catherino et al.

1993, Kloosterboer et al. 1994, Schoonen et al. 1995). LNG und NETA haben durch Interaktionen mit dem ER die Potenz, in hormonelle Regulationsmechanismen einzugreifen. Sie können somit über den ER wiederum eine Induktion der östrogenabhängigen Synthese des PR-Proteins bewirken und ihre gestagenen Effekte an der Mamma und anderen Geweben aufrecht erhalten. Dieser Mechanismus wird insbesondere für die kontrazeptive Wirkung der reinen Gestagenpräparate beschrieben (Jordan et al. 1992, Catherino et al. 1993). Die Exposition gegenüber östrogen wirkenden Substanzen kann nach in vitro Untersuchungen sowohl zur Downregulation des ER als auch zu einer prolongierten Stimulation der ER-Expression über einen längeren Expositionszeitraum führen (Pink and Jordan 1996). Aus den vorliegenden Ergebnissen ergab sich jedoch kein Anhalt für eine differenzierte Wirkung einzelner Präparate auf die ER-Expression. Ebenso wenig war ein spezifischer Einfluß verschiedener Gestagenkomponenten auf die PR-Expression beim Mammakarzinom zu beobachten. Die Erhöhung der PR-Expression in vereinzelt Untergruppen war nicht signifikant und scheint am ehesten ein zufälliges Ergebnis darzustellen. Insgesamt sind diese Beobachtungen mit der in vitro und in vivo von verschiedenen Untersuchern beobachteten konstanten PR-Expression am Mammakarzinom unter OH vereinbar (Williams et al. 1991). Auch im normalen Zyklus der Frau bleibt die PR-Expression über den gesamten Zyklus relativ konstant und zeigt keine Abhängigkeit von endogenen Hormonspiegeln (Williams et al. 1991, Battersby et al. 1992, Soderquist et al. 1993). Handelt es sich bei der Zunahme hoch PR-positiver Mammakarzinome in einigen Untergruppen allerdings um einen echten Effekt, so könnte dieser durch eine PR-Stimulation infolge der östrogenen Potenz der verwendeten 19-Nortestosteronderivate verursacht sein. Für CMA dagegen ist ein entsprechender Wirkungsmechanismus aufgrund des unterschiedlichen Metabolismus nicht zu erwarten.

*PCNA-Expression:* Nach der Einnahme von CMA-, LNG- und auch NETA-haltigen Kombinations- und Sequenzpräparaten wurde in mindestens einer Untergruppe pro Präparat eine signifikante Zunahme des Risikos für das Auftreten mäßig proliferierender Tumoren gefunden. Ähnliche Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Gestagenkomponenten auf die Proliferation des Mammakarzinoms in vivo sind bisher nicht publiziert worden. Eine Studie zur Wirkung von Levonorgestrel- und Desogestrel-haltigen OH auf das normale Mammagewebe, beschrieb signifikant höhere Ki67-Proliferationsraten unter OH-Einnahme. Ein Unterschied in den Proliferationsraten zwischen beiden Gestagenkomponenten konnte dagegen nicht aufgezeigt werden (Soderquist et al. 1998).

Sowohl für 19-Nortestosteronderivate als auch für Progesteronabkömmlinge sind sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende Effekte auf das Mammakarzinom beschrieben worden (Clarke and Sutherland 1990, Coletta et al. 1991, Jeng and Jordan 1991, Jeng et al. 1992, van der Burg et al. 1992). In vitro Studien an etablierten Mammakarzinom-Zelllinien zeigten, daß 19-Nortestosteronderivate in der Lage sind, ER-vermittelte proliferationsstimulierende Effekte auszulösen (Jeng et al. 1992, Catherino et al. 1993, Jordan et al. 1993, Schoonen et al. 1995). In einer der Untersuchungen wurden dabei für Norethinodrel und Norethindron stärker proliferationsfördernde Effekte beschrieben als für Norgestrel (Jeng et al. 1992). Norethisteron zeigte in Displacement-Untersuchungen eine höhere Bindungsaffinität am ER als LNG, was mit dessen stärkerer Potenz zur Proliferationsstimulation in vitro übereinstimmt (Schoonen et al. 1995). Häufig wurde jedoch in experimentellen Studien mit unphysiologisch hohen Gestagendosierungen gearbeitet, was die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die in vivo Situation erschwert (Rutteman 1992, Kloosterboer et al. 1994, Schoonen et al. 1995, Hargreaves et al. 1998). Im Gegensatz dazu haben Studien zum Östrogenmetabolismus am normalen Mammagewebe gezeigt, daß 19-Nortestosteronderivate die Estronsulfatase und damit die Bildung von Estradiol hemmen. Progesteron dagegen stimuliert die Aktivität des Enzyms (Prost-Avalet et al. 1991, Soderquist et al. 1994). Nach diesen Ergebnissen könnte den 19-Nortestosteronderivaten ein gewisser proliferationshemmender Effekt durch die Suppression der Estradiolsynthese zugeschrieben werden. Übereinstimmend damit soll die Kombinationstherapie mit Östrogenen und Gestagenen an Mammakarzinomzelllinien im Gegensatz zur Gestagenmonotherapie überwiegend proliferationshemmende Wirkung haben. Dieser Effekt wurde für die meisten

19-Nortestosteronderivate mit Ausnahme des Norethisterons beobachtet (Schoonen et al. 1995), konnte jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse in vivo nicht nachvollzogen werden.

*EGF-R, c-erbB-2, p53-Proteinexpression:* Nach OH-Einnahme war das Risiko für das Auftreten EGF-R-positiver Tumoren signifikant erhöht. Dieser Effekt zeigte keine Abhängigkeit von der Einnahme spezifischer Gestagenkomponenten.

Es zeigten sich keine Veränderungen in der c-erbB-2- und der p53-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten.

Somit ergibt sich aus dieser Untersuchung kein Hinweis auf eine selektive Wirkung verschiedener Präparate auf die Expression der analysierten zellulär exprimierten Proteine. Publierte Studien zur spezifischen Wirkung verschiedener Gestagene auf das normale Mammagewebe und auf prognostische Faktoren beim Mammakarzinom beschränkten sich bisher auf die Untersuchung der Steroidrezeptoren und Proliferationsregulation, so daß zur Problematik der Wachstumsfaktoren und Protoonkogene keine vergleichbaren Analysen vorliegen.

*Zusammenfassend* war die OH-Einnahme, sofern sie bereits vor der Diagnose des Mammakarzinoms beendet wurde, mit einer signifikanten Zunahme der Anzahl stark ER-positiver Tumoren verbunden. Allerdings war auch das Risiko für das Auftreten von Tumoren mit mittlerer Proliferationstendenz und positiver EGF-R-Expression nach OH-Einnahme erhöht. Dieser Einfluß auf die Expression der ER, des PCNA und EGF-R war nicht vom verwendeten Präparat abhängig.

Erfolgte die OH-Einnahme dagegen bis zur Diagnose des Karzinoms wurden häufiger Mammakarzinome mit LK-Befall und ungünstigem histologischen Grading diagnostiziert. Außerdem war auch das Risiko für die Diagnose sehr hoch proliferierender Tumoren deutlich erhöht. Der oben beschriebene positive Effekt auf die ER-Expression war für diese Patientengruppe nicht nachweisbar.

Ursächlich könnte die Exposition zu einem biologisch sensitiven Zeitpunkt eine klonale Selektion von Mammakarzinomzellen mit Ausprägung eines bestimmten Phänotyps bewirkt haben, dessen Merkmale auch bei Progression des Karzinoms erhalten bleiben. Die Stimulation der EGF-R-Expression bei erhaltener oder erhöhter ER-Expression könnte allerdings auch eine Reaktion der Karzinomzellen auf die Veränderung des hormonellen Milieus nach Beendigung der OH-Einnahme darstellen.

## **OH und Prognose**

### *OH-Einnahmedauer*

Die OH-Einnahme führte bei einer Einnahmedauer von mehr als fünf Jahren zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose der Patientinnen mit Mammakarzinom. Noch zehn Jahre nach Beendigung der Einnahme war für diese Patientinnen, das Risiko am Mammakarzinom zu sterben, um 40% geringer als für Patientinnen, die niemals OH eingenommen hatten (HR 0.60). Dieser Effekt war unabhängig von allen histomorphologischen und tumorbiologischen Prognosefaktoren nachweisbar.

Die günstigere Prognose der Patientinnen, die OH eingenommen haben, legt die Vermutung nahe, daß die exogene Hormonzufuhr zur Beeinflussung von pathogenetischen Regulationsmechanismen führt, deren Auswirkungen am Erkrankungsverlauf sichtbar werden. Eine Vorverschiebung des Diagnosezeitpunktes durch eine engmaschigere ärztliche Betreuung der Patientinnen mit OH-Einnahme kann dagegen weitgehend ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede in der Tumorgöße und im LK-Status zugunsten der Patientinnen, die OH eingenommen hatten, nachweisbar waren.

Einige der ersten Studien zum Einfluß von OH auf die Prognose des Mammakarzinoms beschrieben bessere Überlebensraten für Patientinnen, die vor der Diagnose des Tumors OH eingenommen hatten (Spencer et al. 1978, Vessey et al. 1979, Matthews et al. 1981, Rosner and Lane 1986). Dabei verschwand der Überlebensvorteil nach OH-Einnahme in einer Studie, nachdem die Patientinnen ein längeres Follow-up durchlaufen hatten (Vessey et al. 1983,

Greenberg et al. 1985). Auch in späteren Untersuchungen zeigte die OH-Einnahme zumeist keinen signifikanten Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms (Millard et al. 1987, Kay and Hannaford 1988, Lees et al. 1989, Vessey et al. 1989, Sauerbrei et al. 1998). In einer skandinavischen Studie hatten Patientinnen, die vor der ersten Lebendgeburt OH eingenommen hatten, schlechtere Überlebensraten gegenüber anderen Patientinnen (Ranstam et al. 1991). Bessere Überlebensraten nach OH-Einnahme wurden in nur zwei aktuelleren Studien beschrieben, allerdings beschränkte sich der Überlebensvorteil in diesen Untersuchungen auf kleinere Untergruppen (Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996).

Die überwiegende Anzahl der bisher durchgeführten Untersuchungen war jedoch aufgrund der relativ kleinen Fallzahlen nur eingeschränkt aussagefähig.

Die Studien mit einer Fallzahl von mehr als 300 Patientinnen und einem Follow-up zwischen 4 und 5 Jahren fanden entweder keine signifikante Beziehung zwischen OH-Einnahme und Prognose des Mammakarzinoms (Sauerbrei et al. 1998) oder beschrieben eine bessere Prognose für Patientinnen mit kurzer OH-Einnahmedauer oder langem Abstand der letzten Einnahme zur Diagnose (Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996). Eine Verlängerung der Dauer der OH-Einnahme zeigte in den erwähnten Arbeiten keinen Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung (Rosner and Lane 1986, Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996). Die „Royal College of General Practitioners Oral Contraceptive Study“ zeigte auch nach 25jährigem Follow-up keine Differenzen in den Mortalitätsraten für das Mammakarzinom in Abhängigkeit von der OH-Einnahme und verschiedenen erfaßten Einnahmekriterien (Beral et al. 1999).

#### *Abstand der OH-Einnahme*

Der zeitliche Bezug zwischen OH-Einnahme und Diagnose gibt wichtige Anhaltspunkte für die Untersuchung des Einflusses von OH auf die Biologie des Mammakarzinoms.

In der vorliegenden Studie hatte der Abstand der ersten OH-Einnahme zur Diagnose einen signifikanten Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms. So war bei erstmaliger OH-Einnahme im 9. bis 11. Jahr vor der Diagnose, das Risiko am Mammakarzinom zu sterben, um mehr als 50% reduziert (HR 0.49). Auch bei noch früherer Einnahme war das Sterberisiko signifikant geringer, wobei der günstige Effekt mit der Zunahme des Zeitintervalls wieder abnahm. Dagegen zeigte der Abstand der letzten OH-Einnahme zur Diagnose keinen signifikanten Einfluß auf die Prognose.

Der Zusammenhang zwischen dem Abstand der OH-Einnahme zur Diagnose und der Prognose der Erkrankung wurde in nur drei früheren Studien untersucht (Rosner and Lane 1986, Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996). Das Follow-up in diesen Untersuchungen erreichte maximal 5 Jahre. Zwei dieser Studien berichteten über einen ähnlich positiven, aber statistisch nicht signifikanten, Einfluß von OH auf die Prognose des Mammakarzinoms bei OH-Einnahme lange vor der Diagnose (Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996). Dabei war die Reduktion des Sterberisikos am deutlichsten, wenn die erste Einnahme 10 bis 14 Jahre vor der Diagnose stattgefunden hatte (Holmberg et al. 1994) oder wenn der Abstand zur Diagnose bei erster Einnahme mindestens 20 Jahre oder bei letzter Einnahme mindestens 15 Jahre betrug (Wingo et al. 1996).

#### *Zeitraum der OH-Einnahme*

Patientinnen, die OH über einen kürzeren Zeitraum (3 bis 5 Jahre) eingenommen und die Einnahme erst innerhalb der letzten 2 Jahre vor der Diagnose beendet hatten, zeigten eine signifikant schlechtere Prognose (HR 2.3 bis 3.8) als Patientinnen, die niemals OH eingenommen hatten. Keine der Studien, die den prognostischen Einfluß der OH-Einnahme in Abhängigkeit vom Abstand der Einnahme untersucht haben, beschrieb bisher eine solche Beeinflussung der Prognose des Mammakarzinoms bei zeitlich begrenzter OH-Einnahme bis zur Diagnose oder unmittelbar zuvor (Rosner and Lane 1986, Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996).

Bei einer OH-Einnahmedauer von mehr als 5 Jahren war unabhängig davon, ob die Einnahme bis zur Diagnose oder bereits früher erfolgt war, erneut der beschriebene günstige Effekt der OH-Einnahme auf die Prognose des Mammakarzinoms nachweisbar. Darüberhinaus war die OH-Einnahme jedoch auch bei einer kurzen Einnahmedauer von bis zu 2 Jahren mit einer

signifikanten Reduktion des Sterberisikos verbunden, sofern die Einnahme mehr als 5 Jahre vor der Diagnose erfolgt war.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß möglicherweise die OH-Einnahme zu einem bestimmten biologisch sensiblen Zeitpunkt bedeutender für die Prognose des Mammakarzinoms ist, als die Dauer der Einnahme. Nach den beschriebenen Ergebnissen müßte dieser Zeitpunkt mehr als 5 Jahre vor der Diagnose des Mammakarzinoms liegen.

Eine weitere Eingrenzung der möglichen Einnahmezeiten zeigte, daß der beobachtete Effekt der OH-Einnahme am deutlichsten war, wenn die OH-Einnahme den 4 Jahre umfassenden Zeitraum vom 5.-8. Jahr vor der Diagnose einschloß. Generell hatten alle Patientinnen, die OH über mehrere Jahre in irgendeinem zeitlichen Zusammenhang zu dieser genannten Kernzeit genommen hatten, eine signifikant bessere Prognose als Patientinnen, die keine OH eingenommen hatten.

Die wenigen bisher publizierten Studien zu dieser Problematik beschränken sich in ihrer Darstellung auf Untersuchungen zur Einnahmedauer und zum Abstand der letzten und ersten OH-Einnahme. Die beiden Untersuchungen, die im Ansatz ähnlich komplexe Zusammenhänge vermuten lassen, verzichteten aufgrund ihres begrenzten Datenmaterials auf die Erarbeitung einer biologischen Hypothese (Holmberg et al. 1994, Wingo et al. 1996).

Eine kürzlich publizierte Studie zur Prognose des postmenopausalen Mammakarzinoms nach Östrogen-Replacementtherapie beschrieb nach 12 Jahren Follow-up eine signifikant bessere Prognose für LK-positive Patientinnen, die bis zur Diagnose eine Hormonsubstitution erhalten hatten (Schairer et al. 1999). Eine länger zurückliegende Hormonsubstitution hatte keinen Einfluß auf das Überleben. Angaben zur Dauer der Hormontherapie bei Substitution bis zur Diagnose wurden nicht gemacht.

#### *OH, Tumorbologie und Prognose*

*Zusammenfassend* war die Prognose für Patientinnen, die OH eingenommen hatten, gegenüber der von Patientinnen ohne OH-Einnahme signifikant besser:

wenn OH über mehr als 5 Jahre eingenommen wurden und/oder

wenn die erste Einnahme vor mehr als 8 Jahren erfolgte und/oder

wenn die OH-Einnahme den Kernzeitraum vom 5. bis 8. Jahr vor der Diagnose erreichte.

Der Überlebensvorteil war dann am deutlichsten wenn die OH-Einnahme diesen Zeitraum vollständig umfaßte. Dagegen war die Prognose der Patientinnen nach

OH-Einnahme signifikant schlechter wenn die Einnahme nur 2 bis 5 Jahre umfaßte und bis zur Diagnose erfolgte.

Diese Ergebnisse finden ihre Widerspiegelung in der Ausprägung einiger der histomorphologischen und tumorbologischen Charakteristika der untersuchten Karzinome.

Die Tumoren waren nur bei OH-Einnahme bis zur Diagnose signifikant häufiger

LK-positiv, schlecht differenziert und zeigten eine sehr hohe Proliferationsaktivität.

Alle anderen Patientinnen hatten nach OH-Einnahme im Vergleich zu denen ohne

OH-Einnahme signifikant häufiger stark ER-positive Tumoren. Allerdings waren diese Tumoren

auch signifikant häufiger EGF-R-positiv und zeigten eine mäßig erhöhte Proliferationstendenz im

Vergleich zu Tumoren, die bei Patientinnen ohne

OH-Einnahme auftraten.

Eine so deutliche prognostische Differenzierung zwischen Unterguppen mit unterschiedlicher Einnahmedauer oder verschiedenen langen Abständen der Einnahme zur Diagnose, wie sie in

Abhängigkeit von der OH-Einnahme getroffen werden konnte, war aus der Verteilung der

Tumorcharakteristika nicht ersichtlich. Die Ursache liegt vermutlich in der unvermeidbaren

Überschneidung verschiedener Untergruppen. So können Patientinnen, die OH nur über einen

kurzen Zeitraum eingenommen haben, diese OH erstmalig/letztmalig sowohl lange als auch

kurz vor der Diagnose verwendet haben. Damit würde ein Teil dieser Patientinnen der

prognostisch günstigeren und der andere Teil der prognostisch ungünstigeren Gruppe zugehörig sein.

Zur weiteren Klärung dieser Zusammenhänge wäre eine noch subtilere Aufschlüsselung nach Zeitintervallen der OH-Einnahme erforderlich. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl in diesen

Untergruppen, ist jedoch eine Aussage hinsichtlich der Tumorcharakteristika in dieser Aufschlüsselung nicht mehr möglich.

Die prognostische Bedeutung der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose läßt auf eine frühzeitige hormonelle Beeinflussung bestimmter Regulationsmechanismen mit entsprechender Bedeutung für die Phase des okkulten Tumorwachstums und die beginnende Metastasierung schließen. Auch Patientinnen, die OH über mehr als 5 oder sogar mehr als 10 Jahre eingenommen und die Einnahme erst bei Diagnosestellung beendet hatten, wiesen ganz im Gegensatz zu Patientinnen mit Kurzeiteinnahme bis zur Diagnose, eine bessere Prognose auf als die ohne OH-Einnahme.

Der hoch positive ER-Status dieser Tumoren spricht für deren erhaltene Sensibilität gegenüber Steroidhormonen. Möglicherweise führt der hormonelle Stimulus in einer biologisch sensiblen Phase der Tumorentstehung zur Ausprägung bestimmter biologischer Charakteristika, die bis zur Karzinomdiagnose aufrecht erhalten werden. Eine solche Selektion eines definierten Phänotyps durch das biologische Milieu, in welchem sich der Tumor entwickelt, wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen als experimentelle Hypothese diskutiert (Olsson 1989).

Andererseits könnte auch die Beendigung der Hormonzufuhr zur Verschiebung des Tumormilieus führen, was bei hormonabhängigen Tumoren zunächst durch eine Reduktion des bisherigen Proliferationsstimulus gekennzeichnet wäre. Dieser Einschnitt wirkt möglicherweise hemmend auf die Metastasierungspotenz der Tumoren oder die Ausbreitung bereits gesetzter Metastasen. Damit könnte der Hormonentzug durch eine Beeinflussung des lokalen und peripheren Tumorwachstums zur Verbesserung der Prognose des Mammakarzinoms beitragen. Dieses Phänomen ist als Rebound Effekt aus der adjuvanten hormonellen Therapie bekannt (Howell et al. 1992, Reid et al. 1996).

### **Gestagenkomponenten und Prognose**

Bei Differenzierung der OH-Einnahme hinsichtlich der in den Präparaten enthaltenen Gestagenkomponenten, zeigte es sich, daß der beobachtete positive Effekt auf die Prognose des Mammakarzinoms im wesentlichen auf die Einnahme NETA-haltiger OH beschränkt war. Der Anteil von NETA-haltigen unter den übrigen OH war allerdings im 5.-8. Jahr vor der Diagnose signifikant höher als für alle anderen Einnahmezeiten ( $p < 0.01$ ). Patientinnen, die NETA-haltige OH verwendet hatten, wiesen signifikant bessere Überlebensraten auf, unabhängig davon ob das Präparat zuerst, ausschließlich, überwiegend oder niemals eingenommen wurde. Diese Wirkung auf die Prognose war unabhängig von allen anderen prognostischen Faktoren nachweisbar. Das Ergebnis war auch nicht durch die Verteilung der histomorphologischen Befunde erklärbar. Nach der Einnahme NETA-haltiger OH waren die Tumoren sogar häufiger schlecht differenziert und LK-positiv. Dieses scheinbar paradoxe Phänomen, das bessere Überlebensraten für schlecht differenzierte Tumoren nach OH-Einnahme beschreibt, wurde schon in anderen Untersuchungen beschrieben (Wingo et al. 1996). Möglicherweise reagieren diese hoch proliferativen Tumoren besser auf eine adjuvante Therapie, wie es für den Effekt der adjuvanten Chemotherapie bei schlecht differenzierten Ovarialkarzinomen bekannt ist (Hartmann et al. 1992). Für die Gesamtgruppe der Patientinnen erlangte die adjuvante Chemotherapie jedoch keine Bedeutung für die Prognose der Erkrankung.

Der starke antigonadotrope Effekt der 19-Nortestosteronderivate führt zur Hemmung der ovariellen Östrogensekretion (Kuttann et al. 1978). Nach therapeutischer Gestagengabe bei benignen Mammaveränderungen oder Mastodynien wurde nur für Patientinnen, die 19-Nortestosteronderivate eingenommen hatten, eine Reduktion des Mammakarzinomrisikos beschrieben (Plu-Bureau et al. 1994). Im Gegensatz dazu war nach MPA ein geringer Risikoanstieg in einigen Untergruppen der „WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives“ zu verzeichnen (WHO 1991).

Veränderungen des Mammakarzinomrisikos nach Einnahme verschiedener Gestagenderivate könnten durchaus Ausdruck spezifischer gestagener Einflüsse auf die Tumorbiologie sein. Eine solche Beeinflussung des biologischen Verhaltens der Tumoren würde sich potentiell im Verlauf der Erkrankung niederschlagen. Untersuchungen der „UK National Case-Control Study Group“

zum Thema OH und Mammakarzinomrisiko zeigten ebenfalls einen protektiven Effekt von reinen Gestagenpräparaten (UK 1989). Insgesamt jedoch erlauben die Ergebnisse der wenigen Studien, die umfangreich genug waren, um spezifische Angaben für einzelne Präparate zu machen, bisher keine schlüssige Interpretation zur Gestagenwirkung im Hinblick auf die Prognose des Mammakarzinoms (Vessey et al. 1983, Staffa et al. 1992).

Biologisch sind 19-Nortestosteronderivate durch ihre hohe Affinität zu Progesteron- und Androgenrezeptoren gekennzeichnet (Staffa et al. 1992). Außerdem vermitteln sie über ihre Metabolisierungsprodukte östrogene Wirkungen am ER (Reed et al. 1990, Catherino et al. 1993), wobei die östrogene Partialwirkung speziell für NETA auch klinisch nachgewiesen werden konnte (Reed et al. 1990). Dennoch ist gegenwärtig nicht eindeutig zu klären, warum sich nach der Einnahme NETA-haltiger OH eine so deutliche Verbesserung der Prognose des Mammakarzinoms zeigt, während nach der Ersteinnahme und überwiegenden Einnahme LNG-haltiger OH eher eine Erhöhung des Risikos für den Tod am Mammakarzinom zu beobachten war, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichte. Möglicherweise ist die bessere Prognose nach der Einnahme NETA-haltiger OH zumindest teilweise Ausdruck des günstigen Effekts der OH-Einnahme allgemein, da diese Untergruppe unter den Patientinnen mit OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose die zahlenmäßig größte Fraktion bildet.

## **Epidemiologische Risikofaktoren und Prognose**

### *Reproduktive Faktoren und Prognose (Schwangerschaft, Geburt, Stillen)*

Hormonelle Veränderungen durch Schwangerschaft und Stillen können ebenso wie die Einnahme von OH potentiell jedes Stadium der Karzinogenese bis zur Tumorprogression beeinflussen und so mit der biologischen Wirkung von OH interferieren. Aus diesem Grunde wäre es wünschenswert, daß Studien zur Untersuchung des Einflusses von OH immer auch hormonell-reproduktive Variablen berücksichtigen (Grant et al. 1996). Aus methodischen Gründen wird diese Forderung jedoch nur selten erfüllt.

Zur Charakterisierung des Reproduktionsverhaltens wurde der Einfluß von Schwangerschaft, Geburten und Stillen untersucht. Alle der hier analysierten Faktoren hatten einen signifikanten Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms, der sich unabhängig von den etablierten histomorphologischen und tumorbiologischen Faktoren darstellen ließ. Die Variablen zu Schwangerschaften und Stillen zeigen dabei naturgemäß enge Korrelationen. Das Alter bei der 1. Lebendgeburt/1. Stillen

(HR 0.50/0.48) hatte einen stärkeren Einfluß auf die Prognose der Patientinnen mit Mammakarzinom als die Anzahl der Lebendgeburten/gestillten Kinder. Dabei wurde die biologische Wirkung der Schwangerschaften/Geburten offenbar durch das Stillen verstärkt.

Interessanterweise ergab sich hinsichtlich des prognostischen Einflusses der Parität eine Teilung in 2 Gruppen unterschiedlicher Prognose. Patientinnen mit 1 bis 3 Lebendgeburten hatten eine bessere und solche mit 4 und mehr Lebendgeburten eine schlechtere Prognose als Patientinnen ohne Lebendgeburt (HR 0.70; HR 1.92). Dieser Effekt war für beide Gruppen deutlicher nachweisbar, wenn die Anzahl der Kinder, die nach der Geburt auch gestillt wurden, in der Analyse berücksichtigt wurde. Der günstige prognostische Einfluß von bis zu 3 Lebendgeburten wurde sogar erst bei Berücksichtigung des Stillverhaltens signifikant. In der hier diskutierten Studie zeigte sich eine Verstärkung sowohl des positiven (bis 3 Lebendgeburten) als auch des negativen Effekts (4 und mehr Lebendgeburten) durch das Stillen nach der Geburt

(HR 0.69; HR 2.88). Auch andere Autoren berichteten über eine solche Verstärkung des von ihnen analysierten negativen Effekts bei Multiparität, wenn die Patientinnen gestillt hatten (Lees et al. 1989).

Mehrere Studien zum prognostischen Einfluß von Schwangerschaft und Geburt beschrieben ungünstigere Prognosen für Mehrgebärende im Vergleich zu Nulliparae (Black et al 1983, Mohle-Boetani et al. 1988, Lees et al. 1989, Lehrer et al. 1992, Korzeniowski and Dyba 1994, Orr et al. 1995). Untersuchungen, die die Anzahl der Schwangerschaften/Lebendgeburten erfaßt hatten, fanden häufig eine Verschlechterung der Prognose mit Zunahme dieser Ereignisse



(Lehrer et al. 1992, Korzeniowski and Dyba 1994, Orr et al. 1995). In anderen, auch umfangreicheren, Studien konnten diese Ergebnisse wiederum nicht nachvollzogen werden (Ewertz et al. 1991, Nair et al. 1993, Kroman et al. 1998). Gegensätzliche Ergebnisse, wie sie hier für Patientinnen mit bis zu 3 Lebendgeburten und denen mit 4 und mehr Lebendgeburten beschrieben wurden, sind durch andere Untersucher bisher nicht beobachtet worden. Lediglich eine sehr frühe Untersuchung fand univariat eine schlechtere Prognose bei Patientinnen mit 5 und mehr Geburten, wogegen sich die Prognose der anderen Patientinnen nicht voneinander unterschied (McMahon et al. 1968).

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Alter bei erster Lebendgeburt und Prognose des Mammakarzinoms (Kroman et al. 1998) zeigte sich hier ein signifikant positiver prognostischer Effekt für Patientinnen, die ihr erstes Kind im Alter von 20 bis 29 Jahren geboren hatten. Aus Studien zum Mammakarzinomrisiko nach OH-Einnahme ist die protektive Wirkung von frühzeitigen Schwangerschaften/Lebendgeburten hinreichend bekannt (Kelsey et al. 1993, McCredie et al. 1998). Warum nun dieser protektive Effekt seinen Ausdruck in der Prognose des Mammakarzinoms findet, könnte in den grundlegenden biologisch-morphologischen Umwandlungen des Mammagewebes durch die Schwangerschaft begründet sein. Morphologisch zeigen die terminalen ductulolobulären Drüsenstrukturen der Mamma bis zu fünf Jahre nach der Geburt ein deutlich atrophisches Aussehen (Battersby and Anderson 1989). Brustwarzenaspirate zeigten über den gleichen Zeitraum einen geringeren Östrogengehalt (Petraakis et al. 1987). Diese hormonellen Veränderungen nach der ersten Schwangerschaft/Lebendgeburt sind langanhaltend und haben offenbar einen bleibenden Effekt auf das Mammagewebe (Musey et al. 1987, Dorgan et al. 1995). Dieser drückt sich nicht nur in einer veränderten Biologie des normalen Gewebes aus, sondern hat möglicherweise auch Auswirkungen auf die Transformation und Progression des Mammakarzinoms (Russo et al. 1990).

Insgesamt fand sich in unseren Untersuchungen somit ein günstiger prognostischer Effekt nach der Geburt von bis zu 3 Kindern oder der Geburt des ersten Kindes im Alter von 20 bis 29 Jahren und ein ungünstiger Effekt bei der Geburt von vier und mehr Kindern und/oder der Geburt des ersten Kindes bis zum 19. Lebensjahr. Diese zunächst sehr unterschiedlichen Aussagen können biologisch durchaus auf gemeinsame Regulationsmechanismen zurückgeführt werden.

Frauen mit einer höheren Zahl von Lebendgeburten haben mit größerer Wahrscheinlichkeit ihr erstes Kind in einem sehr frühen Alter geboren. Es existieren inzwischen mehrere Studien, die eine Korrelation von früher erster Lebendgeburt und ungünstiger Prognose bei Erkrankung an einem Mammakarzinom beschreiben (Greenberg et al. 1985, Schouten et al. 1997, Kroman et al. 1998). Außerdem wird das Mammakarzinom bei Frauen mit vielen Lebendgeburten mit höherer Wahrscheinlichkeit nur wenige Jahre nach einer Geburt diagnostiziert als es für andere Patientinnen der Fall ist. Der protektive Effekt einer Schwangerschaft tritt mit einer ein- bis zweijährigen zeitlichen Verzögerung auf (McMahon et al. 1993, Guinee et al. 1994, Lambe et al. 1994, Russo and Russo 1995, Kroman et al. 1998). Die Prognose für Patientinnen, die in den ersten zwei Jahren nach der letzten Lebendgeburt an einem Mammakarzinom erkranken, ist scheinbar schlechter als für andere Frauen (Kroman et al. 1997). Andererseits können Frauen mit vielen Lebendgeburten auch eine hohe Geburtenfolge haben. Da der protektive Effekt nach Schwangerschaft und Geburt sich erst nach einer gewissen Zeit auch morphologisch und zellkinetisch am Mammagewebe manifestiert (Anderson et al. 1989, Russo et al. 1990), würde mit jeder neuen Schwangerschaft wieder ein immenser hormoneller Stimulus auf das noch immer proliferationsbereite Mammagewebe treffen. Die mitotische Aktivität des Mammagewebes korreliert mit dem Alter und ist besonders hoch während der Pubertät und Schwangerschaft (Nandi et al. 1995, Olsson et al. 1996, Reid et al. 1996). Die Gefahr des Auftretens chromosomaler Schäden und deren Manifestation ist in Phasen gesteigerter Proliferation erhöht (Russo and Russo 1980). Darüberhinaus wird vermutet, daß die Tumorbilogie manifester Karzinome bereits durch das hormonell-biologische Milieu ihrer Entstehungsphase geprägt wird (Pike et al. 1983a und 1983b, Olsson 1989, Nandi et al. 1995), was die ungünstige Prognose von Tumoren erklärt, deren Induktions- und Transformationsprozeß potentiell in einer Phase erhöhter mitotischer Aktivität stattfand. Andererseits müssen die hormonellen Effekte einer Schwangerschaft nicht schon in der Transformationsphase angreifen, sondern könnten auch durchaus einem bereits existierenden

Tumor oder dessen Metastasen einen extremen Proliferationsschub vermitteln. Ob hormonelle Stimuli eher einen protektiven oder einen stimulierenden Effekt ausüben ist außerdem vom erreichten Differenzierungsgrad des Mammagewebes abhängig (Russo et al. 1981). Mammakarzinome, die in der Schwangerschaft direkt diagnostiziert werden, haben stadienabhängig keine schlechtere Prognose als solche, die zu einem anderen Zeitpunkt therapiert werden (Nettleton et al. 1996, Berry et al. 1999)

### *Menarche und Menopause*

Menarche und Menopause führen ebenfalls zu morphologisch-biologischen Veränderungen des Mammagewebes mit potentieller Bedeutung für Transformations- und Progressionsprozesse beim Mammakarzinom.

Weder das Alter bei Menarche noch der Menopausenstatus hatten jedoch hier unter Berücksichtigung der etablierten Prognosefaktoren einen Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms. Andere Autoren konnten ebenso keine Assoziation zwischen Alter bei Menarche und Überleben nachweisen (Greenberg et al. 1985). Allerdings wurden auch schlechtere Überlebensraten für Patientinnen mit sehr früher Menarche (<11 Jahren) beschrieben (Juret et al. 1976). In Untersuchungen, die den Einfluß der Menopause auf die Prognose des Mammakarzinoms berücksichtigten, sind die Ergebnisse ebenfalls widersprüchlich (Lees et al. 1989, Al-Idrissi et al. 1992, Greenberg et al. 1985). Der Anteil der postmenopausalen Patientinnen in der vorliegenden Studie war aufgrund der Einschlusskriterien gering. In wissenschaftlichen Studien wurde häufig diskutiert, daß es im Grunde keine übereinstimmende Definition der Menopause gibt, die in vergleichbaren Untersuchungen Anwendung findet (Bulbrook et al. 1976, Jatoi et al. 1998). Eine nicht unbeträchtliche Anzahl von Untersuchungen bezieht sich in Ermangelung von Angaben zur Menstruationsanamnese auf ein definiertes Durchschnittsalter bei Erreichen der Menopause. Für entwickelte westliche Staaten wird das Durchschnittsalter bei Erreichen der Menopause mit 50 bis 51 Jahren angegeben (Lees et al. 1989, McKinlay et al. 1992). Diese Altersschwelle hatte auch in der vorliegenden Studie eine wesentlich größere Bedeutung als der Menopausenstatus. Aus Untersuchungen zur Bedeutung des Alters als prognostischer Faktor für das Mammakarzinom ist beschrieben, daß Patientinnen zwischen 40 und 49 Jahren signifikant bessere Überlebensraten haben als jüngere und ältere Patientinnen (Adami et al. 1986, Mohle-Boetani et al. 1986, Lees et al. 1989, Holmberg et al. 1994). Andererseits wurde postmenopausalen Frauen (Alter über 50 Jahre) von anderen Autoren eine bessere Prognose zugeschrieben (Toikanen et al. 1991, Aaltomaa et al. 1992, Gasparini et al. 1998). Die Ursachen dieser widersprüchlichen Ergebnisse liegen unter anderem in der unterschiedlichen Alterszusammensetzung der Studienpopulationen und der variablen Definition des menopausalen Status.

In der vorliegenden Studie wies die Gruppe der ab 50jährigen Patientinnen mit Mammakarzinom unabhängig vom Menopausenstatus eine signifikant schlechtere Prognose auf als die Gruppe der unter 50jährigen Frauen. Die Überlebensraten einzelner Untergruppen der unter 50jährigen Patientinnen unterschieden sich dagegen nicht signifikant.

Eine mögliche Ursache für die bessere Prognose von Frauen, deren Mammakarzinom zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr diagnostiziert wurde, liegt in dem Umstand, daß diese Patientinnen nach der Diagnose im 10 jährigen Follow-up mit hoher Wahrscheinlichkeit ihre natürliche Menopause durchlaufen. Diese könnte den Effekt einer adjuvanten Therapie verstärken oder aber im Sinne einer hormonellen Ablation wirksam werden.

Dagegen sind Tumoren, die erst perimenopausal diagnostiziert werden, scheinbar häufiger hormonresistent als andere, was möglicherweise die Unterschiede in der Prognose zu anderen Frauen erklärt (Bulbrook and Thomas 1989, Thorpe et al. 1993, Gasparini et al. 1998).

### *Familienanamnese (FA)*

Mammakarzinome von Patientinnen mit positiver FA zeigen in Abhängigkeit vom Umfang der familiären Belastung häufiger genetische Mutationen und werden in einem früheren Alter diagnostiziert als andere (Marcus et al. 1994). Damit stellen diese Patientinnen möglicherweise eine differente biologische Gruppe zur übrigen Population dar, deren Prognose sich potentiell von der anderer Patientinnen unterscheidet.

Die Aussagen zur Prognose von Patientinnen mit positiver Familienanamnese (FA) sind widersprüchlich (Slattery et al. 1993, Mohammed et al. 1998, Yang et al. 1998). In der vorliegenden Studie zeigten sich keine Unterschiede in der Prognose des Mammakarzinoms zwischen Patientinnen mit positiver und denen mit negativer FA. Zwei große Studien, darunter eine sehr umfangreiche prospektive Studie zur prädiktiven Bedeutung einer positiven FA für die Prognose des Mammakarzinoms fanden ebenso keine Unterschiede in den krankheitsspezifischen Mortalitätsraten zwischen beiden Gruppen (Schouten et al. 1997, Yang et al. 1998). Eine zahlenmäßig relativ kleine Untersuchung beschrieb eine signifikant bessere Prognose für prämenopausale Patientinnen mit positiver FA gegenüber denen mit leerer FA (Mohammed et al. 1998). Zwei der frühen Untersuchungen zu OH und der Prognose des Mammakarzinoms berichteten über eine höhere Anzahl von Patientinnen mit positiver FA unter denen, die OH eingenommen hatten. Parallel dazu hatten Patientinnen, die OH eingenommen hatten, geringfügig bessere Überlebensraten als andere (Spencer et al. 1978, Matthews et al. 1981). Im Gegensatz dazu wurde von anderen Autoren eine etwa 50%ige Erhöhung des Sterberisikos für unter 50jährige Patientinnen mit positiver FA beschrieben (Slattery et al. 1993).

### *Benigne Mammaveränderungen*

Patientinnen mit benignen Mammaveränderungen unterliegen in Abhängigkeit von der Art der histomorphologischen Befunde einem höheren Risiko, ein invasives Mammakarzinom zu entwickeln (Page et al. 1985, Lakhani 1999). Möglicherweise könnte die Proliferationsbereitschaft des Mammagewebes, die zu diesen Veränderungen führt, bei Transformation und Progression zum Mammakarzinom eine Beeinflussung prognostisch bedeutsamer Merkmale des Tumors nach sich ziehen. Die vorliegende Untersuchung erbrachte jedoch keinen Anhalt für eine Veränderung der Prognose von Mammakarzinompatientinnen, bei denen früher Mammabiopsien wegen benignen Mammaveränderungen durchgeführt worden waren. Es ist bekannt, daß unter OH weniger benigne Mammaveränderungen diagnostiziert werden (Cole 1977, Wingrave et al. 1982, Pastides et al. 1983, Hsieh et al. 1984, Hulman et al. 1992, Di Lieto et al. 1994, Rohan and Miller 1999). Insbesondere in Anbetracht des erhöhten Mammakarzinomrisikos nach OH in manchen Studien wurde allerdings auch postuliert, daß unter OH möglicherweise die benignen Mammaveränderungen ohne Atypien abnehmen, während solche mit Entartungstendenz zunehmen (Cole 1977). Die praktische Bedeutung dieser Frage wird deutlich, wenn man davon ausgeht, daß Patientinnen mit atypischen Läsionen eine Zunahme des Mammakarzinomrisikos um das 4 bis 5fache im Vergleich zur Gesamtbevölkerung aufweisen, was sich bei positiver FA noch verdoppeln kann (Page et al. 1985). Dennoch haben Mammakarzinome, die aus solchen Läsionen entstehen, nicht notwendigerweise eine schlechtere Prognose (Fowble et al. 1998). Möglicherweise haben Patientinnen mit benignen proliferativen Veränderungen bei Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms sogar eine bessere Prognose als andere (Ahmed et al. 1996).

### *Sozioökonomische Faktoren und Prognose*

Insbesondere in ethnisch gemischt zusammengesetzten Studienpopulationen haben Frauen mit einem hohen sozioökonomischen Status offenbar eine bessere Prognose als solche mit einem niedrigeren sozioökonomischen Status. Begründet wird dies mit der besseren ärztlichen Betreuung und, wenn es sich um ethnisch verschieden zusammengesetzte Populationen handelt, auch mit unterschiedlichen biologischen Charakteristika der diagnostizierten Tumoren (Black 1978, Stalsberg 1989, Fisher 1993, Swanson 1993, Taioli et al. 1996, Lemon and Rodriguez-Sierra 1997). Andere Studien mit überwiegend kaukasischer Bevölkerung fanden wiederum keine Differenzen in den Überlebensraten zwischen Patientinnen verschiedener sozialer Klassen (Morrison et al. 1972, Greenberg et al. 1985).

Zur Charakterisierung des sozioökonomischen Status wurde die Anzahl der Ausbildungsjahre (Schule/Hochschule) herangezogen. Die Intensität der ärztlichen Betreuung wurde indirekt durch die Anzahl der durchgeführten zytologischen Abstriche erfaßt. Eine engmaschigere ärztliche Betreuung wäre in der zugrundeliegenden Studie vorrangig

Ausdruck eines besseren Gesundheitsbewußtseins und könnte potentiell zu einer Verschiebung der Diagnose hin zu Tumoren mit günstigerem Stadium führen. Allerdings führt dieser Effekt in der Praxis offenbar nur zu einer unbedeutenden Vorverlagerung der Diagnose von wenigen Wochen, die prognostisch von untergeordneter Bedeutung ist (Vessey et al. 1979, UK 1989, Schlesselman et al. 1992, Auvinen et al. 1996). Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Patientinnen fanden sich jedoch keine Differenzen in der Stadienverteilung für die Gesamtgruppe in Abhängigkeit von der OH-Einnahme.

Die erzielten Ergebnisse zeigten ebenso keine signifikanten Unterschiede der Prognose der Patientinnen in Abhängigkeit von der Anzahl durchgeführter zytologischer Abstriche. Eine höhere Frequenz von Arztkonsultationen führte damit nicht zu einer Vorverlegung des Diagnosezeitpunktes für eine umschriebene Patientengruppe, die letztlich bei adäquater Therapie eine Verbesserung der Prognose zur Folge haben würde. Auch die Anzahl der Ausbildungsjahre (Schule/Hochschule) der Frauen und ihrer Partner hatten bis auf eine Ausnahme keinen Einfluß auf die Prognose der Erkrankung. Nur Patientinnen, deren Partner 11-15 Ausbildungsjahre absolviert hatten, wiesen signifikant bessere Überlebensraten auf. Die Prognose aller anderen Patientinnen zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede, unabhängig davon, ob sie selbst oder deren Partner längere oder kürzere Ausbildungszeiten durchlaufen hatten. In Anbetracht dessen scheint es sich bei diesem Ergebnis in nur einer Untergruppe am ehesten um ein zufälliges Resultat zu handeln.

### **Prognostische Wertigkeit hormonell-reproduktiver Faktoren und des OH-Einnahmezeitraums**

Von allen untersuchten hormonell-reproduktiven- und epidemiologischen Faktoren, die potentiell mit der biologischen Wirkung der OH-Einnahme interferieren könnten, erlangten nur die Variablen zur Geburt und zum Stillen eigene Bedeutung als Prognosefaktoren für das Mammakarzinom.

Diese Faktoren und der Zeitraum der OH-Einnahme wurden nunmehr im multivariaten Ansatz hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit verglichen.

Unter den hormonell-reproduktiven Faktoren hatte das Alter beim Stillen des ersten Kindes die größte Bedeutung als Prognosefaktor. Im gemeinsamen Ansatz überwog jedoch der Einfluß der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose in seiner prädiktiven Wertigkeit für die Prognose des Mammakarzinoms gegenüber dem der Stillvariablen.

### **Prognostische Wertigkeit der Einnahme NETA-haltiger OH und des OH-Einnahmezeitraums**

Sowohl die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose des Mammakarzinoms als auch die Einnahme NETA-haltiger OH waren mit einer signifikanten Reduktion des Sterberisikos um etwa zwei Drittel (HR 0.37; HR 0.34) gegenüber anderen Einnahmezeiten oder Präparaten verbunden. Bei Einschluß beider Variablen in die multivariate Analyse erwiesen sich beide als statistisch signifikant. Offenbar waren beide Faktoren von unabhängiger Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms.

Allerdings verfehlte der eingeführte Wechselwirkungsfaktor zur Analyse eines möglichen Zusammenhanges beider Variablen die statistische Signifikanzgrenze nur knapp. Somit ist auf der Grundlage des vorhandenen Materials eine gewisse Abhängigkeit zwischen beiden Variablen, die letztlich zum gleichen prognostischen Effekt führt, nur bedingt auszuschließen.

Die Gruppe der Frauen, die OH im 5.-8. Jahr vor der Diagnose eingenommen hatten, wurde zu 45% durch Patientinnen gebildet, die in ihrem Leben überwiegend NETA-haltige OH verwendet zu hatten. Die Einnahme aller anderen Präparate war dagegen prozentual etwa gleich verteilt. Zumindest ein Teil der prognostisch günstigen Wirkung der NETA-Einnahme könnte durch den allgemeinen Effekt der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose bedingt sein.

### **Bedeutung von Prognosefaktoren im Follow-up**

Sowohl die Einnahme von OH als auch das Reproduktionsverhalten waren von signifikanter

Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms. Diese hormonellen Faktoren setzten ihren Einfluß neben dem der etablierten histomorphologischen Prognosefaktoren durch.

#### *Histomorphologische, zellulär exprimierte und klinische Faktoren*

Nach 10jährigem Follow-up hatte sich der LK-Status in der vorliegenden Studie als stärkster unabhängiger Prognosefaktor erwiesen, der durch die anderen histomorphologischen Faktoren ergänzt wurde. Unter den Hormonrezeptoren erlangte nur der PR-Status nicht jedoch der ER-Status Bedeutung als unabhängiger Prognosefaktor. Auch von anderen Autoren wurde dem PR-Status gegenüber dem

ER-Status wiederholt größere prognostische Signifikanz zugeschrieben (Thorpe et al. 1987, Alexieva-Fiegesch et al. 1988, Chevallier et al. 1988, Bernoux et al. 1998, Collett et al. 1998).

Neben diesen Faktoren erlangte das Alter ebenfalls signifikante Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms.

Die histomorphologischen Faktoren und der Hormonrezeptorstatus bilden trotz der Einführung und Validierung ständig neuer Prognosefaktoren noch immer die Grundlage für die prognostische und prädiaktive Beurteilung eines Mammakarzinoms nach der Diagnose (Hawkins et al. 1996, Possinger et al. 1996, von Kleist 1996). Die Wertigkeit eines jeden potentiellen prognostischen Markers muß daher im Vergleich mit diesen etablierten Prognosefaktoren geprüft werden (Clark et al. 1987, Chapman et al. 1996). Der LK-Status ist unangefochten der stärkste Prognosefaktor für das Mammakarzinom und bildet eine wichtige Entscheidungsgrundlage für die adjuvante Therapie

(Carter et al. 1989, von Kleist 1996; Gasparini et al. 1998, Hilsenbeck et al. 1998). Für das prognostisch heterogene LK-negative Mammakarzinom ist der Bedarf nach neuen Prognosefaktoren, die eine Therapieentscheidung erleichtern würden, dagegen besonders hoch. Keiner der neueren Faktoren hat jedoch bisher die Erwartungen für diese Patientengruppe erfüllt. Das Bedürfnis nach einer Verbesserung dieser Situation wird in der Bildung einer Vielzahl verschiedener prognostischer Indices deutlich (Sigurdsson et al. 1990, Arriagada et al. 1992, Galea et al. 1992, Rosner and Lane 1993, Seshradi et al. 1997, Sauerbrei et al. 1999), die nunmehr auch die Einbeziehung neuerer molekularbiologischer Prognosefaktoren anstreben (Leinster et al. 1998).

Nach unseren Untersuchungen hatte keines der biologischen Tumorcharakteristika (PCNA, EGF-R, c-erbB-2, p53) nach 10 Jahren Follow-up noch einen unabhängigen Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms. Betrachtet man dieses Resultat im Vergleich zu der Vielzahl publizierter Untersuchungen zu diesem Thema, so fällt auf, daß die Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung neuerer Prognosefaktoren aus der Gruppe der Proliferationsmarker, der Wachstumsfaktorrezeptoren, der Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene äußerst heterogen und kontrovers sind. Die Ursachen liegen in teilweise tiefgehenden methodischen Unterschieden, die sich von der Zusammensetzung der Studie über die experimentelle Methodik bis zur Länge des Follow-up erstrecken und die Vergleichbarkeit der Untersuchungen zum Teil stark einschränken (Clark et al. 1987, Yoshimoto et al. 1993, Chapman et al. 1996)

Auch die prognostische Bedeutung des Alters bei Diagnose wird unterschiedlich beurteilt (Adami et al. 1986, Mohle-Boetani et al. 1986, Lees et al. 1989, Toikanen et al. 1991, Aaltomaa et al. 1992, Holmberg et al. 1994, Gasparini et al. 1998). Von allen analysierten 5-Jahresgruppen zeigte nur die Gruppe der über 50jährigen Frauen eine signifikant schlechtere Prognose als andere. Einige der Studien zur Bedeutung des Alters als Prognosefaktor, die in der Zusammensetzung der Studienpopulation der vorliegenden Studie ähneln, fanden ebenfalls eine ungünstigere Prognose der über 50jährigen Patientinnen im Vergleich zu der Prognose jüngerer Frauen (Adami et al. 1986, Mohle-Boetani et al. 1986, Lees et al. 1989, Holmberg et al. 1994).

Das therapeutische Vorgehen ist dagegen ein zusätzlicher Faktor, dessen Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms unbestritten ist. Eine erst kürzlich publizierte Studie zu dieser Problematik zeigte, daß für prämenopausale Patientinnen die ovarielle Ablation ebenso effektiv

war wie die Chemotherapie (Nomura et al. 1998).

Aufgrund ihres antigonadotropen Effekts könnte die adjuvante Chemotherapie mit der biologischen Wirkung von OH interferieren, weshalb der prognostischen Bedeutung der Therapiemodalitäten besondere Aufmerksamkeit zukommt (Schmidt-Gollwitzer et al. 1987, Mehta et al. 1991, Bines et al. 1996).

Die Einnahme von OH führt zur Suppression der Ovarialfunktion und damit der endogenen Steroidhormonproduktion. Auch die adjuvante Chemotherapie führt in einem großen Teil der Fälle zur zum Teil reversiblen Suppression der ovariellen Hormonproduktion (Mehta et al. 1991, Bines et al. 1996). Diesem Effekt wird ein Teil der therapeutischen Wirkung der Chemotherapie bei prämenopausalen Patientinnen mit Mammakarzinom zugeschrieben (Padmanabhan et al. 1986, Schmidt-Gollwitzer et al. 1987, Tormey et al. 1990, Bianco et al. 1991, Pagani et al. 1998). Patientinnen mit Chemotherapie-bedingter Amenorrhoe haben unabhängig von deren Dauer eine bessere Prognose als andere Patientinnen ohne Amenorrhoe (Schmidt-Gollwitzer et al. 1987). Nunmehr könnten sich OH-Einnahme und adjuvante Chemotherapie in ihren Wirkungen potenzieren, was sich am ehesten in einer verbesserten Prognose nach erfolgter OH-Einnahme bis zur Diagnose darstellen müßte. Die Patientinnen, die OH über mehrere Jahre bis zur Diagnose eingenommen hatten, bildeten jedoch in der vorliegenden Studie eine sehr heterogene Gruppe. Nach Langzeiteinnahme bis zur Diagnose waren die Überlebensraten der Patientinnen signifikant besser als die der Frauen, die niemals OH verwendet hatten. Nach Kurzeiteinnahme (bis 5 Jahre) bis zur Diagnose dagegen hatten die Patientinnen eine signifikant schlechtere Prognose als Patientinnen, die niemals OH eingenommen hatten. Das therapeutische Vorgehen als solches erlangte in der vorliegenden Studie keinen Einfluß als unabhängiger Prognosefaktor.

Damit waren der LK-Status, der histologische Tumortyp, das histologische Grading, die Tumorgroße sowie der PR-Status und das Alter die verbleibenden unabhängigen Prognosefaktoren aus einer Vielzahl untersuchter histomorphologischer, zellulär exprimierter und klinischer Variablen.

Die Bedeutung vieler Prognosefaktoren beim Mammakarzinom ändert sich mit der Länge des Follow-up (Clark et al. 1987, Lipponen et al. 1992, Schroeter et al. 1992, Yoshimoto et al. 1993, Hilsenbeck et al. 1998). Manche Faktoren sind offenbar nur für wenige Jahre postoperativ von Bedeutung und verlieren bei einem längeren Follow-up und Zunahme der effektiv auswertbaren Ereignisse an prognostischer Wertigkeit (Ulm et al. 1996, Hilsenbeck et al. 1998). Ein charakteristisches Beispiel hierfür ist der ER-Status, dessen prognostische Bedeutung bereits nach 3 Jahren stark abnimmt (Collett et al. 1998). Paradoxe Weise kann ein positiver ER-Status im weiteren Verlauf sogar prädiktiv für das Risiko von Rezidivkrankungen sein, da die Wiedererkrankungsrate bei ER-negativen Tumoren in den ersten Jahren nach Diagnose hoch ist und später abfällt, während die der ER-positiven Tumoren erst mit fortgeschrittenem Follow-up zum Tragen kommt (Hilsenbeck et al. 1998). Obwohl die Hormonrezeptoren allgemein von eingeschränkter prognostischer Wertigkeit sind, stellen sie aber den praktisch bedeutendsten prädiktiven Faktor für die Effektivität einer hormonellen Therapie dar (NIH 1991, Winstanley et al. 1991).

Ähnliche zeitabhängige Verläufe der prognostischen Wertigkeit wurden auch für die c-erbB-2-Proteinexpression und die EGF-R-Expression beschrieben (Schroeter et al. 1992, Klijn et al. 1994).

Der Einfluß des LK-Status und verschiedener anderer Prognosefaktoren zeigt dagegen eine zeitlich proportionale Entwicklung und bewahrt seine Bedeutung in der Regel noch nach einem 10jährigen Follow-up (Clark et al. 1987, Spyrtatos et al. 1989, Hilsenbeck et al. 1998).

Eine klinisch relevante und zuverlässige Bewertung dieses Phänomens wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlicher statistischer Methodik unternommen (Ulm et al. 1996, Hilsenbeck et al. 1998). Unverändert ist jedoch die proportionale Regressionsanalyse nach Cox die bevorzugte Methode zur Charakterisierung des Einflusses von Prognosefaktoren, da sie sowohl praktikabel ist als auch eine für den Kliniker gut verwertbare Aussage liefert (Hilsenbeck et al. 1998, Sauerbrei et al. 1999). Um dennoch dem Phänomen der zeitabhängigen Entwicklung des prognostischen Einflusses verschiedener

Faktoren gerecht zu werden, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen das proportionale Hazardmodell nach Cox in unterschiedlichen methodischen Ansätzen verwandt (Lipponen et al. 1992, Schroeter et al. 1992, Yoshimoto et al. 1993).

In der vorliegenden Studie wurden die multivariaten Überlebensanalysen jeweils für das n-te Jahr nach der Diagnose des Mammakarzinoms durchgeführt. Dabei war der LK-Status der einzige Faktor, der über den gesamten Beobachtungszeitraum einen signifikanten Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms hatte. Der Befall der LK zum Zeitpunkt der Diagnose war noch nach 10 Jahren mit einem erhöhten Risiko für den Tod am Mammakarzinom verbunden (HR 2.5). Auch der histologische Tumortyp verlor erst im 7. Jahr nach der Diagnose seinen Einfluß als unabhängiger Prognosefaktor, während das histologische Grading und die Tumorgroße schon

im 4. und 2. Jahr keine prognostische Wertigkeit mehr hatten.

In einer vergleichbaren skandinavischen Studie zur zeitabhängigen Entwicklung der Wertigkeit von Prognosefaktoren zeigte nach 10 Jahren keine der untersuchten Variablen mehr eine signifikante Bedeutung als unabhängiger Faktor. Die stärksten Prognosefaktoren waren der LK-Status und histologische Charakteristika, die ihren Einfluß zwischen dem 5. und 7. Jahr des Follow-up verloren (Lipponen et al. 1992). Die etablierten histomorphologischen Variablen, in führender Stellung der LK-Befall, haben ihre Bedeutung als die zentralen Prognosefaktoren für das Mammakarzinom auch über längere Follow-up Perioden nicht eingebüßt (Hilsenbeck et al. 1998).

#### *OH-Einnahme*

Die OH-Einnahme wurde, sofern sie das 5.-8. Jahr vor der Diagnose umfaßte, in ihrer Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms nur noch vom LK-Status übertroffen. Der unabhängige prognostische Effekt der OH-Einnahme war über die gesamte auswertbare Follow-up Periode nachweisbar. Nach 8 Jahren wurde die Analyse durch die limitierte Größe der einzelnen Untergruppen und damit der auswertbaren Ereignisse begrenzt. Zu diesem Zeitpunkt waren der LK-Status und die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose die einzigen signifikanten Prognosefaktoren für die untersuchte Studienpopulation.

Dagegen war die Einnahme NETA-haltiger OH als zweiter starker hormoneller Faktor ab dem 5. Jahr nach der Diagnose ohne unabhängige Bedeutung für den Erkrankungsverlauf. Damit hatte die Einnahme NETA-haltiger OH dennoch einen stärkeren prognostischen Einfluß als Tumorgroße, Grading und PR-Status.

Offenbar können exogene hormonelle Einflüsse eine sehr starke und zeitlich proportionale Wirkung auf die Prognose des Mammakarzinoms ausüben, deren Bedeutung in der vorliegenden Untersuchung mit der der LK-Metastasierung vergleichbar war.

#### 4. Hypothese

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen die Vermutung nahe, daß Ovulationshemmer sehr komplexe Wirkungen im Prozeß der Tumorentwicklung mit differenzierten Folgen für die Prognose der Erkrankung entfalten.

Der Einfluß der OH-Einnahme auf die Prognose des Mammakarzinoms war dann am stärksten, wenn die Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose erfolgte. Auch Patientinnen, die OH über mehrere Jahre vor oder nach diesem definierten Einnahmezeitraum verwendet hatten, wiesen eine signifikant günstigere Prognose auf, sofern die Einnahme den Zeitraum zwischen dem 5.-8. Jahr vor der Diagnose teilweise erfaßte.

Möglicherweise wird durch die Hormonexposition ein Tumormilieu geschaffen, daß in einem biologisch sensiblen Zeitraum zu einer Prägung spezifischer biologischer Merkmale der entstehenden Mammakarzinome und/oder deren Metastasen führt, die eine Veränderung des gesamten Erkrankungsverlaufs zur Folge hat.

Aufgrund der außerordentlich variablen Proliferationsraten der Mammakarzinome ist die zeitliche Zuordnung der OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose zu einer definierten Phase der Tumorentwicklung nur eingeschränkt möglich. In diesem Zeitraum kann die Hormonzufuhr theoretisch sowohl

- frühe Transformationsprozesse,
- die frühe klonale Selektion von Tumorzellen,
- die phänotypische Prägung des okkulten Tumors als auch
- den beginnenden Metastasierungsprozeß,
- bereits vorhandene lokoregionäre Metastasen oder
- die periphere Metastasierung

beeinflussen.

Es existieren verschiedene Untersuchungen, die den Versuch unternommen haben, individuelle Wachstumsraten von Mammakarzinomen zu bestimmen (Silverstein et al. 1994, von Fournier et al. 1994, Nettleton et al. 1996).

Um bei der Vielzahl der möglichen Wechselwirkungen zwischen OH und Tumor eine ungefähre Vorstellung von den tatsächlich ablaufenden biologischen Mechanismen zu entwickeln, wurden Tumorgöße und Wahrscheinlichkeit der prozentualen

LK-Metastasierung für den Zeitraum zwischen dem 5.-8. Jahr vor der Diagnose ermittelt. Als Grundlage dienten umfangreiche Studien zur Analyse individueller Wachstumsraten und funktionaler Zusammenhänge zwischen Tumordurchmesser und Häufigkeit der prozentualen LK-Metastasierung (Abb. 4.-1 und 4.-2). Die Analyse wurde auf der Basis des ermittelten medianen Tumordurchmessers (22 mm) durchgeführt. Unter Verwendung des medianen Wachstumskoeffizienten der umfangreichen Studie von Fournier belief sich der Tumordurchmesser 5 Jahre vor der Diagnose auf 3.2 mm.

8 Jahre vor der Diagnose waren die Tumoren im Durchschnitt 1 mm und kleiner (von Fournier et al. 1994).

Die Wahrscheinlichkeit der LK-Metastasierung liegt bei diesen Tumordurchmessern 5 Jahre vor der Diagnose bei 5.2% und ist 8 Jahre vor der Diagnose gleich Null (Nettleton et al. 1996).



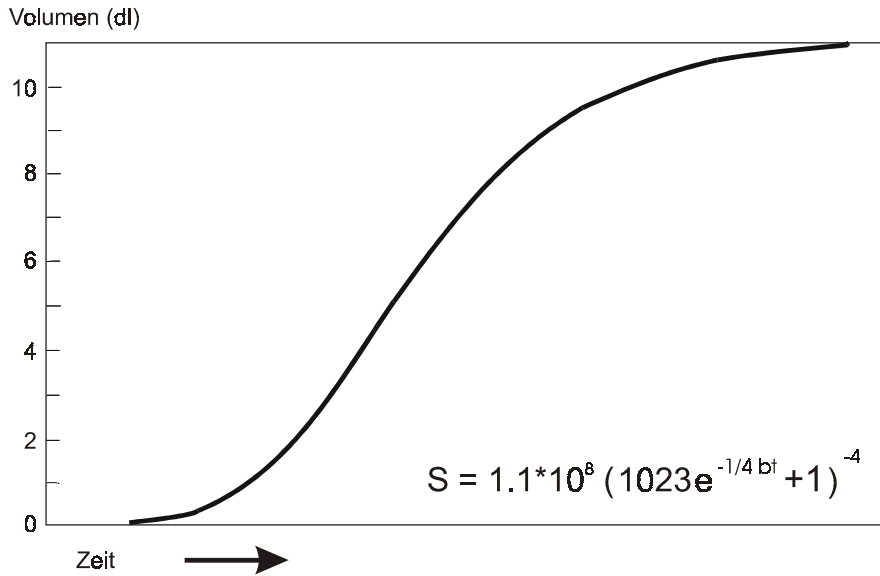


Abbildung 4.-1: Logistische Wachstumskurve und zugehörige Funktionsgleichung ( S: Tumorwachstum, t: Zeit, b: individueller Wachstumsparameter nach von Fournier et al. 1994)

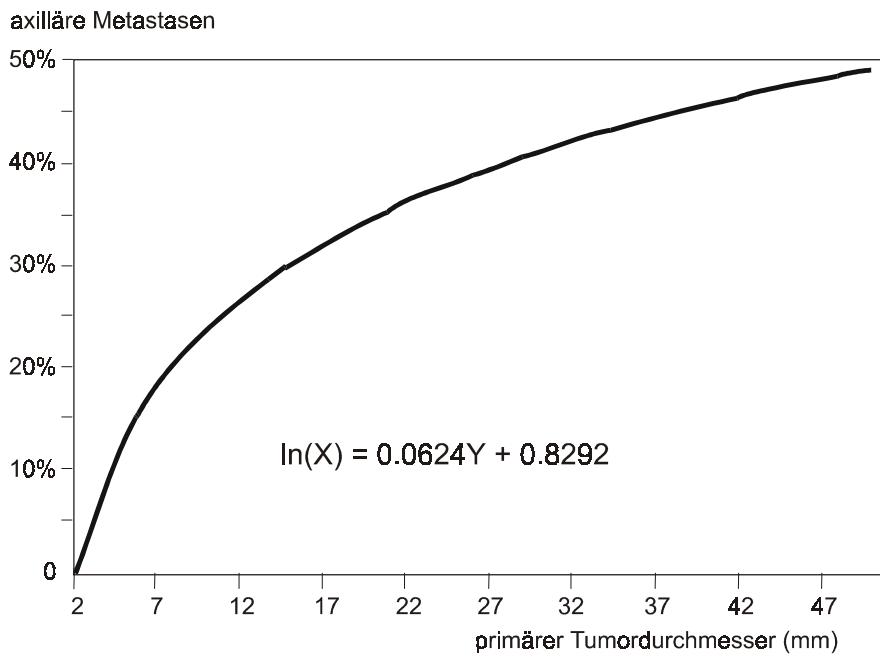


Abbildung 4.-2: Prozentuale Häufigkeit der axillären LK-Metastasierung (Y) in Abhängigkeit von der TumorgroÙe (X) beim Mammakarzinom (nach Nettleton et al. 1996)

Die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose hatte damit mit hoher Wahrscheinlichkeit eine prägende Wirkung auf den Tumor selbst und übt darüberhinaus einen Einfluß auf die beginnende und frühe LK-Metastasierung aus.

Die bessere Prognose nach OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose, unabhängig davon ob die Einnahme über kürzere oder längere Zeit erfolgte, läßt die Selektion eines bestimmten klonalen Phänotyps vermuten, der sich in seiner Aggressivität, seiner Metastasierungspotenz und der Biologie vorhandener Metastasen von anderen unterscheidet. Eine hormonelle Wirkung auf den beginnenden Metastasierungsprozeß könnte diesem Ergebnis ebenfalls zugrundeliegen. Die Ergebnisse geben keinen Anhalt dafür, daß die OH-Einnahme die Metastasierung an sich

verhindert. Die Ausprägung der Tumorcharakteristika spricht allerdings für einen kombinierten Effekt auf den lokalen Tumor und die periphere Metastasierung. Die Zunahme der Häufigkeit stark ER-positiver Tumoren nach OH-Einnahme - sofern die Einnahme nicht bis zur Diagnose erfolgte - könnte Ausdruck eines frühzeitigen Selektionsprozesses am Tumor selbst sein. Ein solcher Effekt wäre potentiell mit der Ausbildung eines weniger aggressiven Tumortyps verbunden und würde sich ebenso auf die Biologie der Metastasen oder den beginnenden Metastasierungsprozeß auswirken. Andererseits kann eine Stimulation der ER-Expression auch Ausdruck einer Anpassungsreaktion des Mammakarzinoms durch eine Verschiebung des hormonellen Tumormilieus nach Beendigung der OH-Einnahme sein. Die untersuchten Patientinnen dieser Gruppe zeigten gleichzeitig ein erhöhtes Risiko für das Auftreten EGF-R-positiver Mammakarzinome und von Tumoren mit mäßig gesteigerter Proliferationsaktivität. Für Tumoren, die sich vom hormonabhängigen zum hormonunabhängigen Stadium entwickeln, ist eine Zunahme der ER-Expression bei gleichzeitiger Erhöhung der EGF-R-Expression beschrieben worden. Die beschriebene Zunahme des Risikos für das Auftreten EGF-R-positiver Tumoren wäre mit einer solchen Stimulation der EGF-R-Expression nach Hormondeprivation vereinbar, die möglicherweise dem Verlust der Hormonsensibilität des Tumors vorangeht (Chrysogelos et al. 1994). Die mäßig gesteigerte Proliferationsaktivität der Tumoren könnte in diesem Zusammenhang mit der Ausbildung eines aggressiveren Phänotyps einhergehen. Es ist jedoch auch bekannt, daß Steroidhormone generell zu einer Steigerung der Proliferationsaktivität führen, wobei jedoch insbesondere die Rolle der Gestagene noch kontrovers diskutiert wird.

Die Beendigung der exogenen Hormonexposition durch OH würde bei einem hormonell geprägten Tumor zu einer Anpassungsreaktion führen, die sich auf das lokale und periphere Tumorwachstum und damit auf die Prognose der Erkrankung auswirkt. Darüberhinaus ist für Tumoren mit günstigen prognostischen Zusatzkriterien eine bessere therapeutische Ansprechbarkeit für adjuvante Behandlungsverfahren zu erwarten.

Dieser günstige Effekt der OH-Einnahme auf die Prognose der Erkrankung war nicht nachweisbar, wenn die Einnahme vor dem 5.-8. Jahr vor der Diagnose beendet wurde. Möglicherweise trifft die exogene Hormonzufuhr zu einem sehr frühen Zeitpunkt noch nicht auf einen proliferationsbereiten Tumor, der im Sinne einer hormonellen Prägung beeinflussbar wäre. Andererseits ist es nicht unwahrscheinlich, daß sich hormonelle differenzierende Einflüsse zu einem so frühen Zeitpunkt im Prozeß der weiteren Tumorprogression verlieren. Darüberhinaus befinden sich die Tumoren zu diesem Zeitpunkt überwiegend noch in einem nicht metastasierten Stadium. Eine Beeinflussung des Metastasierungs geschehens, welches letztlich entscheidend für die Prognose der Erkrankung ist, kann daher nicht stattfinden.

Mammakarzinome, die erst kurz vor dem Diagnosezeitpunkt hormonellen Einflüssen unterliegen, stellen möglicherweise biologisch eine völlig andere Entität dar. Eine frühzeitige klonale Selektion dieser Tumoren und eine Beeinflussung des Metastasierungs geschehens hat nicht stattgefunden.

Nach OH-Einnahme bis zur Diagnose waren die Tumoren signifikant häufiger LK-positiv, schlecht differenziert und hatten eine sehr hohe Proliferationsaktivität. Bei der bekannten Heterogenität des Mammakarzinoms sind diese Tumoren dennoch in der Lage, von der Hormonzufuhr zu profitieren und mit einem zusätzlichen Proliferationsschub zu reagieren. Tumoren in einer solchen Entwicklungsphase zeigen eher ein hormonunabhängiges Wachstum, wobei dieser Prozeß durch das Absinken des Hormonspiegels perimenopausal noch gefördert werden kann (Thorpe et al. 1993). In der Regel sind Tumoren jedoch noch lange Zeit in der Lage auf eine Steroidhormonzufuhr mit einer Rezeptorexpression zu reagieren oder auf funktionierende Regelkreise zurückzugreifen (Encarnacion et al. 1993, Pink and Jordan 1996). Diese Wachstumsstimulation führt möglicherweise zu der entscheidenden Dissemination und damit zur Zunahme der peripheren Metastasierung. Ein ähnlicher proliferationshemmender Effekt nach Absetzen der OH oder eine gute Ansprechbarkeit auf nachfolgende Therapien, wie sie für Patientinnen mit prognostisch günstigen Tumoren beschrieben wurden, wäre bei der über einen langen Zeitraum entstandenen Heterogenität

dieser biologisch aggressiveren Tumoren nicht zu erwarten.

Neben ihrer Wirkung auf den Tumor und seine Metastasen können Hormone komplexe übergeordnete Regulationsmechanismen beeinflussen. Die Einnahme von OH führt zur Downregulation des FSH. Es ist bekannt, daß FSH und Estradiol die ovarielle Synthese des IGF stimulieren, das als eines der stärksten Mitogene für die Mamma gilt. Auf diese Weise können OH potentiell auch über Eingriffe in hypothalamisch-hypophysäre Regelkreise Einfluß auf die Biologie und Prognose des Mammakarzinoms erlangen.

Bei der Diskussion dieser Zusammenhänge ist zu berücksichtigen, daß ein Großteil der vorhandenen und hier diskutierten Kenntnisse zur Wirkung von Steroidhormonen auf die Biologie des Mammakarzinoms Untersuchungen an Zelllinien und tierexperimentellen Studien entstammen, deren Übertragung auf die in vivo Situation am Menschen mit gewissen Einschränkungen verbunden ist.

Es ist darüberhinaus nicht geklärt, ob die Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose durch das Tumormilieu zum Zeitpunkt ihrer Initiierung und Transformation oder aber durch nachfolgende Änderungen dieses Milieus während ihrer Progression determiniert werden. So existieren Untersuchungen, die davon ausgehen, daß die frühzeitig erworbenen Eigenschaften eines Tumors bis zur Diagnose erhalten bleiben und später den Verlauf der Erkrankung bestimmen (Olsson 1989). Andererseits wurde beschrieben, daß Veränderungen des hormonellen Milieus zu jedem Zeitpunkt zu einer Beeinflussung der Tumorbiologie führen können und damit möglicherweise die Tumorcharakteristika zum Zeitpunkt der Diagnose des Mammakarzinoms prägen (Nandi et al. 1995).

## Zusammenfassung

Die vorliegende Studie zur Untersuchung des Einflusses von Ovulationshemmern (OH) auf die Tumorbiologie und die Prognose des Mammakarzinoms basiert auf den klinischen Daten und Befunden von 471 Patientinnen, die zwischen 1982 und 1986 im Rahmen der „WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives“ rekrutiert wurden. Das Durchschnittsalter der Frauen betrug zum Zeitpunkt der Diagnose 45 Jahre. Alle Patientinnen wurden primär operiert. Das mediane Follow-up für die lebenden Patientinnen beläuft sich auf 117 (48-151) Monate. Die mediane Überlebenszeit für verstorbene Patientinnen betrug 44.5 (5-130) Monate.

297 Patientinnen (63.1%) hatten vor der Diagnose der Erkrankung OH eingenommen. Bei 113 dieser Patientinnen (38%) erstreckte sich die OH-Einnahme über einen Zeitraum von bis zu 5 Jahren, bei 92 Patientinnen (31.0%) über 5 bis 10 Jahre und für weitere 92 Patientinnen (31.0%) über mehr als 10 Jahre.

Weitere Einnahmecharakteristika wurden in Form des Abstands der letzten/ersten Einnahme zur Diagnose, des Alters bei der ersten OH-Einnahme und der Einnahme vor der ersten Lebendgeburt erfaßt.

Die verwendeten OH waren fast ausschließlich Kombinationspräparate und enthielten als Östrogenbestandteil 0.05mg/0.03mg Ethinylestradiol oder 0.1mg/0.08mg Mestranol. Die verwendeten Gestagenkomponenten waren 2mg Chlormadinonacetat (CMA), 1mg Norethisteronacetat (NETA) oder 0.25mg/0.125mg Levonorgestrel. Die Mehrzahl der Patientinnen hatte überwiegend NETA-haltige OH (116/39%) eingenommen, gefolgt von einer nur geringfügig kleineren Gruppe, die überwiegend CMA-haltige OH (100/33.7%) verwendet hatte.

Die Häufigkeitsverteilung histomorphologischer Faktoren zeigte bei Beendigung der OH-Einnahme noch vor der Diagnose der Erkrankung keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Gruppe ohne OH-Einnahme. Erfolgte die OH-Einnahme jedoch bis zur Diagnose, war ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten

LK-positiver (OR 2.14) und schlecht differenzierter Tumoren (OR 2.01) zu beobachten.

Auffällig war eine signifikante Zunahme stark ER-positiver Mammakarzinome (ER>50%) nach OH-Einnahme, sofern die Einnahme nicht bis zur Diagnosestellung des Mammakarzinoms erfolgte (OR 2.16 bis 3.69). Für dieselbe Patientengruppe war gleichzeitig ein signifikanter Anstieg der Häufigkeit EGF-R-positiver

(OR 1.6-2.0) und mäßig proliferierender Tumoren (OR 1.67 bis 2.25) zu verzeichnen. Dieser stimulierende Effekt auf die PCNA- und die EGF-R-Expression war deutlicher, wenn die OH-Einnahme längere Zeit vor der Diagnose begonnen hatte ( $\geq 97$  Monate).

Nach OH-Einnahme bis zur Diagnose hatten die Tumoren häufiger eine sehr stark erhöhte Proliferationsaktivität (PCNA>50%, OR 2.69). Dagegen fanden sich keine Veränderungen in der ER- und EGF-R-Expression in dieser Gruppe.

Die c-erbB-2- und die p53-Proteinexpressionen zeigten keine Veränderungen in Abhängigkeit von der OH-Einnahme.

Die Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten aus den Gruppen der 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron- und der 19-Nortestosteronderivate hatte keinen spezifischen Einfluß auf die Ausprägung histomorphologischer und zellulär exprimierter Faktoren.

Die univariaten 10-Jahresüberlebensraten für die Gesamtgruppe waren abhängig vom histologischen Tumortyp ( $p=0.020$ ), vom histologischen Grading ( $p=0.004$ ), von der Tumormgröße ( $p<0.001$ ), vom LK-Status ( $p<0.0001$ ) und von der PR-Expression ( $p=0.009$ ). Alle anderen zellulär exprimierten Faktoren (ER, PCNA, EGF-R, c-erbB-2, p53-Protein) erlangten keinen Einfluß auf die Prognose nach langfristigem Follow-up. Die signifikanten Faktoren bestätigten ihre Bedeutung als unabhängige Prognosefaktoren in der multivariaten Analyse. Auch das Alter bei Diagnose

(<50/ $\geq 50$  Jahre), nicht jedoch der Menopausenstatus, erwies sich als unabhängiger Prognosefaktor nach Einschluß von wesentlichen klinischen Faktoren im multivariaten Modell.

Bei Untersuchung der prognostischen Bedeutung der OH-Einnahme im Vergleich zu der etablierter Prognosefaktoren erwies sich die Langzeiteinnahme (>60 Monate: HR 0.60) als weiterer unabhängiger Faktor. Von den untersuchten OH-Einnahmecharakteristika hatte nur noch der Abstand der ersten OH-Einnahme zur Diagnose signifikante Bedeutung für die Prognose der Erkrankung. Bei erster OH-Einnahme 8 bis 11 Jahre (HR 0.49) oder 12 bis 16 Jahre (HR 0.66) vor der Diagnose war das Risiko, am Mammakarzinom zu sterben, deutlich niedriger als ohne OH-Einnahme.

Zur Darstellung des zeitlichen Bezugs der OH-Einnahme zur Diagnose wurde die Prognose in Abhängigkeit von der Einnahmedauer und dem Abstand der ersten Einnahme analysiert. Dabei zeigte es sich, daß Patientinnen, die ausschließlich während der letzten zwei Jahre vor der Diagnose OH eingenommen hatten, eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen als Patientinnen, die nie OH eingenommen hatten (HR 2.29 bis 3.80).

Patientinnen dagegen, die mit der OH-Einnahme bereits mehr als fünf Jahre vor der Diagnose begonnen hatten, wiesen eine signifikant bessere Prognose auf, als die ohne OH-Einnahme (HR 0.28 bis 0.58).

Insgesamt zeigte es sich, daß Patientinnen, die im 5.-8. Jahr vor der Diagnose OH eingenommen hatten, die stärkste Reduktion des Sterberisikos aufwiesen (HR 0.44). Auch für andere mehrjährige Zeitintervalle zwischen dem 3. und 9. Jahr vor der Diagnose der Erkrankung war die Risikoreduktion signifikant, wenn die OH-Einnahme in den Zeitraum zwischen dem 5. und 8. Jahr vor der Diagnose hineinreichte (HR 0.46 bis 0.60).

Wurde die Prognose in Abhängigkeit von der Einnahme verschiedener Gestagenkomponenten untersucht, war eine signifikante Reduktion des Sterberisikos zu verzeichnen, wenn die Patientinnen NETA-haltige Einphasenpräparate verwendet hatten. Dieser günstige Effekt war unabhängig vom Einnahmeverhalten nachweisbar und zeigte sich bei überwiegender (HR 0.45), ausschließlicher (HR 0.30) und jemaliger Einnahme (HR 0.62) sowie auch bei Verwendung von NETA-haltigen Einphasenpräparaten bei Ersteinnahme (HR 0.38). Der Anteil von NETA-haltigen unter den übrigen OH war allerdings im 5.-8. Jahr vor der Diagnose signifikant höher als für alle anderen Einnahmezeiten ( $p < 0.01$ ).

Bei der Untersuchung des prognostischen Einflusses hormonell-reproduktiver- und anderer epidemiologischer Faktoren hatten sowohl die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr als auch die Einnahme NETA-haltiger Einphasenpräparate größere Bedeutung für die Prognose der Erkrankung als die untersuchten Reproduktionsvariablen.

Die OH-Einnahme im 5.-8. Jahr vor der Diagnose bewahrte ihre prognostische Signifikanz über die gesamte Periode des Follow-up (HR 0.23 bis 0.54). Nur der LK-Status übertraf die prognostische Wertigkeit dieses OH-Einnahmezeitraumes (HR 1.79 bis 2.45). Auch die Einnahme NETA-haltiger OH zeigte ihren prognostischen Einfluß noch im 4. Jahr nach der Diagnose und übertraf damit den Einfluß von histologischem Grading, Tumorgröße und PR-Status. Der histologische Tumortyp war als dritter Prognosefaktor über einen längeren Zeitraum signifikant und verlor seine Bedeutung erst im 8. Jahr nach der Diagnose des Mammakarzinoms. Alle anderen histomorphologischen Faktoren waren nur für die ersten Jahre nach der Diagnose von unabhängiger Bedeutung für die Prognose der Erkrankung.

Damit erreichte die prognostische Bedeutung der exogenen Hormonzufuhr durch die OH-Einnahme nahezu die des LK-Status.

Der Einfluß der OH-Einnahme auf die Tumorbiologie und die Prognose der Erkrankung scheint vom erreichten Entwicklungsstadium des Tumors zum Einnahmezeitpunkt abhängig zu sein. Offenbar ist die OH-Einnahme über einen solchen biologisch sensiblen Zeitraum während der Karzinomentstehung von größerer Bedeutung als die Dauer der Einnahme. In Abhängigkeit vom Einnahmezeitpunkt hat die OH-Einnahme möglicherweise eine frühe differenzierungsfördernde und eine späte proliferationsstimulierende Wirkung für den Tumor und seine Metastasen.

## Literaturverzeichnis

- Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjanen K: Prognostic factors after 5years follow-up in female breast cancer. *Oncology* 49 (1992) 93-98
- Aaltomaa S, Lipponen P, Papinaho S, Syrjänen K: Proliferating-cell nuclear antigen (PC10) immunolabeling and other proliferation indices as prognostic factors in breast cancer. *J Cancer Clin Oncol* 119 (1993) 288-294
- Adami HO, Malher B, Holmberg L, Persson I, Stone B: The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med* 315 (1986) 559-563
- Ahmed S, Tartert PI, Jothy S, Brower ST, Bratton J: The prognostic significance of previous benign breast disease for women with carcinoma of the breast. *J Am Coll Surg* 183 (1996) 101-104
- Alexieva-Figusch J, van Putten WLJ, Blankenstein MA, Blonk-van der Wijst J, Klijn JGM: The prognostic value and relationships of patient characteristics, estrogen and progesterin receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer* 61 (1988) 758-768
- Al-Idrissi HY, Ibrahim EM, Kurashi NY, Sawayan SA: Breast cancer in a low-risk population. The influence of age and menstrual status on disease pattern and survival in Saudi Arabia. *Int J Cancer* 52 (1992) 48-51
- Anderson TJ, Battersby S, King RBJ, McPherson K, Going JJ: Oral contraceptive use influences resting breast proliferation. *Human Pathol* 20 (1989) 1139-1144
- Anderson TJ, Ferguson DJP, Raab GM: Cell turnover in the „resting“ human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer* 46 (1982) 376-382
- Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KPH, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D, Toronto Breast Cancer Study Group: C-erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 16 (1998) 1340-1349
- Antoniotti S, Taverna D, Sapei ML, Hynes NE, De Bortoli M: Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer* 70 (1994) 1095-1101
- Arriagada R, Rutqvist LE, Skoog L, Johansson H, Kramar A: Prognostic factors and natural history in lymph node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 21 (1992) 101-109
- Astrow AB: Timing of breast cancer surgery, nodes, hormones and retrospectoscopy. *Lancet* 343 (1994) 1517-1518
- Auvinen A, Elovianio L, Hakama M: Breast self-examination and survival from breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 38 (1996) 161-168
- Badwe RA, Gregory WM, Chaudary MA, Richards MA, Bentley AE, Rubens RD, Fentiman IS: Timing of surgery during menstrual cycle and survival of premenopausal women with operable breast cancer. *Lancet* 337 (1991) 1261-1264
- Baptista J, Pike M: Exact confidence limits for the odds-ratio in a two by two table. *Appl Stat* 26 (1977) 214-220
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319 (1986) 226-229
- Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR: Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 24 (1993) 469-476
- Bässler R: Pathologie der Brustdrüse. In: Spezielle Pathologische Anatomie. Hrsg.: Doerr W, Uehlinger E, Seifert G, Vol 11 Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1978
- Bässler R, Bocker W, Hermanek P, Pickartz H, Prechtel K, Schauer A, Schnurch HG, Stegner HE: Die gegenwärtige Situation des Gradings beim Mammakarzinom. *Pathologe* 13 (1992) 130-134
- Bates SE, Davidson NE, Valverius EM, Freter CE, Dickson RB, Tam JP, Kudlow JE, Lippman ME, Salomon DS: Expression of transforming growth factor (and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: Its regulation by estrogen and its possible significance. *Mol Endocrinol* 2 (1988) 543-555

- Battersby S, Anderson TJ: Histological changes in breast tissue that characterize recent pregnancy. *Histopathology* 15 (1989) 415-419
- Battersby S, Robertson BJ, Anderson TJ, King RJB, McPherson K: Influence of menstrual cycle, parity and oral contraceptive use on steroid hormone receptors in normal breast. *Br J Cancer* 65 (1992) 601-607
- Beckmann MW, Niederacher D, Massenkeil G, Tutschek B, Beckmann A, Schenko G, Schnurch HG, Bender HG: Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: No advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer. *Oncology* 53 (1996) 441-447
- Beral V, Hermon C, Kay C, Hannaford P, Darby S, Reeves G: Mortality associated with oral contraceptive use: 25 year follow up cohort of 46000 women from Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *BMJ* 318 (1999) 96-100
- Beral V, Reeves G, Bull D, Peto R: Comment, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 348 (1996) 683
- Berg JW, Hutter VP: *Breast Cancer*. *Cancer* 75 (1995) 257-269
- Bergkvist L, Adami HO, Persson I, Bergstrom R, Krusemo UB: Prognosis after breast cancer diagnosis in women exposed to estrogen and estrogen-progestogen replacement therapy. *Am J Epidemiol* 130 (1989) 221-228
- Bernoux A, de Cremoux P, Lainé-Bidron C, Martin EC, Asselain B, Magdelénat H: Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer: Pathological characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* 49 (1998) 219-225
- Berry DL, Theriault RL, Holmes FA, Parisi VM, Booser DJ, Singletary SE, Buzdar AU, Hortobagyi GN: Management of breast cancer during pregnancy using a standardized protocol. *J Clin Oncol* 17 (1999) 855-861
- Bertheau Ph, Steinberg SM, Merino MJ: C-erbB-2, p53, and nm23 gene product expression in breast cancer in young women: Immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 29 (1998) 323-329
- Bianchi S, Calzolari A, Vezzosi V, Zampi G, Cardona G, Cataliotti L, Bonardi R, Ciatto S: Lack of prognostic value of p53 protein expression in node-negative breast cancer. *Tumori* 83 (1997) 669-672
- Bianco AR, Mastro LD, Gallo C, Perrone F, Matano E, Pagliarulo C, De Placido S: Prognostic role of amenorrhoe induced by adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with early breast cancer. *Br J Cancer* 63 (1991) 799-803
- Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA: Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 14 (1996) 1718-1729
- Black M, Hankey BF, Barclay THC: Parity as a prognostic factor in young breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 70 (1983) 27-30
- Black WC, Bordin GM, Varsa EW, Herman D: Histologic comparison of mammary carcinomas among a population of southwestern American Indian, Spanish American and Anglo women. *Am J Clin Pathol* 71 (1978) 142-145
- Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis of breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11 (1957) 359-377
- Bonnier P, Romain S, Giacalone PL, Laffargue F, Martin PM, Piana L: Clinical and biologic prognostic factors in breast cancer diagnosed during postmenopausal hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol* 85 (1995) 11-17
- Bosari, S., A.K.C. Lee, G. Viale, G.J. Heatley, G. Coggi: Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Archiv A Pathol. Anat.* 421 (1992) 291-295
- Bradbury JM, Arno J, Edwards AW: Induction of epithelial abnormalities that resemble human breast lesions by the expression of the neu/erbB-2 oncogene in reconstituted mouse mammary gland. *Oncogene* 8 (1993) 1551-1558
- Brocklehurst D, Wilde CE, Finbow JAH, Brett R, Champion AE, Dewhurst DG: Relative importance of estrogen and progesterone receptor assays as prognostic indicators in primary breast cancer: a short-term study. *Clin Chem* 35 (1989) 238-240
- Bulbrook RD, Swain MC, Wang DY, Hayward JL, Kumaoka S, Takatani O, Abe O, Utsunomiya J: Breast cancer in Britain and Japan: Plasma oestradiol-17 $\beta$ , Oestrone and

Progesterone, and their urinary metabolites in normal British and Japanese women. *Eur J Cancer* 12 (1976) 725-735

Bulbrook RD, Thomas BS: Hormones are ambiguous risk factors for breast cancer. *Acta Oncol* 28 (1989) 841-847

Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63 (1989) 181-187

Catherino WH, Jeng MH, Jordan VC: Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through an oestrogen receptor mediated mechanism. *Br J Cancer* 67 (1993) 945-952

Chang KJ, Lee TTY, Linares-Gruz G, Fournier S, de Lignières B: Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle in vivo. *Fertil Steril* 63 (1995) 785-791

Chang S, Hulka BS, Baird DD, Ingle JN, Newman B, Graham ML 2nd, Qaqish B, Donohue JH, Melton LJ 3rd: Breast cancer survival and the timing of tumor removal during the menstrual cycle. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6 (1997) 881-886

Chapman JW, Murray D, McCready, Hanna W, Kahn HJ, Lickley HLA, Trudeau ME, Mobbs BG, Sawka CA, Fish EB, Pritchard KI: An improved statistical approach: Can it clarify the role of new prognostic factors for breast cancer? *Eur J Cancer* 32A (1996) 1949-1956

Chevallier B, Heintzmann F, Mosseri V, Dauce JP, Bastit Ph, Graic Y, Brunelle Ph, Basuyau JP, Comoz M, Asselain B: Prognostic value of estrogen and progesteron receptors in operable breast cancer. *Cancer* 62 (1988) 2517-2524

Chilvers CED, Deacon JM: Oral contraceptives and breast cancer. *Br J Cancer* 61 (1990) 1-4

Chrysogelos SA, Ronit IY, Lauber AH, Murphy JM: Mechanisms of EGF receptor regulation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 31 (1994) 227-236

Clark GM, Sledge GW, Osborne CK, McGuire WL: Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 5 (1987) 55-61

Clark GM, McGuire WL: The clinical usefulness of estrogen-receptor and other markers of hormone dependence. *Proc Royal Soc Edinburgh* 95B (1989) 145-150

Clark GM: Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 30 (1994) 117-126

Clarke CL and Sutherland RL: Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocrine Rev* 11 (1990) 266-301

Cobleigh MA, Norlock FE, Oleske DM, Starr A: Hormone replacement therapy and high S phase in breast cancer. *JAMA* 281 (1999) 1528-1530

Cole PT: Oral contraceptives and breast neoplasia. *Cancer* 39 (1977) 1906-1908

Coletta AA, Wakefield LM, Howell FV, Danielpour D, Baum M, Sporn MB: The growth inhibition of human breast cancer cells by a novel synthetic progestin involves the induction of transforming growth factor beta. *J Clin Invest* 87 (1991) 227-238

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347 (1996) 1713-1727

Collett K, Skjarven, Mahle BO: The prognostic contribution of estrogen and progesterone receptor status to a modified version of the Nottingham Prognostic Index. *Breast Cancer Res Treat* 48 (1998) 1-9

Cooper JA, Rohan TE, Cant ELMcK, Horsfall DJ, Tilley WD: Risk factors for breast cancer by estrogen receptor status: a population-based case-control study. *Br J Cancer* 59 (1998) 119-125

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK; Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes). *J Histochem Cytochem* 32 (1984) 219-229

Correa P, Johnson WD: International variation in the histology of breast carcinoma. *UICC Techn Rep Series* 35 (1978) 36-65

Cowley BD, Chadwick LJ, Grantham JJ, Calvet JP: Sequential protooncogene expression in regenerating kidney following acute renal injury. *J Biol Chem* 264 (1989) 8389-8393

Cox DR: Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 34 (1972) 137-220



- Cullen KJ, Lippman ME: Estrogen regulation of protein synthesis and cell growth in human breast cancer. *Vitamins and Hormones* 45 (1989) 127-172
- Dalton LW, Page DL, Dupont WD: Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 73 (1994) 2765-2770
- Darbre PhD, King RJB: Progression to steroid insensitivity can occur irrespective of the presence of functional steroid receptors. *Cell* 51 (1987) 521-528
- Dati C, Antoniotti S, Taverna D, Perroteau I, DeBortoli M: Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene* 5 (1990) 1001-1006
- De Bortoli M, Dati C, Antoniotti S, Maggiora P, Sapei ML: Hormonal regulation of c-erbB-2 oncogene expression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43 (1992) 21-25
- De Potter CR, Schelfhout AM: The neu-protein and breast cancer. *Virchows Arch* 426 (1995) 107-115
- Di Fronzo G, Coradini D, Cappeletti V, Miodini P, Granata G, Schwartz M, Panko WB: Hormone receptors and disease-free survival in breast cancer: impact of increasing threshold levels. *Anticancer Res* 10 (1990) 1699-1706
- Di Lieto A, De Rosa G, Albano G, Pagnano AM, Campanile M, Terracciano L, Pontillo M, Cimmino E, Covelli A, Paladini A: Desogestrel versus Gestodene in oral contraceptives: Influence on the clinical and histomorphological features of benign breast disease. *Eur J Obstet Gynecol* 55 (1994) 71-83
- Dickson RB, McManaway ME, Lippman ME: Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. *Science* 32 (1986a) 1540-1543
- Dickson RB, Huff KK, Spencer EM, Lippman ME: Induction of epidermal growth factor-related polypeptides by 17 $\beta$ -estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 118 (1986b) 138-142
- Dickson RB, Lippman ME: Estrogen regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Rev*: 8 (1986) 29-43
- Dickson RB, Lippman ME: Growth factors in breast cancer. *Endocrine Rev* 16 (1995) 559-589
- Dittadi R, Donisi PM, Brazzale A, Cappellozza L, Bruscaignin G, Gion M: Epidermal growth factor receptor in breast cancer. Comparison with non-malignant breast tissue. *Br J Cancer* 67 (1993) 7-9
- Donegan WL, Perez-Meza EM: Lobular carcinoma - an indication for elective biopsy of the second breast. *Amer Surg* 176 (1972) 178-185
- Dorgan JF, Reichman ME, Judd JT, Brown C, Longcope C, Schatzkin A, Campbell WS, Franz C, Kahle L, Taylor PR: Relationships of age and reproductive characteristics with plasma estrogens and androgens in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4 (1995) 381-386
- Dougall WC, Qian X, Creene MI: Interaction of the Neu/p185 and EGF-R tyrosine kinases: implications for cellular transformation and tumor therapy. *J Cell Biochem* 53 (1993) 61-73
- Ebeling K, Ray R, Nischan P, Thomas DB, Kunde D, Stalsberg H: Combined oral contraceptives containing chlormadinone acetate and breast cancer: results of a case-control study. *Br J Cancer* 63 (1991) 804-808
- Eissa S, Khalifa A, el Gharib A, Salah N, Mohamed MK: Multivariate analysis of DNA ploidy, p53, c-erbB-2 proteins, EGFR, and steroid hormone receptors for short-term prognosis in breast cancer. *Anticancer Res* 17 (1997) 3091-3097
- Elledge RM, Allred DC: The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. (Review). *Breast Cancer Res Treat* 32 (1994) 39-47
- Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL: Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 26 (1993) 225-235
- Elledge RM, Allred DC: Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 79-98
- Elwood JM, Godolphin W: Oestrogen receptors in breast tumours: association with age, menopausal status and epidemiological and clinical features in 735 patients. *Br J Cancer* 42 (1980) 635-644
- Encarnacion CA, Ciocca DR, McGuire WL, Clark GM, Fuqua SAW, Osborne CK: Measurement of steroid hormone receptors in breast cancer patients on tamoxifen. *Breast Cancer Res*

- Treat 26 (1993) 237-246
- Ewertz M, Gillander S, Meyer L, Zedeler K: Survival of breast cancer patients in relation to factors which affect the risk of developing breast cancer. *Int J Cancer* 49 (1991) 526-530
- Fechner RE: Breast cancer during oral contraceptive therapy. *Cancer* 26 (1970) 1204-1211
- Fentiman IS, Gregory WM, Richards MA: Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. *Comment. Lancet* 344 (1994) 402
- Fentiman IS, Gregory WM: The hormonal milieu and prognosis in operable breast cancer. *Cancer Surveys* 18 (1993) 149-163
- Fernandez-Pol JA: Modulation of EGF-Receptor protooncogene expression by growth factors and hormones in human breast carcinoma cells. *Oncogenesis* 2 (1991) 173-185
- Fisher ER, Taylor M: Changing patterns of some pathologic parameters of mammary carcinomas. *Cancer* 32 (1973) 1380-1391
- Fisher B, Gunduz N, Coyle J, Rudock C, Saffer E: Presence of growth stimulating factor in serum following primary tumour removal in mice. *Cancer Res* 49 (1989) 1996-2001
- Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project Protocol B-06. *Cancer* 71 (1993) 2507-2514
- Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, Barnes DM, Millis RR: Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 69 (1994) 26-31
- Fournier von D, Weber E, Hoeffken W, Bauer M, Kubli F, Barth V: Growth rate of 147 mammary carcinomas. *Cancer* 45 (1980) 2198-2207
- Fournier von D, Abel U, Spratt JA, Anton HW: Wachstumsgeschwindigkeit des Mammakarzinoms, Bedeutung für Früherkennung und Therapieeffekte. *Geburtshilfe-Frauenheilkd* 54 (1994) 286-290
- Fowble B, Hanlon AL, Patchefsky A, Freedman G, Hoffman JP, Sigurdson ER, Goldstein LJ: The presence of proliferative breast disease with atypia does not significantly influence outcome in early-stage invasive breast cancer treated with conservative surgery and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (1998) 105-115
- Fox SB, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Hastrich D, Harris AL: The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: Results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res Treat* 29 (1994) 41-49
- Freiss G, Prébois C, Vignon F: Control of breast cancer cell growth by steroids and growth factors: Interactions and mechanisms. *Breast Cancer Res Treat* 27 (1993) 47-68
- Fuqua SAW, Hill StM, Chamness GC, Benedix MG, Greene GL, O'Malley BW, McGuire WL: Progesteron receptor gene restriction fragment length polymorphisms in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 83 (1991) 1157-1160
- Fuqua SAW: Abnormalities of the estrogen receptor in breast cancer - introduction. *Breast Cancer Res Treat* 26 (1993) 117-118
- Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22 (1992) 207-219
- Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA: Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology. *JAMA* 281 (1999) 2091-2097
- Gasparini G, P. Bevilacqua, F. Pozza, S. Meli, P. Boracchi, E. Marubini, J.R.C. Sainsbury: Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer. *Br J Cancer* (1992) 970-976
- Gasparini G, Boracchi P, Verderio P, Bevilacqua P: Cell kinetics in human breast cancer: comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric S-phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. *Int J Cancer* 57 (1993) 822-829
- Gasparini G, Boracchi P, Bevilacqua P, Mezzetti M, Pozza F, Weidner N: A multiparametric study on the prognostic value of epidermal growth factor receptor in operable breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 29 (1994a) 59-71
- Gasparini G, Gullick WJ, Maluta S, Palma PD, Caffo O, Leonardi E, Boracchi P, Pozza F, Lemoine NR, Bevilacqua P: C-erbB-3 and c-erbB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma - an immunocytochemical study. *Eur J Cancer* 30A (1994b) 16-22
- Gasparini G, Toi M, Verderio P, Ranieri G, Dante S, Bonoldi E, Boracchi P, Fanelli M, Tominaga T: Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in

- operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol* 12 (1998) 1117-1125
- Gelber RD, Goldhirsch A: Menstrual effect on surgical cure of breast cancer. *Lancet* // (1989) 1343-1344
- Ghahary A, Murphy LJ: Uterine insulin-like growth factor-I receptors: regulation by estrogen and variation throughout the oestrous cycle. *Endocrinology* 125 (1989) 597-604
- GIVIO (Interdisciplinary Group for Cancer Care Evaluation): Oestrogen receptor status and risk factors for breast cancer. *Oncology* 45 (1988) 303-307
- Glass K, Hoover RN: Rising incidence of breast cancer: relationship to stage and receptor status. *J Natl Cancer Inst* 82 (1990) 693-696
- Goldhirsch A, Gelber RD, Castiglione M, O'Neill A, Thurlimann B, Rudenstam CM, Lindtner J, Collins J, Forbes J, Crivellari D, Coates A, Cavalli F, Simoncini E, Fey MF, Pagani O, Price K, Senn HJ: Menstrual cycle and timing of breast surgery in premenopausal node-positive breast cancer: results of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG) Trial VI. *Ann Oncol* 8 (1997) 751-756
- Gompel A, Martin A, Simon P, Plu-Bureau G, Hugol D, Audouin J, Leygue E, Truc JB, Poitout Ph: Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. *Breast Cancer Res Treat* 38 (1996) 227-235
- Granata G, Coradini D, Cappelletti V, Fronzo GD: Prognostic relevance of cathepsin D versus oestrogen receptors in node negative breast cancers. *Eur J Cancer* 27 (1991) 970-972
- Grant ECG, Antony HM, Myhill S, Price EH, Steel CM: Breast cancer and hormone exposure. *Lancet* 348 (1996) 682
- Greenberg ER, Vessey MP, McPherson K, Doll R, Yeates D: Body size and survival in premenopausal breast cancer. *Br J Cancer* 51 (1985) 691-697
- Guinee VF, Olsson H, Moller T, Hess KR, Taylor SH, Fahey T, Gladikov JV, van den Blink JW, Bonichon F, Dische S, Yares JW, Cleton FJ: Effect of pregnancy on prognosis for young women with breast cancer. *Lancet* 343 (1994) 1587-1589
- Gullick WJ: Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *British Med Bulletin* 47 (1991a) 87-98
- Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, Altman DG: C-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 63 (1991b) 434-438
- Guzman RC, Yang J, Rajkumar L, Thordarson G, Chen X, Nandi S: Hormonal prevention of breast cancer: mimicking the protective effect of pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 2520-2525
- Hackenberg R, Hawighorst Th, Filmer A, Huschmand N, Schulz KD: Medroxyprogesterone acetate inhibits the proliferation of estrogen-and progesterone-receptor negative MFM-223 human mammary cancer cells via the androgen receptor. *Breast Cancer Res Treat* 25 (1993) 217-224
- Haerslev T, Jacobson GK, Zedeler K: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma with correlations to histopathological parameters and prognosis. *Oncology Reports* 2 (1995) 99-105
- Haerslev T, Jacobson GK, Zedeler K: Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 37 (1996) 101-113
- Hall PA, Levison PA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162 (1990) 285-294
- Hanna W, Schneider M: Enhancement of tumour metastasis and suppression of natural killer cell activity by  $\beta$ -oestradiol treatment. *J Immunol* 130 (1982) 974-980
- Hargreaves DF, Knox F, Swindell R, Potten CS, Bundred NJ: Epithelial proliferation and hormone receptor status in the normal post-menopausal breast and the effects of hormone replacement therapy. *Br J Cancer* 78 (1998) 945-949
- Harlap S, Zauber AG, Pollack DM, Tang J, Arena AE, Sternfels P, Borgen P, Norton L: Survival of premenopausal women with breast carcinoma. Effects of menstrual timing of surgery. *Cancer* 83 (1998) 76-88

- Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Wilett W: Breast cancer. *N Engl J Med* 327 (1992) 319-328
- Hartmann LC, Sebo TJ, Kamel NA, Podratz KC, Cha SS, Wieand HS, Keeney GL, Roche PC: Proliferating Cell Nuclear Antigen in epithelial ovarian cancer: relation to results at second look laparotomy and survival. *Gynecol Oncol* 47 (1992) 191-195
- Hawkins RA, Tesdale AL, Killen ME, Jack WJL, Chetty U, Dixon JM, Hulme MJ, Prescott RJ, McIntyre MA, Miller WR: Prospective evaluation of prognostic factors in operable breast cancer. *Br J Cancer* 74 (1996) 1469-1478
- Hemminki E: Oral contraceptives and breast cancer. *Br Med J* 313 (1996) 63-64
- Hilsenbeck SG, Ravdin PM, Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM: Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 227-237
- Holmberg L, Ekblom A, Calle E, Mokdad A, Byers T: Breast cancer mortality in relation to self-reported use of breast self-examination. A cohort study of 450.000 women. *Breast Cancer Res Treat* 43 (1994) 137-140
- Horwitz KB: Mechanisms of hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 26 (1993) 119-130
- Howell A, Dodwell DJ, Anderson H, Redford J: Response after withdrawal of tamoxifen and progestogens in advanced breast cancer. *Ann Oncol* 3 (1992) 611-617
- Hrushesky WJM, Bluming AZ, Gruber SA, Sothorn RB: Menstrual influence on surgical cure of breast cancer. *Lancet* II (1989) 9949-9952
- Hsieh CC, Crosson AW, Walker AM, Trapido EJ, Mac-Mahon B: Oral contraceptive use and fibrocystic breast disease of different histological classifications. *J Natl Cancer Inst* 72 (1984) 285-292
- Hulka BS, Chambless LE, Wilkinson WE, Deubner DC, McCarty KS Sr, McCarty KS Jr: Hormonal and personal effects on estrogen receptors in breast cancer. *Am J Epidemiol* 119 (1984) 692-704
- Hulman G, Trowbridge P, Taylor CN, Chilvers CED, Sloane JP, UK National Case-Control Study Group: Oral contraceptive use and histopathology of cancerous breasts in young women. *J Pathol* 167 (1992) 407-411
- Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK: Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line. *J Biol Chem* 270 (1995) 28507-28510
- Hurd C, Khattree N, Dinda S, Alban P, Moudgil VK: Regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, by estrogen and antiestrogens in breast cancer cells. *Oncogene* 15 (1997) 991-995
- Hurd C, Dinda S, Khattree N, Moudgil VK: Estrogen-dependent and independent activation of the P1 promoter of the p53 gene in transiently transfected breast cancer cells. *Oncogene* 18 (1999) 1067-1072
- Hynes NE: Amplification and overexpression of the c-erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor and potential as a target for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 4 (1993) 19-26
- Inano H, Suzuki K, Onoda M, Kobayashi H, Wakabayashi K: Comparative effect of chlormadinone acetate and diethylstilbestrol as promoters in mammary tumorigenesis of rats irradiated with  $\gamma$ -rays during lactation. *Breast Cancer Res Treat* 53 (1999) 153-160
- Jatoi I: Timing of surgery for primary breast cancer with regard to the menstrual phase and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 217-225
- Jeng MH, Jordan VC: Growth stimulation and differential regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3 messenger RNA levels by Norethindrone in MCF-7 human breast cancer cells. *Molec Endocrin* 5 (1991) 1120-1128
- Jeng MH, Parker CJ, Jordan VC: Estrogenic potential of progestins in oral contraceptives to stimulate human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res* 52 (1992) 6359-6546
- Jordan VC: A therapeutic withdrawal can make a strategic advance. *Ann Oncol* 3 (1992) 587-588
- Jordan VC, Jeng MH, Catherino WH, Parker CJ: The estrogenic activity of synthetic progestins used in oral contraceptives. *Cancer* 71 (1993) 1501-1505
- Juret P, Couette JE, Mandard AM, Carre A, Delozier T, Brune D, Vernhes JC: Age at menarche as a prognostic factor in human breast cancer. *Eur J Cancer* 12 (1976) 701-704
- Kaelin WG: J Natl The emerging p53 gene family. Review. *Cancer Inst* 91 (1999) 594-598

- Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53 (1958) 457-481
- Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ, Berthois Y: Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and in the long-term absence of estrogens. *Cancer Res* 47 (1987) 4355-4360
- Kay CR, Hannaford PC: Breast cancer and the pill - a further report from the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *Br J Cancer* 58 (1988) 675-680
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM: Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15 (1993) 36-47
- King RJB: Biology of female sex hormone action in relation to contraceptive agents and neoplasia. *Contraception* 43 (1991) 527-542
- King RJB: Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 27 (1993) 3-15
- Kleist S von: Prognostic factors in breast cancer: Theoretical and clinical aspects (review). *Anticancer Res* 16 (1996) 3907-3912
- Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmitz PIM, Foekens JA: The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Rev* 13 (1992) 3-17
- Klijn JGM, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figusch J, van Putten WLJ, Foekens JA: The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: Results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 29 (1994) 73-83
- Kloosterboer HJ, Schoonen WGEJ, Deckers GH, Klijn JGM: Effects of progestagens and Org OD14 in in vitro and in vivo tumor models. *J Steroid Biochem Molec Biol* 49 (1994) 311-318
- Koga M, Musgrove EA, Sutherland RL: Modulation of the growth-inhibitory effects of progestins and the antiestrogen hydroxycyclophosphamide in human breast cancer cells by epidermal growth factor and insulin. *Cancer Res* 49 (1989) 112-116
- Kordon EC, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C: Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. *Breast Cancer Res Treat* 28 (1993) 29-39
- Korzeniowski St, Dyba St: Reproductive history and prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer* 74 (1994) 1591-1594
- Koscielny S, Tubiana M, Valleron AJ: A simulation model of the natural history of human breast cancer. *Br J Cancer* 52 (1985) 515-524
- Kristen P, Müller JG, Caffier H: Prognostic relevance of p53 in node negative breast cancer. *Anticancer Res* 17 (1997) 2869-2871
- Kroman N, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Westergaard T, Melbye M: Time since childbirth and prognosis in primary breast cancer: population based study. *Br Med J* 315 (1997) 851-853
- Kroman N, Wohlfahrt J, West Andersen K, Mouridsen HT, Westergaard T, Melbye M: Parity, age at first childbirth and the prognosis of primary breast cancer. *Br J Cancer* 78 (1998) 1529-1533
- Kronqvist P, Montironi R, Collan YU, Bartels PH, Thompson D: Management of uncertainty in breast cancer grading with Bayesian belief networks. *Anal Quant Cytol Histol* 17 (1995) 300-308
- Kronqvist P, Montironi R, Kuopio T, Collan YU: Subjective breast cancer grading. Analysis of reproducibility after application of Bayesian belief networks. *Anal Quant Cytol Histol* 19 (1997) 423-429
- Kurebayashi J, Sonoo H, Shimozuma K: Timing of surgery in relation to the menstrual cycle and its influence on the survival of Japanese women with operable breast cancer. *Surg Today* 25 (1995) 519-524
- Kuttann F, Mouffarege A, Mauvais-Jarvis P: The hormonal basis of discontinuous progestational contraception. *Nouv Presse Med* 7 (1978) 3109-3113
- Lakhani SR: The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. Review article. *J Pathol* 187 (1999) 272-278
- Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami HO: Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med* 331 (1994) 5-9

- Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM: Induction of protooncogene JUN/AP-1 by serum in TPA. *Nature* 334 (1988) 629-631
- Lees AW, Jenkins HJ, May CL, Cherian G, Lam EWH, Hanson J: Risk factors and 10-year breast cancer survival in northern Alberta. *Breast Cancer Res Treat* 13 (1989) 143-151
- Lehrer ST, Levine E, Savoretti P, Cropley J, Botstein Ch, Kyung Song H, Mandell L, Shank B: Past pregnancy is associated with axillary node involvement in women with breast cancer. *Cancer* 69 (1992) 981-983
- Leinster SJ: Impact of molecular biology on the clinical management of breast cancer. *Biochem Soc Symp* 63 (1998) 185-191
- Lemon HM, Rodriguez-Sierra JF: Timing of breast cancer surgery during the luteal menstrual phase may improve prognosis. *Nebr Med J* 81 (1996) 73-78
- Lemon HM, Rodriguez-Sierra JF: Ethnic differences in estrogen metabolism in healthy women. (letter) *J Natl Cancer Inst* 89 (1997) 1626-1628
- Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, Barbareschi M: PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 45 (1992) 416-419
- Lesser ML, Rosen PP, Senie RT, Duthie K, Menendez-Botet CJ, Schwartz MK: Estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma: correlations with epidemiology and pathology. *Cancer* 48 (1981) 299-309
- Levesque MA, Katsaros D, Giai M, Genta F, Roagna R, Ponzzone R, Massobrio M, Sismondi P, Diamandis EP: Immunofluorometrically determined p53 accumulation as a prognostic indicator in Italian breast cancer patients. *Int J Cancer* 79 (1998) 147-152
- Levine AJ: P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (1997) 323-331
- Lippman ME, Dickson RB, Bates S, Knabbe C, Huff K, Swain S, McManaway M, Bronzert D, Kasid A, Gelmann EP: Autocrine and paracrine growth regulation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 7 (1986) 59-70
- Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Syrjänen K: The changing importance of prognostic factors in breast cancer during long-term follow-up. *Int J Cancer* 51 (1992) 698-702
- Longrace TA; Bartow SA: A correlative morphologic study of human breast and endometrium in the menstrual cycle. *Am J Surg Pathol* 10 (1986) 382-393
- Lonn U, Lonn S, Nilsson B, Stenkvist B: Prognostic significance of c-erbB-2 amplification in fine-needle biopsies of breast cancer patients not operated at diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* 39 (1996) 213-220
- Low SC, Galea MH, Blamey RW: Timing breast cancer surgery. *Lancet* 338 (1991) 691
- Lupu R, Lippman M: The role of erbB2 signal transduction pathways in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 27 (1993) 83-93
- Luthy IA, Bégin DJ, Labrie F: Androgenic activity of synthetic progestins and spironolactone in androgen-sensitive mouse mammary carcinoma (Shionogo) cells in culture. *J Steroid Biochem* 31 (1988) 845-852
- Magnusson C, Holmberg L, Norden T, Lindgren A, Persson I: Prognostic characteristics in breast cancers after hormone replacement therapy. *Breast Cancer Res Treat* 38 (1996) 325-334
- Manni A, Wright C, Badger B, Bartholomew M, Herlyn M, Mendelsohn J, Masui H, Demers L: Role of transforming growth factor- $\alpha$ -related peptides in the autocrine/paracrine control of experimental breast cancer growth in vitro by estradiol, prolactin and progesterone. *Breast Cancer Res Treat* 15 (1990) 73-83
- Marcus JN, Watson P, Page DL, Lynch HT: Pathology and heredity of breast cancer in young women. *Mongr Natl Cancer Inst* 16 (1994) 23-34
- Markopoulos C, Berger U; Wilson P, Gazet JC, Coombes RC: Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *BMJ* 296 (1988) 1349-1351
- Marth C, Lang T, Cronauer MV, Doppler W, Zeimet AG, Bachmair F, Ullrich A, Daxenbichler M: Epidermal growth factor reduces HER-2 protein level in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 52 (1992) 311-316
- Martinez V, Azzopardi JG: Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variations. *Histopathol* 3 (1979) 467-488
- Matthews PN, Millis RR, Hayward JL: Breast cancer in women who have taken contraceptive

- steroids. *Br med J* 282 (1981) 774-776
- Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Gompel A: Antiestrogen action of progesterone in breast tissue. *Hormone Res* 28 (1987) 212-218
- McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BMJ, Carney DN: Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 51 (1991) 3296-3303
- McCredie M, Paul Ch, Skegg DCG, Williams S: Reproductive factors and breast cancer in New Zealand. *Int J Cancer* 76 (1998) 182-188
- McCulloch P, Choy A: Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. *Lancet* 344 (1994) 402-403
- McGuire WL: The optimal timing of mastectomy: low tide or high tide? *Ann Intern Med* 115 (1991) 401-403
- McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG: The normal menopause transition. *Maturitas* 14 (1992) 103-115
- McMahon B, List ND, Eisenberg H: Relationship of survival of breast cancer patients to parity and menopausal status. In: Forrest APM, Kunkler PB (eds) *Prognostic Factors in Breast Cancer*, Williams and Wilkins, Baltimore, (1968) 5
- McMahon B: Reproduction and breast cancer of the breast. *Cancer* 71 (1993) 3185-3188
- McPherson K, Vessey MP, Neil A, Doll R, Jones L, Roberts M: Early oral contraceptive use and breast cancer: Results of another case-control study. *Br J Cancer* 56 (1987) 653-660
- McTiernan A, Thomas DB, Johnson LK, Rosemann D: Risk-factors for estrogen receptor-poor breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 77 (1986) 849-854
- Medlock KL, Lyttle CR, Kelepouris N, Neman ED, Sheehan DM: Estradiol down-regulation of the rat uterine estrogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 196 (1991) 293-300
- Mehta RR, Beattie CW, Das Gupta TK: Endocrine profile in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 20 (1991) 125-132
- Merchant WJ, Millis RR, Smith P, Chaudary MA, Barnes DM: Expression of c-erbB2 and p53 protein is similar in breast cancer from British and Japanese women. *Int J Cancer* 84 (1999) 278-283
- Millard FC, Bliss JM, Chilvers CED, Gazet JC: Oral contraceptives and survival in breast cancer. *Br J Cancer* 56 (1987) 377-378
- Miller AB, Howe GR, Sherman GJ, Lindsay JP, Yattle MF, Dinner PJ, Risch HA, Preston DL : Mortality from breast cancer after irradiation during fluoroscopic examinations in patients being treated for tuberculosis. *N Engl J Med* 321 (1989a) 1285-1289
- Miller N, McPherson K, Jones L, Vessey M: Histopathology of breast cancer in young women in relation to use of oral contraceptives. *J Clin Pathol* 42 (1989b) 387-390
- Minckwitz G von, Grischke EM, Kaufmann M: Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. *Comment. Lancet* 344 (1994) 403
- Mohammed SN, Smith P, Hodgson SV, Fentiman IS, Miles DW, Barnes DM, Millis RR, Rubens RD: Family history and survival in premenopausal breast cancer. *Br J Cancer* 77 (1998) 2252-2256
- Mohle-Boetani J, Grosser S, Malee M, Whittemore AS: Survival advantage among patients with breast cancer diagnosed at 45-49 years of age. *Letter. N Engl J Med* 315 (1986) 587
- Mohle-Boetani JC, Grosser S, Whittemore AS, Malec M, Kampert JB, Pfaffenberger RS: Body size, reproductive factors and breast cancer survival. *Prev Med* 17 (1988) 634-642
- Molina R, J J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, Farrus B, Latre ML, Escriche C, Estape J, Ballesta AM: c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA15.3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast Cancer Res Treat* 51 (1998) 109-119
- Möller P, Mechttersheimer G, Kaufmann M, Moldenhauer G, Momburg F, Mattfeldt T, Otto HF: Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumours of the breast. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 414 (1989) 157-164
- Mondini G, Decian F, Sorice G, Friedman D, Spirito C, Costantini M, Sormani MP, Crivalleri D: Timing of surgery related to menstrual cycle and prognosis of premenopausal women with breast cancer. *Anticancer Res* 17 (1997) 787-190
- Montesco MC, Zavagno G, Meggiolaro F, Frizzera E, Mainente P, Rupolo M, Lise M: Vimentin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in node-negative breast carcinomas and their correlations with pathologic variables and prognosis. *Breast* 4 (1995) 175-178

- Moolgavkar SH, Day NE, Stevens RG: Two stage model for carcinogenesis: epidemiology for breast cancer in females. *J Natl Cancer Inst* 65 (1980) 559-569
- Morrison AS, Lowe CR, Macmahon B, Warram JW Jr, Yuasa S: Survival of breast cancer patients related to incidence risk factors. *Int J Cancer* 9 (1972) 470-476
- Moyer DL, Sahwi SE, MacCaulay: Cells of uterine fluid. In: Beller FK, Schumacher GFB, eds. Amsterdam: Elsevier North Holland (1979): 59-71
- Mukku VR, Stancel G: Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J Biol Biochem* 260 (1985) 9820-9824
- Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, Murphy LC, Laganas L: Progesterin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 46 (1986) 728-734
- Murray PA, Barrett-Lee P, Travers M, Luqumani Y, Powles T, Coombes RC: The prognostic significance of transforming growth factors in breast cancer. *Br J Cancer* 67 (1993) 1408-1412
- Musey VC, Collins DC, Musey PI, Martino-Saltzman D, Preedy JRK: Long term effects of a first pregnancy on the secretion of prolactin. *N Engl J Med* 316 (1987) 229-234
- Musgrove EA, Lee CSL, Sutherland RL: Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* 11 (1991) 5032-5043
- Nair KM, Sankaranarayanan R, Nair SK, Amma NS, Varghese C, Padmakumari G, Cherian T: Overall survival from breast cancer in Kerala, India in relation to menstrual, reproductive and clinical factors. *Cancer* 71 (1993) 1791-1796
- Nandi S, Guzman RC, Yang J: Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci* 92 (1995) 3650-3657
- Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Takagi H: Proliferating cell nuclear antigen immunostaining in breast cancer and its relation to prognosis. *Jap J Clin Oncol* 23 (1993) 20-25
- Nayak, BK, Baral RN, Das BR: P53 gene mutation in relation to p53 protein accumulation in male and female breast cancer. *Neoplasma* 43 (1996) 305-310
- Nettleton J, Long J, Kuban D, Wu R, Shaeffer J, El-Mahdi A: Breast cancer during pregnancy: quantifying the risk of treatment delay. *Obstet Gynecol* 87 (1996) 414-418
- Nicholson S, Richard J, Sainsbury C, Halcrow P, Kelly P, Angus B, Wright C, Henry J, Farndon JR, Harris AL: Epidermal Growth Factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node-negative subgroup. *Br J Cancer* 63 (1991) 146-150
- Nigro JM, Baker JS, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner St, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Harris CC, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342 (1989) 705-708
- NIH Consensus Conference: Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 265 (1991) 391-398
- Nischan P, Ebeling K, Thomas DB, Hirsch U: Comparison of recalled and validated oral contraceptive histories. *Am J Epidemiol* 138 (1993) 697-703
- Nischan P, Ebeling K: Oral contraceptive containing chlormadinone acetate and cancer incidence at selected sites in the German Democratic Republic. A correlation analysis. *Int J Cancer* 34 (1984) 671-674
- Noguchi M, Thomas M, Kitagawa H, Kinoshita K, Miyazaki I, Mizukami Y: PCNA-expression and Ag-NOR score in breast cancer: correlation with clinicopathologic variables and patient survival. *Int J Oncol* 2 (1993) 265-269
- Nomura Y, Kobayashi S, Takatani O, Sugano H, Matsumoto K, McGuire WL: Estrogen receptor and endocrine responsiveness in Japanese versus American breast cancer patients. *Cancer Res* 37 (1977) 106-110
- Nomura Y, Shirouzu M, Takayama T: Direct comparisons of adjuvant endocrine therapy, chemotherapy, and chemoendocrine therapy for operable breast cancer patients stratified by estrogen receptor and menopausal status. *Breast Cancer Res Treat* 49 (1998) 51-60
- Norberg T, Jansson T, Sjögren S, Matensson C, Andreasson I, Fjällskog ML, Lindman H, Nordgren H, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J: Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncol* 35 Suppl 5 (1996) 96-102



- O'Reilly SM, Barnes RS, Camplejohn RS, Bartkoua J, Gregory WM, Richards MA: The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 63 (1991) 444-446
- Oliver DJ, Ingram DM: Timing of surgery during the menstrual cycle for breast cancer: Possible role of growth factors. *European J Cancer* 31 (1995) 325-328
- Olsson H, Ranstam J: Breast cancer and the pill. *Br J Cancer* 59 (1989) 834
- Olsson H: Reproductive events, occurring in adolescence at the time of development of reproductive organs and at the time of tumour initiation, have a bearing on growth characteristics and reproductive hormone regulation in normal and tumour tissue investigated decades later - a hypothesis. *Med Hypothesis* 28 (1989) 93-97
- Olsson H, Ranstam J, Baldetorp B, Ewers SB, Fernö M, Killander D, Sigurdsson H: Proliferation and DNA ploidy in malignant breast tumors in relation to early oral contraceptive use and early abortions. *Cancer* 67 (1991a) 1285-1290
- Olsson H, Borg A, Fernö M, Ranstam J, Sigurdsson H: Her-2/neu and INT2 proto-oncogene amplification in malignant breast tumors in relation to reproductive factors and exposure to exogenous hormones. *J Natl Cancer Inst* 83 (1991b) 1483-1487
- Olsson H, Jernstrom H, Alm P, Kreipe H, Ingvar C, Jonsson PE, Ryden S: Proliferation of the breast epithelium in relation to menstrual cycle phase, hormonal use and reproductive factors. *Breast Cancer Res Treat* 40 (1996) 187-196
- Orr RK, Fraher KM: Parity is associated with axillary nodal involvement in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 34 (1995) 71-76
- Osborne MP, Rosen PP, Lesser ML, Schwartz MK, Menendez-Botet CJ, Fishman JH, Kinne FW, Beattie EJ: The relationship between family history, exposure to exogenous hormones, and estrogen receptor protein in breast cancer. *Cancer* 51 (1983) 2134-2138
- Osborne CK, Coronado EB, Kitten LJ, Arteaga CI, Fuqua SAW, Ramasharme K, Marshall M, Li CH: Insulin-like growth factor-II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol Endocrinol* 3 (1989) 1701-1709
- Padmanabhan N, Howell A, Rubens RD: Mechanism of action of adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Lancet* // (1986) 411-414
- Pagani O, O'Neill A, Castiglione M, Gelber RD, Goldhirsch A, Rudenstam CM, Lindtner J, Collins J, Crivellari D, Coates A, Cavalli F, Thurlimann B, Simoncini E, Fey M, Price K, Senn HJ: Prognostic impact of amenorrhoea after adjuvant chemotherapy in premenopausal breast cancer patients with axillary node involvement: results of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG) Trial VI. *Eur J Cancer* 34 (1998) 632-640
- Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS: Atypical hyperplastic lesions of the female breast. *Cancer* 55 (1985) 2698-2708
- Pastides H, Kelsey J, LiVolsi VA, Holford TR, Fischer DB, Goldenberg IS: Oral contraceptive use and fibrocystic breast disease with special reference to its histopathology. *J Natl Cancer Inst* 71 (1983) 5-9
- Pater MM, Hughes GA, Hyslop DE, Nakshatu H, Pater A: Glucocorticoid dependent oncogenic transformation by type 16 but not type II human papilloma virus DNA. *Nature* 335 (1988) 832-835
- Peles E, Bacus SS, Koski RA, Lu HS, Wen D, Ogden SG, Levy RB, Yarden Y: Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69 (1992) 205-216
- Perren TJ: c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 63 (1991) 328-332
- Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG: Design and analysis of clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. *Br J Cancer* 35 (1977) 1-39
- Petrakis NL, Wrensch MR, Ernster VL, Miiike R, Murai J, Simberg N, Siiteri PK: Influence of pregnancy and lactation on serum and breast fluid estrogen levels: implication for breast cancer risk. *Int J Cancer* 40 (1987) 587-591
- Pierce JH, Arnstein P, DiMarco E, Artrip J, Kraus MH, Lonardo F, Di Fiore PP, Aaronson SA: Oncogenic potential of c-erbB-2 in human mammary epithelial cells. *Oncogene* 6 (1991) 1189-1194
- Pietras RJ, Arboleda J, Wongvipat N, Ramos L, Sliwkowski MX, Slamon DJ: HER-2/neu

- signaling regulates estrogen receptor in breast cancer. *Proc Ann Meet Am Assoc Cancer Res* 36 (1995) A 1516
- Pike MC, Henderson BE, Krailo MD, Duke A, Roy S: Breast cancer in young women and use of oral contraceptives: possible modifying effect of formulation and age at use. *Lancet* // (1983a) 926-930
- Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG: 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 303 (1983b) 767-770
- Pink JJ, Jordan VC: Models of Estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56 (1996) 2321-2330
- Pirinen R, Lipponen P, Syrjanen K: Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer as related to clinical, prognostic and cytometric factors. *Anticancer Res* 15 (1995) 2835-2840
- Plu-Bureau G, Lê MG, Sitruk-Ware R, Thalabard JC, Mauvais-Jarvis P: Progestogen use and decreased risk of breast cancer in a cohort study of premenopausal women with benign breast disease. *Br J Cancer* 70 (1994) 270-277
- Possinger K, Wischnewski M, Schönborn I, Lichtenegger W: What can we do with prognostic and predictive factors in breast cancer? Educational Book, 21st ESMO Congress (1996) 3-9
- Potten CS, Watson RJ, Williams GT, Tickle S, Roberts SA, Harris M, Howell A: The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer* 58 (1988) 163-170
- Potter JD, Cerhan JR, Sellers TA, McGovern PG, Drinkard C, Kushi LR, Folsom AR: Progesterone and estrogen receptors and mammary neoplasia in the IOWA Women's Health Study: How many kinds of breast cancer are there? *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 4 (1995) 319-326
- Poulin R, Baker D, Poirier D, Labrie F: Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: An in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen, and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer Res Treat* 17 (1990) 197-210
- Powles J, Smith IE: Medical management of breast cancer. *Lancet* 338 (1991) 620
- Pratap R, Shousha S: Breast carcinoma in women under the age of 50: Relationship between p53 immunostaining, tumour grade, and axillary lymph node status. *Breast Cancer Res Treat* 49 (1998) 35-39
- Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ: Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5 (1990) 953-962
- Prioleau J, Schnitt SJ: P53 antigen loss in stored paraffin slides. *New Engl J Med* 332 (1995) 1521-1522
- Prives C, Hall PA: The p53 pathway. *J Pathol* 187 (1999) 112-126
- Prost-Avalet O, Oursin J, Adessi GL: In vitro effect of synthetic progestogens on estrone sulfatase activity in human breast carcinoma. *J Steroid Biochem Molec Biol* 39 (1991) 967-973
- Pujol P, Daures JP, Thezenas S, Guilleux F, Rouanet Ph, Grenier J: Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer* 83 (1998) 698-705
- Pujol P, Hilsenbeck SG, Chamness GC, Elledge RM: Rising levels of estrogen receptor in breast cancer over 2 decades. *Cancer* 74 (1994) 1601-1606
- Quenel N, Wafflard J, Bonichon F, De Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM: The prognostic value of c-erbB-2 in primary breast carcinomas: A study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 35 (1995) 283-291
- Querzoli P, Albonico G, Ferretti St, Rinaldi R, Beccati D, Corcione St, Indelli M, Nenci I: Modulation of biomarkers in minimal breast carcinoma. *Cancer* 83 (1998) 89-97
- Ranstam J, Olsson H, Garne JP, Aspegren K, Janzon L: Survival in breast cancer and age at start of oral contraceptive usage. *Anticancer Res* 11 (1991) 2043-2046
- Ratajczak HV, Sthern RB, Hrushesky WJM: Estrous influence on surgical cure of mouse breast cancer. *J Exp Med* 168 (1988) 88-96
- Read LD, Keith D, Slamon DJ, Katzenellenbogen BS: Hormonal modulation of HER-2/neu protooncogen messenger ribonucleic acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 50 (1990) 3947-3951

- Reed MJ, Ross MS, Lai LC, Ghilchik MW, James T: In vivo conversion of norethisterone to ethinyloestradiol in perimenopausal women. *J Steroid Biochem* 37 (1990) 301-303
- Reese DM, Slamon DJ: HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* 15 (1997) 1-8
- Reid SE, Murthy MS, Kaufman M, Scanlon EF: Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *Br J Surg* 83 (1996) 1037-1046
- Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP: ErbB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34 (1998) 791-808
- Richards MA, Smith P, Ramirez AJ, Fentiman IS, Rubens RD: The influence on survival of delay in the presentation and treatment of symptomatic breast cancer. *Br J Cancer* 79 (1999) 858-864
- Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP: P53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 7555-7559
- Rohan TE, Hartwick W, Miller AB, Kandel RA: Immunohistochemical detection of c-erbB-2 and p53 in benign breast disease and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 90 (1998) 1262-1269
- Rohan TE, Miller AB: A cohort study of oral contraceptive use and risk of benign breast disease. *Int J Cancer* 82 (1999) 191-196
- Romieu I, Willet WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE: Prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 81 (1989) 1313-1321
- Rosen PP, Ashikari R, Thaler H, Ishikawa S, Hirota T, Abe O, Yamamoto H, Beattie EJ, Urban JA, Mike V: A comparative study of some pathologic features of mammary carcinoma in Tokyo, Japan and New York, USA. *Cancer* 39 (1977) 429-434
- Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L: Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer* 75 (1995a) 1320-1326
- Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L: P53 in node-negative breast carcinoma: An immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 13 (1995b) 821-831
- Rosner D, Lane WW, Brett RP: Influence of oral contraceptives on the prognosis of breast cancer in young women. *Cancer* 55 (1985) 1556-1562
- Rosner DH, Lane WW: Oral contraceptive use has no adverse effect on the prognosis of breast cancer. *Cancer* 57 (1986) 591-596
- Rosner DH, Lane WW: Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 25 (1993) 127-139
- Royal College of General Practitioners. Breast cancer and oral contraceptives: Findings in Royal College of General Practitioners study. *Br Med J* 282 (1981) 2089-2092
- Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Taylor-Papadimitriou J: Production of PDGF-like growth factor by breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 36 (1985) 246-252
- Russell KS, Hung MC: Transcriptional repression of the neu protooncogene by estrogen stimulated estrogen receptor. *Cancer Res* 52 (1992) 6624-6629
- Russo J, Russo IH: Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res* 40 (1980) 2677-2687
- Russo J, Tay LK, Russo IH: Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2 (1981) 5-73
- Russo IH, Gimotty P, Dupuis M, Russo J: Effect of medroxyprogesterone acetate on the response of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Br J Cancer* 59 (1989) 210-216
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ: Biology of disease: Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62 (1990) 244-278
- Russo J, Russo I: Hormonally induced differentiation: a novel approach to breast cancer prevention. *J Cell Biochem Suppl* 22 (1995) 58-64
- Rutteman GR: Contraceptive steroids and the mammary gland: Is there a hazard? - Insights from animal studies. *Breast Cancer Res Treat* 23 (1992) 29-41
- Sauerbrei W, Blettner M, Schmoor C, Bojar H, Schumacher M for the German Breast Cancer Study Group: The effect of oral contraceptive use on the prognosis of node-positive breast cancer patients. *Eur J Cancer* 34 (1998) 1348-1351

- Sauerbrei W, Royston P, Schmoor C, Schumacher M and the Germann Breast Cancer Study Group (GBSG): Modelling the effects of standard prognostic factors in node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 79 (1999) 1752-1760
- Schairer C, Gail M, Byrne C, Rosenberg PS, Sturgeon SR, Brinton LA, Hoover RN: Estrogen replacement therapy and breast cancer survival in a large screening study. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 264-270
- Schindler AE: Gestageneinwirkung an der Brust - protektiv oder proliferativ? *Zentralbl Gynakol* 119 (1997) 359-365
- Schlesselman JJ, Stadel BV, Korper M, Yu W, Wingo PA: Breast cancer detection in relation to oral contraception. *J Clin Epidemiol* 45 (1992) 449-459
- Schmidt-Gollwitzer K, Schönegg W, Scheiber A, Wessel J: Ovarialfunktion und Rezidiv bei adjuvanter Chemotherapie des Mammakarzinoms. *Geburtsh u Frauenheilk* 47 (1987) 695-699
- Schmitt FC, Pereira EM, Andrade LM, Torresan M, de Lucca L: The proliferating cell nuclear antigen index in breast carcinomas does not correlate with mitotic index and estrogen receptor immunoreactivity. *Pathol Res Pract* 190 (1994) 786-791
- Schneider HP, Jackisch C: Potential benefits of estrogens and progestogens on breast cancer. *Int J Fertil Womens Med* 43 (1998) 278-285
- Schönborn I, Nischan P, Ebeling K: Oral contraceptive use and the prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 30 (1994) 283-292
- Schönborn I, Zschesche W, Minguillon C, Spitzer E, Möhner M, Ebeling K, Grosse R: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen and c-erbB-2 compared with conventional histopathological factors in breast cancer. *Cancer Res Clin Oncol* 121 (1995) 115-122
- Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ: Effects of two classes of progestagens, Pregnane and 19-Nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. *J Steroid Biochem Molec Biol* 55 (1995) 423-437
- Schultz E von, Cline M, Sahlin L, Isaksson E, Skoog L: Sex steroid receptors, IGF-1 mRNA and proliferation in breast tissue during hormonal treatment. *Breast Cancer Res Treat* 50 (1998) 301
- Schouten LJ, Hopperets PSGJ, Jager JJ, Volovics L, Wils JA, Verbeek ALM, Blijham GH: Prognostic significance of etiological risk factors in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 43 (1997) 217-223
- Schroeter CA, De Potter CR, Rathsmann K, Willighagen RGJ, Greep JC: c-erbB-2 positive breast tumours behave more aggressively in the first years after diagnosis. *Br J Cancer* 66 (1992) 728-734
- Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC: Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 14 (1993) 659-669
- Segui MA, Climent MA, Bellmunt J, Albanelli J, Fernandez M, Filella X, Jo J, Gimenez N, Iglesias E, Miralles M, Alonso C, Peiro G, Perezpicanol E, Ballesta AM: P53 oncoprotein as a prognostic indicator in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 18 (1998) 507-511
- Sekeris CE: Hormonal steroids act as tumour promoters by modulating oncogene expression. *J Cancer Res Clin Oncol* 117 (1991) 96-101
- Senie RT, Rosen PP, Rhodes PR, Lesser ML: Timing of breast cancer excision during the menstrual cycle influences duration of disease-free survival. *Ann Int Med* 115 (1991) 337-342
- Seshradi R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P, South Australian Breast Cancer Group: Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 11 (1993) 1936-1942
- Seshradi R, Horsfall DJ, McCaul K, Leong AS: A simple index to predict prognosis independent of axillary node information in breast cancer. *Aust N Z J Surg* 67 (1997) 765-770
- Sheen CM, Eng HL, Chou FF, Chen WJ: The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in patients with lymph node-positive breast cancer. *Arch Surg* 132 (1997) 264-267
- Shiao YH, Chen VW, Scheer WD, Wu XC, Correa P: Racial disparity in the association of p53 gene alterations with breast cancer survival. *Cancer Res* 55 (1995) 1485-1490
- Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP: Oestrogen receptor expression in the

- normal and pre-cancerous breast. *J Pathol* 188 (1999) 237-244
- Shrestha P, Yamada K, Wada T, Maeda S, Watatani M, Yasutomi M, Takagi H, Mori M: Proliferating cell nuclear antigen in breast lesions: correlation of c-erbB-2 oncoprotein and EGF receptor and its clinicopathological significance in breast cancer. *Virchows Archiv (A)* 421 (1992) 193-202
- Shupnik MA, Gordon MS, Chin WW: Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol Endocrinol* 3 (1989) 660-665
- Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Fernö M, Killander D, Olsson H: Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 322 (1990) 1045-1053
- Siitonen SM, Kallioniemi OP, Isola JJ: Proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry using monoclonal antibody 19A2 and a new antigen retrieval technique has prognostic impact in archival paraffin-embedded node-negative breast cancer. *Am J Pathol* 142 (1993) 1081-1089
- Silverstein MJ, Gierson ED, Waisman JR, Senofsky GM, Colburn WJ, Gamagami P: Axillary lymph node dissections for T1a breast carcinoma - Is it indicated? *Cancer* 73 (1994) 664-667
- Silvestrini, R., E. Benini, M.G. Daidone, S. Veneroni, P. Boracchi, V. Cappalletti, G. DiFronzo, U. Veronesi: P53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 965-970
- Sitruk-Ware R: Progesterone use and breast cancer. 8th International Congress on the Menopause Abstractband (1996) A21
- Sjögren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J: Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 16 (1998) 462-469
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mc Guire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987) 177-182
- Slamon DJ, Clark GM: Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* 240 (1988) 1795-1798
- Slattery ML, Berry TD, Kerber RA: Is survival among women diagnosed with breast cancer influenced by family history of breast cancer? *Epidemiology* 4 (1993) 543-548
- Söderqvist G, Von Schoultz B, Tani E, Skoog L: Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 168 (1993) 874-879
- Soderquist G, Olsson H, Wilking N, von Schoultz B, Carlström K: Metabolism of estrone sulfate by normal breast tissue: influence of menopausal status and oral contraceptives. *J Steroid Biochem Molec Biol* 48 (1994) 221-224
- Soderquist N, Skoog G: Breast epithelial proliferation in healthy women using oral contraception. *Breast Cancer Res Treat* 50 (1998) 300
- Sommer SS, Cunningham J, McGovern RM, Saitoh S, Schroeder JT, Wold LE, Kovach JS: Pattern of p53 gene mutations in breast cancers of women of the Midwestern United States. *J Natl Cancer Inst* 84 (1992) 246-252
- Spencer JD, Millis RR, Hayward JL: Contraceptive steroids and breast cancer. *Br Med J* 1 (1978) 1024-1026
- Spyratos F, Hacene K, Tubiana-Hulin M, Pallud C, Brunet M: Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary infiltrating ductal breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1.262 patients. *Europ J Cancer Clin Oncol* 25 (1989) 1233-1249
- Squitieri R, Tartter PI, Ahmed S, Brower ST, Theise ND: Carcinoma of the breast in postmenopausal hormone user and nonuser control groups. *J Am Coll Surg* 178 (1994) 167-170
- Staffa JA, Newschaffer CJ, Jones JK, Miller V: Progestins and breast cancer: an epidemiologic review. *Fertili Steril* 57 (1992) 473-491
- Stalsberg H, Thomas DB, Noonan EA and the WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives: Histologic types of breast carcinoma in relation to international variation and breast cancer risk factors. *Int J Cancer* 44 (1989) 399-409
- Stanford JL, Szklo M, Boring CC, Brinton LA, Diamond EA, Greenberg RS, Hoover RN: A case-control study of breast cancer stratified by estrogen receptor status. *Am J Epidemiol* 125 (1987) 184-194

- Stegner HE: Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart: Enke 6. Aufl (1996) 3
- Stenkvist B, Westman-Naeser S, Vegelius J, Holmquist J, Nordin B, Bengtsson E, Eriksson O: Analysis of reproducibility of subjective grading systems for breast carcinoma. *J Clin Pathol* 32 (1979) 979-985
- Stewart AJ, Westley BR, May FEB: Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br J Cancer* 66 (1992) 640-648
- Strickland DM, Gambrell RD, Butzin CA, Strickland K: The relationship between breast cancer survival and prior postmenopausal estrogen use. *Obstet Gynecol* 80 (1992) 400-404
- Sutherland RL, Hall RE, Pang GYN, Musgrove EA, Clarke CL: Effect of medroxyprogesterone acetat on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 48 (1988) 5084-5091
- Sutherland RL, Watts CKW, Musgrove EA: Cell cycle control by steroid hormones in breast cancer. implications for endocrine resistance. *Endocrine related Cancer* 2 (1995) 87-96
- Swanson GM, Nawal ER, Lin CS, Hankey BF, Miller B, Horn-Ross P, White E, Liff JM, Harlan LC, McWorther WP, Mullan PB, Key CR: Breast cancer among black and white women in the 1980s. *Cancer* 72 (1993) 788-798
- Szarewski A, Guillebaud J: Breast cancer and hormone exposure. *Lancet* 348 (1996) 682-683
- Taioli E, Garte SJ, Trachman J, Garbers S, Sepkovic DW, Osborne MP, Mehl St, Bradlow HL: Ethnic differences in estrogen metabolism in healthy women. Letter. *J Natl Cancer Inst* 88 (1996) 617
- Taverna D, Antionetti S, Maggiora P, Dati C, De Bortoli M, Hynes NE: ErbB-2 expression in estrogen receptor positive breast tumor cells is regulated by growth modulatory reagents. *Int J Cancer* 56 (1994) 522-528
- Thijssen JHH: Oestrogens, progestins and breast proliferation. *Zentralbl Gynakol* 119 (1997) 43-47
- Thomas DB: Do hormones cause breast cancer. *Cancer* 53 (1984) 595-604
- Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridens H, Bayer T, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N, Danish Breast Cancer Cooperative Group: Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node-negative primary breast cancer. *Cancer Res* 47 (1987) 6126-6133
- Thorpe SM, Christensen J, Rasmussen BB, Rose C: Short recurrence-free survival associated with high oestrogen receptor levels in the natural history of postmenopausal, primary breast cancer. *Eur J Cancer* 29A (1993) 971-977
- Toikanen SP, Kujari HP, Joensuu H: Factors predicting late mortality from breast cancer. *Br J Cancer* 27 (1991) 586-591
- Tormey DC, Gray R, Gilchrist K, Grage T, Carbone PP, Wolter J, Woll JE, Cummings FJ: Adjuvant chemohormonal therapy with cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil, and prednisone (CMFP) or CMFFP plus tamoxifen compared with CMF for premenopausal breast cancer patients. An Eastern Cooperative Oncology Group Trial. *Cancer* 65 (1990) 200-206
- Treurniet HF, Rookus MA, Peterse HL, Hart AAM, Van Leeuwen FE: Differences in breast cancer risk factors to neu (c-erbB-2) protein overexpression of the breast tumor. *Cancer res* 52 (1992) 2344-2345
- UK National Case-Control Study Group: Oral contraceptive use and breast cancer risk in young women. *Lancet* / (1989) 973-982
- Ulm K, Jänicke F, Pache L, Danegger F: Change in prognostic impact of uPA and PAI-1 in node-negative breast cancer patients during the follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 37 (1996) 59
- Van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker L, de Laat SW: Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast tumor cells under growth factor-defined conditions. *J Steroid Biochem Molec Biol* 42 (1992) 457-465
- Van der Kooy K, Rookus MA, Peterse HL, Van Leeuwen FE: P53-protein overexpression in relation to risk factors for breast cancer. *Am J Epidemiol* 144 (1996) 924-933
- Vanek VW, Kadivar TF, Bourguet CC: Correlation of menstrual cycle at time of breast cancer surgery to disease-free and overall survival. *South Med J* 90 (1997) 780-788
- Veronesi U, Luini A, Mariani L, Del Vecchio M, Alvez D, Andreoli C, Giacobone A, Merson M, Pacetti G, Raselli R, Saccozzi R: Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. *Lancet* 343 (1994) 1545-1547

- Vessey MP, Doll R, Jones K, Mc Pherson K, Yeates D: An epidemiological study of oral contraceptives and breast cancer. *Br Med J* 175 (1979) 1757-1960
- Vessey M, Baron J, Doll R, McPherson K, Yeates D: Oral contraceptives and breast cancer: final report of an epidemiological study. *Br J Cancer* 47 (1983) 455-462
- Vessey MP, Villard-Mackintosh L, McPherson K, Yeates D: Mortality among oral contraceptive users: 20year follow-up of women in a cohort study. *Br Med J* 299 (1989) 1487-1491
- Vihko R, Isotalo H: Estrogen and Progesteron receptors in breast cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 101 (1981) 29-35
- Ville Y, Lasry S, Spyratos F, Hacene K, Brunet M: Menstrual status and breast cancer surgery. *Breast Cancer Res Treat* 16 (1990) 119-121
- Visscher DW, Wykes S, Kubus J, Crissman JD: Comparison of PCNA/cyclin immunohistochemistry with flow cytometric S-phase fraction in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22 (1992) 111-118
- Walker R, Dearing SJ: Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 53 (1999) 167-176
- Welshons WV, Jordan VC: Adaption of estrogen-dependent MCF-7 cells to low estrogen (phenol-red free) culture. *Eur J Clin Oncol* 12 (1987) 1935-1939
- Westhoff CI: Oral contraceptives and breast cancer - a resolution emerges. *Contraception* 54 (1996) i-ii (3 Suppl)
- WHO, Histological typing of breast tumours. 2nd edition WHO, Geneva 1981
- WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives: Invasive cervical cancer and combined oral contraceptives: *Br Med J* 290 (1985) 961-965
- WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives: Breast Cancer and combined oral contraceptives: results from a multinational study. *Br J Cancer* 61 (1990) 110-119
- WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives: Breast cancer and depot-medroxyprogesterone acetate: a multinational study. *Lancet* 338 (1991) 833-838
- Williams G, Anderson E, Howell A, Watson R, Coyne J, Roberts SA, Potten CS: Oral contraceptive (OCP) use increases proliferation and decreases oestrogen receptor content of epithelial cells in the normal human breast. *Int J Cancer* 48 (1991) 206-210
- Wingo PA, Austin J, Kosinski A, Ory HW, Schlesselman JJ, Eley W, Peterson B: Five-year survival of women with breast cancer according to prior use of oral contraceptives. *Hormonal Carcinogenesis II*, Li JJ, Li SA, Gustafsson JA, Nandi S, Sekely LI (eds), New York, Springer 1996
- Wingrave JS: Progesteron effects and their relationship to lipoprotein changes. Report on the oral contraceptive study of the Royal College of General Practitioners. *Acta Obstet Gynecol Scand* 105 (1982) Suppl 33-36
- Winstanley J, Cooke T, George WD, Murray G, Holt S, Croton R, Griffiths K, Nicholson R: The long-term prognostic significance of oestrogen receptor analysis in early carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 64 (1991) 99-101
- Wren BG: Hormonal replacement therapy and breast cancer. *Eur Menopause J* 2 (1995) 13-19
- Wyss P, Rageth JC, Unger C, Hochuli E: Die prognostische und therapeutische Bedeutung der Steroidrezeptoren beim invasiven Mammakarzinom. *Geburtsh u Frauenheilk* 52 (1992) 611-616
- Yang Q, Khoury MJ, Rodriguez C, Calle EE, Tatham LM, Flanders WD: Family history score as a predictor of breast cancer mortality: prospective data from the Cancer Prevention Study II, United States, 1982-1991. *Am J Epidemiol* 147 (1998) 652-659
- Yee D, Cullen KJ, Paik S, Perdue JF, Hampton B, Schwartz A, Lippman ME, Rosen N: Insulin-like growth factor II mRNA expression in human breast cancer. *Cancer Res* 48 (1988) 6691-6696
- Yoshimoto M, Sakamoto G, Ohashi Y: Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. *Cancer* 72 (1993) 2993-3001
- Yu CC, Dublin EA, Camplejohn RS, Levison DA: Optimization of immunistochemical staining of proliferating cells in paraffin sections of breast carcinoma using antibodies to proliferating cell nuclear antigen and the Ki-67 antigen. *Anal Cell Pathol* 9 (1995) 45-52

## Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase
PBS	phosphate-buffered saline
CMA	Chlormadinonacetat
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
DAB	Diethylaminobenzidin
DCI	Ductal invasives Carcinom
EE	Ethinylestradiol
EE-PS	Ethinylestradiolpropansulfonat
EGF-R	epidermal growth factor-receptor
ER	estrogen receptor
FA	Familienanamnese
HPV	Human Papilloma Virus
HR	Hazard Ratio
HRE	hormone responsive element
HRT	hormonal replacement therapy
IGF	insulin like growth factor
KI	Konfidenzintervall
LCI	Lobulär invasives Carcinom
LK	Lymphknoten
LNG	Levonorgestrel
MAK	monoklonale(r) Antikörper
MPA	Medroxyprogesteronacetat
NETA	Norethisteronacetat
ns	nicht signifikant
OH	Ovulationshemmer
OR	Odds Ratio
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PR	progesteron rezeptor
RR	Relatives Risiko
SP	Sequenzpräparate
TGF $\alpha$	tumor growth factor alpha
TGF $\beta$	tumor growth factor beta
TRIS	tris-buffered saline
ZT	Zyklustag



#### Technische und finanzielle Unterstützung

Für die immunhistochemischen Untersuchungen konnten freundlicherweise die labortechnischen Möglichkeiten des ehemaligen *Pathologischen Labors der Frauenklinik des Virchow-Klinikums der Freien Universität Berlin* als auch die des *Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin Berlin-Buch* unter der Leitung von Prof. Dr. D. Ganten genutzt werden.

Wertvolle wissenschaftliche Anstöße bei der Erarbeitung der Methodik resultierten aus einem Studienaufenthalt am *Queen's Medical Centre, Department of Public Health and Epidemiology der University of Nottingham* unter der Leitung von *Frau Prof. C.E.D. Chilvers*.

Die technische und methodische Durchführung der Gesamtstudie wurde finanziell durch die *Berliner Krebsgesellschaft e.V.* und das *Fellowship-Programm der UICC* gefördert.

## Danksagung

allen Genannten und zahlreichen Ungenannten,  
meiner Familie und meinen Freunden,  
all jenen, die mir über längere oder kürzere Strecken  
in vielfacher und unterschiedlicher Weise hilfreich zur Seite standen  
möchte ich hiermit herzlich und aufrichtig danken.

Dudenhausen JW Prof.

Ebeling K Prof.

Lichtenegger W Prof.

Lübke Marion Dr.

Minguillon Carmen Dr.

Möhner M Dr.

Nischan P Dr.

Rattunde Birgit

Spitzer Eva Dr.

Zschesche W Prof.

Berlin, Dezember 1999