

## **Stellungnahme der Kommission Hormontoxikologie zum Thema: Karzinogene Eigenschaften von Estradiol-17 $\beta$ ?**

In weiten Kreisen der Bevölkerung stehen die Estrogene in dem Ruf, karzinogen zu wirken und vor allem Brustkrebs zu verursachen. Tatsächlich deuten einige der sogenannten Risikofaktoren darauf hin, daß die Exposition gegenüber endogenen oder exogenen Estrogenen zeitabhängig das Mammakarzinomrisiko erhöht. Dazu zählen eine frühe Menarche oder späte Menopause, während eine frühe Ovariectomie bzw. ein Estrogenmangel protektiv wirken. Andererseits scheint eine frühe ausgetragene Schwangerschaft einen Schutzeffekt zu haben, obwohl sie durch extrem hohe Estradiolspiegel gekennzeichnet ist. Offensichtlich sind unterschiedliche Mechanismen an der Entwicklung estrogenabhängiger Tumoren beteiligt.

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß die Behandlung mit Estradiol und anderen Estrogenen die Entstehung von Tumoren fördert. Beim Menschen ist bekannt, daß ein längerfristiger Einfluß von Estrogenen ohne Gestageneinfluß das Risiko des Endometriumkarzinoms erhöht. Deshalb wurden Estradiol und andere Estrogene als - wenn auch schwache - Karzinogene eingestuft [1]. Die epidemiologische Datenlage läßt jedoch auch den Schluß zu, daß Estrogene keine Karzinome induzieren, sondern die Entstehung von Tumoren im Sinne von Promotoren erleichtern bzw. das Wachstum bestehender Tumoren fördern können.

Der Mechanismus, der letztlich für die Entstehung von Tumoren verantwortlich ist, ist nicht geklärt. Unstrittig ist, daß verschiedene epigenetische Mechanismen bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen. Eine tragende Rolle der Estrogene wird darin gesehen, daß sie die Zellteilung in den estrogenabhängigen Zellen stimulieren und dadurch die Fixierung spontaner und Karzinogen-induzierter Mutationen erleichtern bzw. die klonale Expansion präneoplastischer Zellen erlauben (Förderung der Tumorpromotion) [2].

Estradiol wurde in vielen Mutagenitätstests getestet. In den Standardtests mit dem Endpunkt Genmutationen (z.B. Salmonella-Mutagenitätstest [Ames-Test], SHE-Zellen, V79-Zellen) wurde Estradiol in der Regel als negativ getestet (Tabelle 1). Dementsprechend wurden Estrogene als nichtmutagene Kanzerogene eingestuft. Diese Einstufung wird u.a. durch folgende Ergebnisse gestützt:

So kann z.B. die estradiolinduzierte renale Kanzerogenese in Hamstern durch das Antiestrogen Tamoxifen gehemmt werden [3]. Diese Wirkung beruht auf einer Antagonisierung der Estradiolrezeptor-vermittelten Prozesse, da Tamoxifen sicher keine frühen Prozesse (z.B. Estradiol-induzierte DNS-Schädigungen) hemmt [1]. Die bei Nagern beobachteten Hypophysen- und Mammatumoren nach Estrogenbehandlung beruhen auf einer direkten Stimulierung der prolaktinproduzierenden Zellen der Hypophyse [4] bzw. der Schädigung dopaminerger Neuronen im mediabasalen Hypothalamus [5]. Durch die gleichzeitige Gabe des Prolaktinhemmers Bromocriptin zusammen mit Estradiol wurde nämlich die Induktion von Hypophysen- und Mammatumoren in Mäusen und Ratten verhindert [6,7].

**Tabelle 1. Auswahl von publizierten Genmutationstests mit Estrogenen**

Species/ Cells		Out- come	Substance	Reference
S.	In vitro	-	E2	SEIBERT and GÜNZEL 1994 [13]
S.	In vitro	-	Cyclodiol, Cyclotriol	LANG and REIMANN 1993 [14]
S.	In vitro	-	EE, Cyclodiol, Cyclotriol	HUNDAL et al. 1997 [15]
S.	In vitro	-	E2	DHILLON and DHILLON 1995 [16]
S.	In vitro	-	Mestranol	DHILLON et al. 1994 [17]
S.	In vitro	-	EE	ITOH et al. 1991 [18]
S., E.coli	In vitro	-	DES metabolites indenestrol A and B	ISHIKAWA et al. 1996 [19]
SHE	In vitro	-	E2	TSUTSUI et al. 1987 [20]
V79	In vitro	-	Cyclodiol, Cyclotriol	LANG and REIMANN 1993 [14]
V79	In vitro	+	Coumestrol, Genistein	KULLING and METZLER 1997 [21]
V79	In vitro	-	E2, EE, E1, DES	DREVON et al. 1981 [22]
V79	In vitro	-	Daidzein	KULLING and METZLER 1997 [21]

S. = Salmonella

SHE = Syrian hamster embryo cells

V79 = V79 cell line of Chinese hamster lung

E1, E2 = estrone, estradiol

DES = diethylstilbestrol

EE = ethinylestradiol

### Mutagene Wirkungen der Estrogene

Die Standard-Mutagenitätstests mit dem Endpunkt Chromosomenmutationen bzw. Genommutationen ergaben für die Estrogene widersprüchliche Ergebnisse, insbesondere hinsichtlich der strukturellen Chromosomenmutationen (Tabelle 2). Numerische Chromosomenmutationen sowie der Arrest in der Metaphase der Mitose sind dagegen ein unter in vitro-Bedingungen häufig beobachteter Effekt der Estrogene [8]. Nach Einschätzung von Reimann [8] gilt dies jedoch als irrelevant für die Beurteilung des mutagenen Potenzials von Steroidhormonen, da der Effekt nicht nur mit synthetischen, sondern auch mit natürlichen Estrogenen beobachtet wurde. Ein starkes kanzerogenes Potenzial von Estradiol müßte man als Nachteil im Evolutionsprozess bezeichnen [1]. Von Estradiol induzierte numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, die zwar als Teil eines größeren Musters verschiedener Typen kovalenter Schädigung des genetischen Materials auf der DNS- oder Chromosomenebene angesehen werden können, sind allein sicher nicht ausreichend für eine Tumorentwicklung, könnten dazu aber einen Beitrag leisten [1]. Unter bestimmten in vitro-Bedingungen sind Estrogene durchaus in der Lage, die DNS zu schädigen [1]:

1. Die durch Hydroxylierung an C2 oder C4 entstehenden Katecholestrogene können Schädigungen der DNS verursachen, bei denen freie Radikale eine Rolle spielen. Im Verlauf dieses sogenannten Redox cycling zwischen der Katecholform (Hydrochinon mit zwei OH-Gruppen in Position C3 und C2 bzw. C4) und der Chinonform (zwei Ketogruppen in Position C3 und C2 bzw. C4) entstehen als Intermediärprodukte die sogenannten Semichinone unter Bildung von freien Radikalen. Letztere können dann

mit der DNS reagieren und Schädigungen verursachen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß die Estradiol-induzierte Nierentumorinzidenz in Hamstern durch Gabe des Radikalfängers Ascorbinsäure gesenkt wird [9]. Besonders die 4-Hydroxylierung von Estradiol scheint eine Rolle zu spielen, da gerade in solchen Organen verstärkt 4-OH-Estradiol nachgewiesen wurde, in denen nach einer Estrogenbehandlung bei Nagern Tumoren aufgetreten waren [1].

2. Einige Autoren berichten über eine indirekte DNS-Adduktbildung nach Estrogenexposition. Einige dieser Addukte werden durch reaktive Aldehyde (z.B. Malondialdehyd) gebildet, die bei dem Zerfall von Lipidperoxiden infolge der Estrogenbehandlung entstehen.
3. Die während des Redox cycling gebildeten Semichinone können in vitro kovalent an die DNS binden [10,11]. Hierbei spielen vor allem die 4-OH-Metaboliten eine Rolle, die mutagene "apurinic sites" bilden. Dagegen bilden die 2-OH-Estrogenmetaboliten stabile DNS-Addukte, die nicht oder nur schwach kanzerogen sind. Das durch 4-OH-Metaboliten gebildete Adduktmuster wird als ein Beweis für einen kanzerogenen Mechanismus angesehen (Bildung instabiler Addukte, Induktion von Genmutationen und infolgedessen Tumorinitiation) [12].
4. Inzwischen wurden in speziellen in vitro-Tests Genmutationen nachgewiesen, die durch Estradiol bzw. dessen 4-OH-Metaboliten induziert wurden [1]. Ob diese unter ganz speziellen Bedingungen durchgeführten in vitro-Tests tatsächlich als prädiktiv für ein mutagenes Potenzial unter in vivo Bedingungen angesehen werden können, ist sehr fraglich. So wurden in vitro die mutagenen Effekte der Katecholestrogene nur in ganz niedrigen Konzentrationen beobachtet, bei denen sie prooxidativ wirken; in hohen Konzentrationen wirken sie nämlich, wie alle anderen Estrogene auch, antioxidativ. Darüber hinaus können in vivo z.B. antioxidative Effekte und Reparaturprozesse zum Tragen kommen. So kommt Liehr zu der Schlußfolgerung, daß Estrogene wahrscheinlich nur schwache Mutagene sind, und eine definitive Aussage zur Zeit nicht möglich ist [1].

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ein über den Estrogenrezeptor vermittelter tumorpromovierender Effekt von Estrogenen bei Nagern und beim Menschen gesichert ist. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß, zumindest unter speziellen in vitro-Bedingungen, Estrogene bzw. die 2-OH- und insbesondere die 4-OH-Metaboliten durchaus mit der DNS reagieren und Addukte bilden können, die schließlich zu Genmutationen führen. Darüber hinaus induzieren Estrogene über eine Interaktion mit dem Spindelapparat Chromosomenaberrationen. Daher wird von einigen Autoren für Estradiol und andere Estrogene eine Klassifizierung als nicht genotoxisches Kanzerogen als nicht korrekt angesehen. Vielmehr sollte von einer dualen Rolle der Estrogene bei der Tumorbildung ausgegangen werden, wobei sowohl rezeptorvermittelte epigenetische als auch genotoxische Ereignisse an der Entwicklung von Neoplasien beteiligt sein können. Inwieweit durch Estradiol bzw. seine Metaboliten induzierte genotoxische Ereignisse unter in vivo Bedingungen tatsächlich eine relevante Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielen, bleibt trotz aller in vitro Befunde zweifelhaft. Ein hohe mutagene und kanzerogene Aktivität von Estradiol würde die Existenz jeglicher höherer Lebensformen einschließlich des Menschen, bei denen endogenes Estradiol eine wichtige physiologische Rolle spielt, nicht erlauben. Daher, so schlußfolgert auch Liehr in seiner Übersichtsarbeit, kann Estradiol nur als schwach mutagen eingestuft werden [1].

## **Tabelle 2. Veröffentlichte Ergebnisse zur zytogenetischen Analyse verschiedener Estrogene**

Cells		str. CA	Num. CA	Substance	Reference
CHL	In vitro	-	+	EE	ITOH et al. 1991 [18]
CHO	In vitro	+		E2, E1, E3, EE	KOCHHAR 1985 [23]
HI	In vitro	-	?	EE	ZIMMERMANN et al. 1994 [24]
HI	In vitro	-	+	EE	REIMANN et al. 1996 [8]
HI	In vitro	+		EE, Cycloidiol, Cyclotriol	HUNDAL et al. 1997 [15]
HI	In vitro	-		EE, E2, Mestranol	STENCHEVER et al. 1969 [25]
HI	In vitro	+		E2	DHILLON and DHILLON 1995 [16]
HI	In vitro	-	+	E2, DES	BANDUHN and OBE 1985 [26]
HI	In vitro	+		Mestranol	DHILLON et al. 1994 [17]
HI	In vitro	+		E2	AHMAD et al. 2000 [27]
SHE	In vitro	-	+	E2, DES	TSUTSUI et al. 1997 [28]
SHE	In vitro	-	+	E2	TSUTSUI et al. 1987 [20]
Bmm	In vivo	+		Mestranol	DHILLON et al. 1994 [17]
Bmm	In vivo	-		EE	SHYAMA and RAHIMAN 1996 [29]
HI	In vivo	-	-	OC	MATTON-VAN LEUVEN et al. 1974 [30]
HI	In vivo	-/+1		OC	LITTLEFIELD et al. 1975 [31]
SHRC	In vivo	+		E2, DES	BANERJEE et al. 1994 [32]
SHRC	In vivo	-		17 $\alpha$ E2	BANERJEE et al. 1994 [32]
SHRC	In vivo	+2		EE	BANERJEE et al. 1994 [32]

CHL = Chinese hamster lung

CHO = Chinese hamster ovary

hl = human lymphocytes

SHE = Syrian hamster embryo

bmm = bone marrow of mice

SHRC = Syrian hamster renal cortical cells

1 = neg. vs. pregnant nonusers, pos. vs. nulligravid nonusers

2 = only gaps, no breaks

E1, E2, E3 = estrone, estradiol, estriol

DES = diethylstilbestrol

EE = ethinylestradiol

## Epidemiologische Hinweise

Die vorliegenden epidemiologischen Daten lassen nur beim Mamma- und Endometriumkarzinom auf einen fördernden Einfluß der Estrogene schließen. Dagegen scheint das Risiko des Zervix-, Vulva- und Vaginalkarzinoms durch eine Estrogenbehandlung nicht erhöht zu werden. Das Risiko des Ovarialkarzinoms ist unter der Behandlung mit Ovulationshemmern sogar deutlich reduziert, während für die Hormonsubstitution keine konsistenten Ergebnisse vorliegen [33,34]. Da in diesen Zielorganen Estradiol bzw. synthetische Estrogene akkumuliert werden, ist vor allem das Epithel einem starken Estrogeneinfluß unterworfen. Darüber hinaus beeinflussen die Estrogene den gesamten Organismus und sind ubiquitär vorhanden. Trotzdem ist auch bei allen anderen Karzinomen, z.B. dem Leber-, Nieren-, Blasen-, Magen- oder kolorektalen Karzinom eine erhöhte Inzidenz selbst unter einer langfristigen Estrogenbehandlung nicht erkennbar, obwohl diese Organe

einem starken Estrogeneinfluß ausgesetzt sind [35,36]. Es gibt sogar Hinweise darauf, daß die Hormonsubstitution das Auftreten des Kolonkarzinoms reduziert [37]. Zwar scheint das relative Risiko des Leberzellkarzinoms unter der langfristigen Behandlung mit Ovulationshemmern erhöht zu sein [38]; da die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms durch die Hormonsubstitution nicht erhöht wird [35,36], dürfte es sich bei der Risikoerhöhung durch orale Kontrazeptiva um einen speziellen Effekt des Ethinylestradiols handeln. Leberkarzinome werden auch mit anderen synthetischen Sexualsteroiden, z.B. mit bestimmten Anabolika, in Verbindung gebracht.

Es besteht kein Zweifel, daß Estrogene dosis- und zeitabhängig das Risiko einer Endometriumhyperplasie mit und ohne Atypien sowie des Endometriumkarzinoms erhöhen [39]. Die Beobachtung, daß der Einfluß eines über einen ausreichenden Zeitraum pro Zyklus (10 - 14 Tage) zusätzlich verabreichten Gestagens das erhöhte Risiko wieder reduziert und eine kontinuierlich kombinierte Hormonsubstitution sogar eine protektive Wirkung hat [40-42], läßt nicht auf einen mutagenen Effekt der Estrogene schließen. Die Behandlung mit Ovulationshemmern vom Kombinationstyp (Gestageneinfluß an 21 Tagen pro Zyklus) reduziert das Risiko des Endometriumkarzinoms signifikant [38]. Der antiestrogene Effekt der Gestagene verläuft vor allem über eine Suppression der Estrogenrezeptoren, eine Stimulation estrogeninaktivierender Enzyme (17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, Estrogensulfotransferase) sowie der Ausdifferenzierung der proliferierten Funktionalis. Unter der sequentiellen Hormonsubstitution mit Östrogen/Gestagen-Präparaten sowie der Behandlung mit Ovulationshemmern kommt es zu einer Entzugsblutung, wobei die Funktionalis des Endometriums abgestoßen wird. Dies ist aber nicht als entscheidender Faktor für den günstigen Effekt des Gestagenezusatzes anzusehen, da auch unter einer kontinuierlich-kombinierten Therapie mit Östrogen/Gestagen-Präparaten, die längerfristig zu einer Amenorrhoe führt, das Risiko des Endometriumkarzinoms reduziert ist.

Ein langfristiger Einfluß der Estrogene erhöht das Risiko des Mammakarzinoms, wobei im Gegensatz zum Endometriumkarzinom die zusätzliche Gestagengabe keinen protektiven, sondern offensichtlich einen fördernden Einfluß hat [43,44]. Dies hängt vermutlich damit zusammen, daß Progesteron und Gestagene die estrogenabhängige Proliferation des Brustdrüsenepithels nicht hemmen, sondern sogar steigern [45,46]. Unter der Hormonsubstitution steigt das relative Risiko des Mammakarzinoms pro Jahr um 2,3% an. Dies bedeutet bei einer 5-jährigen Therapie ab dem 50. Lebensjahr bis zum Alter von 70 Jahren eine Zunahme der Mammakarzinomdiagnosen von 64 auf 66 Fälle pro 1000 Frauen, und bei einer 10-jährigen Hormonsubstitution eine Zunahme auf 70 Fälle pro 1000 Frauen [47]. Die geringe Erhöhung des relativen Risikos des Mammakarzinoms verschwindet innerhalb von 5 Jahren nach Absetzen der Hormonsubstitution [48]. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß Estrogene keine Mammatumoren induzieren, d.h., nicht karzinogen wirken, sondern das Wachstum bestehender okkulten Tumoren beschleunigen. Bei einer geschätzten Latenzzeit des Mammakarzinoms von 15 - 20 Jahren wäre nicht mit einem Rückgang der Diagnosen bereits nach 5 Jahren zu rechnen. Für einen wachstumsfördernden Einfluß der Estrogene spricht auch, daß die unter der Hormonsubstitution entdeckten Mammakarzinome weniger aggressiv sind und seltener metastasieren, so daß eine günstigere Prognose besteht [47-50]. Auch die Einnahme von Ovulationshemmern erhöht geringfügig das relative Risiko des Mammakarzinoms, wobei die Zunahme in einem Zeitraum von 20 Jahren nur 3 Fälle pro 10.000 Frauen beträgt. Auch dieser Effekt ist nach Absetzen reversibel [51].

## **Zusammenfassung**

Die bisher veröffentlichten epidemiologischen Ergebnisse **lassen sich nicht mit einem mutagenen oder karzinogenen Effekt der Estrogene vereinbaren**. Gegen eine solche Wirkung der Estrogene in vivo sprechen der Rückgang der Inzidenz des Mammakarzinoms nach Absetzen der Estrogene bzw. Estrogen/Gestagen-Präparate, die protektive Wirkung der Gestagene hinsichtlich des Endometriumkarzinoms, und die Risikoerhöhung unter dem Gestageneinfluß beim Mammakarzinom. Diese Befunde stimmen mit dem Effekt der Gestagene auf die **estrogenabhängige Proliferation des Epithels** überein und beruhen wahrscheinlich auf **steroidrezeptorabhängigen Mechanismen**. In ähnlicher Weise sprechen auch tierexperimentelle Ergebnisse gegen einen mutagenen Effekt der Estrogene, wie z.B. die Hemmung der estradiolinduzierten renalen Karzinogenese durch das Antiestrogen Tamoxifen und die Verhinderung von estrogenbedingten Mamma- und Hypophysentumoren bei Nagern durch einen Dopaminagonisten [3,4].

### Literatur

- 1] Liehr JG (2000) Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews* 21: 40-54
- 2] Barrett JC, Tsutsui T (1996) Mechanism of estrogen-associated carcinogenesis. *Progr Clin Biol Res* 394: 105-111
- 3] Liehr JG, Sirbasku DA, Jurka E, Randerath K, Randerath E (1988) Inhibition of estrogen-induced renal carcinogenesis in male Syrian hamsters by tamoxifen without decrease in DNA adduct levels. *Cancer Res* 48: 779-783
- 4] Soto AM, Sonnenschein C (1979) Estrogen receptor levels in estrogen sensitive cells in culture. *J Steroid Biochem* 11: 1185-1190
- 5] Brawer JR, Sonnenschein C (1975) Cytopathological effects of estradiol on the arcuate nucleus of the female rat. A possible mechanism for pituitary tumorigenesis. *Am J Anat* 144: 57-88
- 6] Welsch CW, Adams C, Lambrecht LK, Hassett CC, Brooks CL (1977) 17 $\beta$ -oestradiol and Enovid mammary tumorigenesis in C3H/HeJ female mice: Counteraction by concurrent 2-bromo-a-ergocryptine. *Br J Cancer* 35: 322-328
- 7] Ribeiro MF, Spritzer PM, Barbosa-Coutinho LM, Oliveira MC, Pavanato MA, Silva ISB, Reis FM (1997) Effects of bromocriptine on serum prolactin in estradiol-treated ovariectomized rats: an experimental model of estrogen-dependent hyperprolactinemia. *Braz J Med Biol Res* 30: 113-117
- 8] Reimann R, Kalweit S, Lang R (1996) Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. II. Communication: examination for the induction of cytogenetic damage using the chromosomal aberration assay on human lymphocytes in vitro and the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. *Environ Mol Mutagen* 28: 133-144
- 9] Liehr JG, Wheeler WJ (1983) Inhibition of estrogen-induced renal carcinoma in Syrian hamsters by vitamin C. *Cancer Res* 43: 4638-4642
- 10] Abul-Hadjj YJ, Tabakovic K, Tabakovic I (1995) An estrogen-nucleic acid adduct. Electroreductive inter-molecular coupling of 3,4-estrone-o-quinone and adenine. *J Am Chem Soc* 117: 6144-6145

- 11] Stack DE, Byun J, Gross ML, Rogan EG, Cavalieri EL (1996) Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides. *Chem Res Toxicol* 9: 851-859
- 12] Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan DE, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden JK, Ramanathan R, Cerny RL, Rogan EG (1997) Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10937-10942
- 13] Seibert B , Günzel P (1994) Animal toxicity studies performed for risk assessment of the once-a-month injectable contraceptive mesigyna(r). *Contraception* 49: 303-333
- 14] Lang R , Reimann R (1993) Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: Examination for the induction of gene mutations using the Ames salmonella/microsome test and the HPGRT Test in V79 cells. *Environ Mol Mutagen* 21: 272-304
- 15] Hundal BS, Dhillon VS, Sidhu IS (1997) Genotoxic potential of estrogens. *Mutat Res* 389: 173-181
- 16] Dhillon VS , Dhillon IK (1995) Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutat Res-Genetic Toxicology* 345: 87-95
- 17] Dhillon VS, Singh JR, Singh H, Kler RS (1994) In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs v mestranol. *Mutat Res-Genetic Toxicology* 322: 173-183
- 18] Itoh S, Matsuura Y, Seki H, Tazawa T, Shimada H (1991) Mutagenicity studies of norethisterone and ethinylestradiol. *Yakuri to chiryo* 19,Suppl. 297(S-1065)-308(S-1076)
- 19] Ishikawa S, Oda T, Sato Y, Mochizuki M (1996) Lack of mutagenicity of diethylstilbestrol metabolite and analog, (+/-)-indenestrols A and B, in bacterial assays. *Mutat Res* 368: 261-265
- 20] Tsutsui T, Suzuki N, Fukuda S, Sato M, Maizumi H, McLachlan JA, Barrett JC (1987) 17 $\beta$ -estradiol induced cell transformation and aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis* 8: 1715-1719
- 21] Kulling SE , Metzler M (1997) Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol* 35: 605-613
- 22] Drevon C, Piccoli C, Montesano R (1981) Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells. *Mutat Res* 89: 83-90
- 23] Kochhar TS (1985) Inducibility of chromosome aberrations by steroid hormones in cultured chinese hamster ovary cells. *Toxicology Letters* 29: 201-206
- 24] Zimmermann H, Oettel M, Dance CA, Hodson-Walker G (1994) In vitro assessment of the clastogenic and mitogenic activity of ethinyl-estradiol (EE) and a new estrogen, J 824 in human cultured lymphocytes. *Toxicology Letters* 74 (Suppl. 1): 96
- 25] Stenchever MA, Jarvis JA, Kreger NK (1969) Effect of selected estrogens and progestins on human chromosomes in vitro. *Obstet Gynecol* 34: 249-251

- 26] Banduhn N , Obe G (1985) Mutagenicity of methyl 2-benzimidazole carbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, c-mitoses, polyploidies and micronuclei. *Mut Res* 156: 199-218
- 27] Ahmad ME, Shadab GGHA, Hoda A, Afzal M (2000) Genotoxic effects of nestradiol-17 $\beta$  on human lymphocyte chromosomes. *Mutat Res* 446: 109-115
- 28] Tsutsui T, Taguchi S, Tanaka Y, Barrett JC (1997) 17 $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer* 70: 188-193
- 29] Shyama SK , Rahiman MA (1996) Genotoxicity of lynoral (ethinyloestradiol, an oestrogen) in mouse bone marrow cells, in vivo. *Mutat Res* 370: 175-180
- 30] Matton-Van Leuven MT, Thiery M, de Bie S (1974) Cytogenetic evaluation of patients in relation to the use of oral contraceptives. *Contraception* 10: 25-38
- 31] Littlefield LG, Lever WE, Miller FL, Kong-OO Goh (1975) Chromosome breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women, and women taking oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 121: 976-980
- 32] Banerjee SK, Banerjee S, Li SA, Li JJ (1994) Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutat Res* 311: 191-197
- 33] Whittemore AS, Harris R, Intyre J and the Collaborative Ovarian Cancer Group (1992) Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies. *Am. J. Epidemiol.* 136: 1184-1203
- 34] Burger CW, Koomen I, Peters NAJB, van Leeuwen FE, Kenemans P (1997) Postmenopausal hormone replacement therapy and cancer of the female genital tract and the breast. *Eur Menopause J* 4: 23-36
- 35] Persson I, Yuen J, Bergkvist L, Schairer C (1996) Cancer incidence and mortality in women receiving estrogen and estrogen-progestin replacement therapy - long-term follow-up of a Swedish cohort. *Int J Cancer* 67: 327-332
- 36] La Vecchia C (1996) HRT and the risk of neoplasms other than the breast. *Eur Menopause J* 3: 232-236
- 37] Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ (1999) Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 106: 574-582
- 38] Kuhl H, Jung-Hoffmann C (1999) Kontrazeption. Thieme Verlag Stuttgart, S.83
- 39] Persson I, Adami HO, Bergkvist L, Lindgren A, Petterson B, Hoover R, Schairer C (1989) Risk of endometrial cancer treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study. *Br Med J* 298: 147-151
- 40] Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D (1995) Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 85: 304-313

- 41] Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, Magnusson C, Bergström R, Lindgren A, Correia N, Persson I (1999) Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst* 91: 1131-1137
- 42] Zichella L (1997) HRT and endometrial cancer. *Menopause Review* 2:18-25
- 43] Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R (2000) Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 283: 485-491
- 44] Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC (2000) Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst* 92: 328-332
- 45] Potten CS, Watson RJ, Williams GT, Tickle S, Roberts SA, Harris M, Howell A (1988) The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer* 58: 163-170
- 46] Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathak DR, Slomski CA, Haslam SZ (1999) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4559-4565
- 47] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet* 350: 1047-1059
- 48] Harding C, Knox WF, Faragher EB, Baildam A, Bundred NJ (1996) Hormone replacement therapy and tumour grade in breast cancer: prospective study in screening unit. *Br Med J* 312: 1646-1647
- 49] Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE (1997) Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med* 336: 1769-1775
- 50] Willis DB, Calle EE, Miracle-McMahill HL, Heath CW (1996) Estrogen replacement therapy and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of postmenopausal women in the United States. *Cancer Causes Control* 7: 449-457
- 51] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996) 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: 1713-1727