

# Konsensusempfehlungen zu methodischen Aspekten und zur klinischen Relevanz des Nachweises disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark (KM) von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Ergebnisse des Konsensustreffens im Rahmen der Dreiländertagung Senologie, Stuttgart, September 2005

Consensus Recommendations on Methodical Aspects and Clinical Relevance of the Evidence of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Patients with Primary Breast Cancer

## Autoren

T. Fehm<sup>1,8</sup>, V. Müller<sup>2,8</sup>, W. Janni<sup>3,8</sup>, S. Braun<sup>4,8</sup>, G. Gebauer<sup>5,8</sup>, C. Marth<sup>4,8</sup>, C. Schindlbeck<sup>3,8</sup>, D. Wallwiener<sup>1,8</sup>, E. Borgen<sup>6,9</sup>, K. Pantel<sup>7,8,9</sup>, E. Solomayer<sup>1,8</sup>

## Institute

Die Institutsangaben sind am Ende des Beitrags gelistet

## Schlüsselwörter

- Mammakarzinom
- Tumorzelldissemination
- Konsensustreffen
- Prognose

## Key words

- Breast cancer
- tumor cell dissemination
- consensus meeting
- prognosis

## Zusammenfassung

Das Gebiet der Tumorzelldissemination beim Mammakarzinom hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Durch den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und Blut wurde bewiesen, dass das Mammakarzinom eine systemische Erkrankung ist. Disseminierte Tumorzellen können bei 20–40% aller Mammakarzinompatientinnen detektiert werden. Die Daten der Pooled Analysis der Collaborative Bone Marrow Micrometastasis Group bestätigten den Tumorzellnachweis im Knochenmark als unabhängigen prognostischen Marker. Darüber hinaus ist die Prognose für Frauen mit Tumorzellpersistenz nach adjuvanter systemischer Therapie im Vergleich zu den Patientinnen ohne Tumorzellnachweis deutlich schlechter. In zukünftigen Studien müssen nun Therapieansätze evaluiert werden, die die Eliminierung disseminierter Tumorzellen zum Ziel haben. Eine entscheidende Voraussetzung für die Durchführung von solchen (Multizenter)-Studien ist, dass ein standardisiertes Vorgehen zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark definiert wird. Im Rahmen der Dreiländertagung der Gesellschaften für Senologie traf sich daher ein internationales Expertenpanel aus Deutschland, der Schweiz und aus Österreich, um die bestehenden Methoden zum Tumorzellnachweis im Knochenmark zu evaluieren sowie einen Konsensus für den standardisierten Nachweis sowie die klinische Implementierung festzulegen.

## Abstract

The presence of disseminated tumor cells in blood and bone marrow (BM) has confirmed the hypothesis of breast cancer as a systemic disease. Disseminated tumor cells (DTC) are already present in 20–40% of primary breast cancer patients without clinical evidence of metastatic disease. A large pooled analysis has recently shown that the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow (BM) of primary breast cancer patients (stages I–III) is associated with poor prognosis. Moreover, tumor cell persistence after completion of adjuvant therapy identifies patients at a high risk for recurrence. To date, sampling of BM and assessment of DTC is not considered a routine procedure in the clinical management of breast cancer patients, but emerging data suggests a future role for risk stratification and monitoring of therapeutic efficacy. Since these clinical options need to be evaluated in clinical trials, agreement on the standardized detection of DTC is mandatory. Therefore, the German, Austrian and Swiss Societies for Senology recently initiated an international consensus meeting to define a consensus for the standardized detection of DTC and to explore the options for its clinical implementation.

**eingereicht** 22.6.2006  
**revidiert** 30.9.2006  
**akzeptiert** 12.10.2006

## Bibliografie

**DOI** 10.1055/s-2006-955919  
 Geburtsh Frauenheilk 2007; 67:  
 1–7 © Georg Thieme Verlag KG  
 Stuttgart · New York ·  
 ISSN 0016-5751

## Korrespondenzadresse

**PD Dr. Tanja Fehm**  
 Universitätsfrauenklinik  
 Tübingen  
 Calwerstraße 7  
 72076 Tübingen  
 tanja.fehm@t-online.de

## Abkürzungen

APAAP	alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase	FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
KM	Knochenmark	mAb	monoklonaler AK
DTZ	disseminierte Tumorzellen	KM	Knochenmark
		RT	Raumtemperatur
		TZ	Tumorzellen

## Einleitung

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ohne manifeste Metastasen belegt, dass das Mammakarzinom auch in frühen Stadien eine systemische Erkrankung ist [1–16]. Es konnte mittlerweile von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass der Nachweis einer Tumorzell dissemination mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [1–15]. Dies bestätigt auch eine kürzlich im „New England Journal of Medicine“ veröffentlichte Studie der Collaborative Group Bone Marrow Micrometastasis unter der Leitung von Prof. Braun [17]. Die Auswertung der Überlebensdaten von über 4700 Patientinnen aus 9 verschiedenen Zentren ergab, dass Mammakarzinompatientinnen mit Tumorzellnachweis im Knochenmark ein kürzeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben als Patientinnen ohne disseminierte Tumorzellen aufweisen.

Wiederholte Knochenmarkspunktionen bei Patientinnen mit Mammakarzinom haben gezeigt, dass disseminierte Tumorzellen trotz adjuvanter Therapie bei 15–30% der Frauen persistieren. Die Prognose der Frauen mit Tumorzellpersistenz nach adjuvanter systemischer Therapie ist im Vergleich zu den Patientinnen ohne Tumorzellen deutlich schlechter [18–21]. In zukünftigen Studien müssen deshalb Therapieregime etabliert werden, die Tumorzellen effizienter eliminieren können. Ein Problem für die Durchführung von (Multizenter)-studien besteht derzeit vor allem darin, dass noch kein standardisiertes Vorgehen zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark definiert wurde. Im Rahmen der Gemeinsamen Jahrestagung der Österreichischen, Schweizerischen und Deutschen Gesellschaften für Senologie fand daher die zweite internationale Konsensuskonferenz zur Tumorzell dissemination statt. Ziele des Konsenstreffens waren: 1) den gegenwärtigen Stand zu methodischen Aspekten und zur klinischen Anwendung des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu eruieren sowie 2) Empfehlungen hinsichtlich der Aufarbeitung, der Auswertung und der klinischen Relevanz des Tumorzellnachweises zu erarbeiten.

## Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark – aktueller Stand

Für den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Zum einen gibt es molekularbiologische Methoden wie die RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) zur Amplifikation von tumorspezifischer (m)RNA. Zum anderen können disseminierte Tumorzellen mittels epithel-spezifischer Antikörper detektiert werden. Zwar gilt die immunzytologische Detektion derzeit als Goldstandard, jedoch wird – nicht zuletzt aufgrund der teilweise mangelnden Standardisierung – der Knochenmarkstatus noch nicht routinemäßig im Rahmen des Stagings erhoben. Ebenso hat der Knochenmarkstatus noch keinen Eingang in die aktuelle TNM-Klassifikation gefunden bzw. wird noch nicht als Stratifizierungsparameter in klinischen Studien eingesetzt. Mittlerweile liegen jedoch umfangreiche Daten vor, die eindeutig die prognostische Relevanz des Knochenmarkstatus belegen [17]. In den nachfolgenden Abschnitten wird ein Konsensus für den Tumorzellnachweis im Knochenmark sowie für dessen klinische Implementierung vorgestellt.

## Nachweis der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark – methodische Aspekte

### Knochenmarkaspiration

Für den klinisch relevanten Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark ist die Entnahme von mindestens je 5 bis 10 ml Knochenmark aus beiden Beckenkämmen notwendig [8, 10, 13–15, 22, 23, 26]. Die KM-Aspiration findet in der Regel intraoperativ (idealerweise vor der Hautinzision im Rahmen der chirurgischen Maßnahmen) in Allgemeinanästhesie statt, kann aber auch in Lokalanästhesie durchgeführt werden [18, 20]. Die KM-Entnahme in Lokalanästhesie wird vor allem im Rahmen von Studien notwendig werden, um den Tumorzellstatus im Knochenmark nach erfolgter (sekundärer) adjuvanter Therapie zu evaluieren. Es scheint unerheblich zu sein, ob der hintere oder vordere Beckenkamm für die KM-Entnahme punktiert wird. Die Nachweisraten im Knochenmark sind von der Punktionsstelle unabhängig [24]. Zur KM-Entnahme hat sich die Verwendung von Heparin als Antikoagulanz durchgesetzt [8, 10, 13–15, 18, 22, 23, 25]. EDTA [26] oder Zitrat [27] können ebenfalls eingesetzt werden. Das Knochenmark sollte innerhalb 24–48 Stunden aufgearbeitet werden, da die Tumorzellen möglicherweise absterben und nicht mehr nachweisbar sind [15, 22, 28]. Bislang liegen noch keine Daten zur idealen Lagerungstemperatur bis zur Aufarbeitung vor. In den meisten Studien wurden die Proben bei 4 °C oder Raumtemperatur gelagert.

### Knochenmarkaufarbeitung

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen wird zunächst eine Anreicherung der mononukleären Zellschicht mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt [8, 10, 13, 14, 18, 26, 27, 30]. Zur Erhöhung der Nachweisrate kann ggf. eine positive oder negative immunmagnetische Separation angeschlossen werden, bei der entweder die Tumorzellen angereichert (positiv) oder die hämatopoetischen Zellen entfernt werden (negativ) [8, 27]. Allerdings konnte für das KM bis dato keine Studie eindeutig zeigen, dass die immunmagnetische Separation zu einer Erhöhung der Positivitätsrate im Knochenmark führt. Aufgrund der höheren Kosten und der fehlenden Evidenz für eine Verbesserung der klinischen Aussagekraft ist die immunmagnetische Separation derzeit nicht für den Routinenachweis empfohlen. Nach Anreicherung der mononukleären Zellschicht werden die Zellen gewaschen und ausgezählt. Um eine standardisierte Auswertung zu ermöglichen, sollte eine definierte Zellzahl auf den Objektträger aufgebracht werden. Eine Zellzahl von 0,5–1,0 × 10<sup>6</sup> pro Objektträger ermöglicht eine adäquate Zelldichte für eine manuelle bzw. automatische Auswertung [13, 14, 18]. Zur Verbesserung der Zelladhäsion sollten Poly-Lysin-beschichtete Objektträger verwendet werden [22, 25, 26, 28]. Die optimalen Lagerungsbedingungen für ungefärbte Objektträger/Zytospins sind noch nicht ausreichend untersucht worden. Die meisten Arbeitsgruppen empfehlen, die Präparate bei –20 °C bzw. –80 °C zu lagern [14, 18, 25, 26, 22, 23]. Falls die immunhistochemische Färbung innerhalb 24 h erfolgt, ist eine Lagerung der Objektträger bei Raumtemperatur oder –4 °C ausreichend [10, 15, 26].

### Fixierung der Knochenmarkpräparate

Bis dato ist noch kein optimales Fixierungsprotokoll für Knochenmarkpräparate definiert worden. In der Regel werden die getrockneten Zytospins vor Beginn der immunhistochemischen Färbung fixiert [13, 25]. Im Nachfolgenden sind einige Beispiele für eine Fixierung aufgeführt: 0,5% [30] oder 4% [27] gepuffertes

**Tab. 1** Übersicht über die wichtigsten Studien zum Nachweis der prognostischen Bedeutung disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

Autor	Anzahl Patientinnen	Positivitätsrate (%)	Antikörper/ Zielantigen	Material	Prognose
Coombes et al. [1]	269	23	E29	KM-Aspirat	DFS
Schlimok et al. [32]	155	18	CK18	KM-Aspirat	DDFS
Porro et al. [3]	159	16	Mbr1	KM-Biopsie	n. u.
Salvadori et al. [4]	121	17	Mbr1	KM-Biopsie	n. u.
Mathieu et al. [5]	93	1	KL1	KM-Biopsie	n. u.
Dearnaley et al. [6]	37	33	EMA	KM-Aspirat	DFS, OS
Cote et al. [7]	49	37	T16, C26, AE-1	KM-Aspirat	DFS, OS
Wiedswang et al. [8]	817	13	AE-1, AE-3	KM-Aspirat	DDFS, OS*
Harbeck et al. [9]	100	38	E29, 12H12	KM-Aspirat	DFS, OS*
Diel et al. [10]	727	43	TAG 12/2E11	KM-Aspirat	DFS, OS*
Funke et al. [11]	234	38	CK18	KM-Aspirat	n. u.
Mansi et al. [12]	350	25	E29	KM-Aspirat	DFS, OS
Braun et al. [13]	552	36	A45-B/B3	KM-Aspirat	DDFS, OS*
Gerber et al. [14]	554	31	CK8, 18, 19	KM-Aspirat	DFS, OS*
Gebauer et al. [15]	393	42	CK/EMA	KM-Aspirat	DFS*, OS
Pooled Analysis [17]	4703	31	CK, mucin	KM-Aspirat	DDFS, OS

Abkürzungen: CK: Zytokeratin, DFS: signifikante Korrelation zwischen KM-Status und rezidivfreiem Überleben (DFS: disease-free survival), DDFS: signifikante Korrelation zwischen KM-Status und metastasenfreiem Überleben (DDFS: distant disease-free survival), OS: signifikante Korrelation zwischen KM-Status und Gesamtüberleben (OS: overall survival); n. u.: nicht untersucht. \*unabhängiger Prognosemarker in der multivariaten Analyse

Formalin für 10 min bei RT (Raumtemperatur) oder Paraformaldehyd für 5 min bei RT [26], Azeton für 10 min bei 4°C oder RT [10, 22, 25] sowie eisgekühltes Methanol für 5 min [10, 14, 28].

### Immunzytochemische Färbung

Der Goldstandard zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Mammakarzinompatientinnen ist derzeit der immunzytochemische Nachweis unter Verwendung der APAAP-Technik [8, 13, 22, 23, 25, 26, 29, 30]. Zum Blocken der endogenen alkalischen Phosphatase ist der Einsatz von Levamisol (2 mM) empfohlen. Alternativ können Blocking-Lösungen, die in den entsprechenden kommerziell erhältlichen Färbekits enthalten sind, verwendet werden. In den meisten Studien werden zum Tumorzellnachweis Anti-Zytokeratin-Antikörper wie z. B. A45-B/B3 [13, 25, 26, 30] oder AE1/AE3 [8, 22, 25] eingesetzt (☉ Tab. 1). Antikörper, die gegen epitheliale Membranantigene wie EpCAM (epitheliales Adhäsionsmolekül), HMFG (humanes Milhfettglobulin) oder TAG 12 (tumorassoziiertes Glykoprotein) gerichtet sind, sollten nicht als alleiniger Detektionsantikörper verwendet werden, da die Sensitivität der Anti-Membranantigen-Antikörper im Vergleich zu den Anti-Zytokeratin-Antikörpern geringer ist [31–33]. Allerdings lässt die derzeitige Datenlage noch keinen Schluss zu, welcher Zytokeratin-Antikörper für den Tumorzellnachweis im Knochenmark standardmäßig verwendet werden soll.

### Qualitätskontrollen

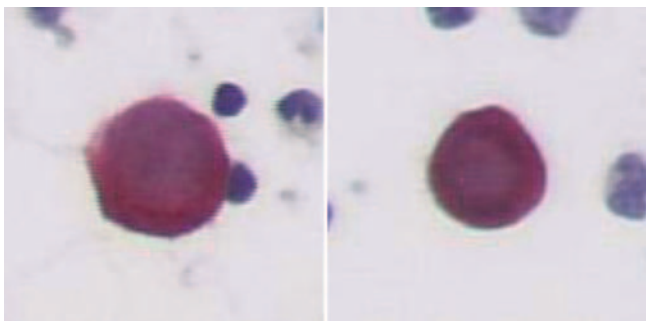
Die Verwendung von geeigneten Qualitätskontrollen ist eine Grundvoraussetzung, um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Aus diesem Grund sollten grundsätzlich negative und positive Färbekontrollen eingeschlossen werden. Als negative Kontrollen eignen sich zum einen Leukozyten gesunder Blutspender bzw. von Patienten mit benignen Erkrankungen [8, 13, 15, 22, 30]. Zum anderen sollten zusätzlich Isotypidentische Antikörper-Kontrollen (IgG) mit einem nicht spezifischen Antikörper durchgeführt werden, um eine unspezifische Antikörperbindung auszuschließen [22, 25–27, 30]. Als positive Färbekontrollen werden Zelllinien wie SKBR3, MCF-7 oder BT-20

verwendet [13, 15, 26]. Bis dato nicht zwingend empfohlen, aber durchaus sinnvoll, ist zusätzlich die Durchführung von routinemäßigen Spiking-Experimenten mit Zelllinien, z. B. 1000 SKBR3 Zellen per  $10^6$  Leukozyten, um die Sensitivität der Nachweismethode zu bestimmen und die Inter-Assay-Variabilität zu evaluieren. Falls zukünftig Multizenterstudien durchgeführt werden, müssen diese Qualitätskontrollen Pflicht werden. Darüber hinaus wird im Rahmen der Qualitätssicherung zusätzlich die Durchführung von Ringversuchen obligat werden.

### Auswertung der Knochenmarkaspirate

Die Auswertung der Objektträger muss in der Regel „blind“ und durch zwei unabhängige, zytologisch erfahrene Ärzte (alternativ Zytologieassistentin/Arzt) erfolgen [26, 30]. Insgesamt sollten  $2 \times 10^6$  Zellen pro Patientin (entspricht zwei bis vier Zytospins, je nach aufgebrachtener Zellzahl) ausgewertet werden. Analog werden auch bei den negativen Kontrollen  $2 \times 10^6$  Zellen analysiert. Die Auswertung kann auch automatisiert erfolgen (z. B. ACIS-System, ChromaVision, Medical Systems Inc., CA, USA). Hierzu werden die Objektträger durch ein automatisiertes Mikroskop mit Bildverarbeitungssystem voruntersucht und die gespeicherten „Tumorzell-typischen Ereignisse“ vom Untersucher verifiziert. Die definitive Entscheidung wird somit weiterhin durch die Untersucher – idealerweise zwei – getroffen. Die automatisierte Auswertung bietet zahlreiche Vorteile. Zum einen wird der Zeitaufwand zum Durchmustern der Objektträger deutlich reduziert. Zum anderen scheint die Sensitivität im Vergleich zur manuellen Auswertung höher zu sein. Darüber hinaus können die positiven Ereignisse einfach dokumentiert und deren Lokalisation gespeichert werden, sodass eine Zweitbefundung erleichtert wird [23, 28–30, 34].

Neben der immunhistochemischen Anfärbung sollten zusätzlich zytomorphologische Kriterien mit einbezogen werden, die den malignen Charakter der detektierten Zellen bestätigen [12, 14, 15, 17, 22, 30]. Die „International Society for Cellular Therapy (ISCT)“ hat zu diesem Zweck Empfehlungen zur zytomorphologischen und immunhistochemischen Identifikation von dis-



**Abb. 1** Typische Zytomorphologie (großer Zellkern, Zellkern/Zellplasma-Relation  $> 1$ , granulierter Zellkern) bzw. Immunophänotyp (Zytokeratinfärbung bedeckt Zellkern, starke zytoplasmatische Färbung) disseminierter Tumorzellen einer Mammakarzinompatientin.

**Tab. 2** Zytomorphologische und phänotypische Merkmale disseminierter Tumorzellen unter Verwendung von Anti-Zytokeratin-Antikörpern und der APAAP-Detektmethode [25, 43]

Zytomorphologie und Phänotyp disseminierter Tumorzellen
▶ vergrößerter Zellkern
▶ Verhältnis Zellkern/Zytoplasma $> 1$
▶ granulierter Zellkern (unregelmäßige Struktur des Zellkerns)
▶ große Nukleoli
▶ Zellkluster
▶ starkes und/oder unregelmäßig gefärbtes Zytoplasma
▶ immunzytologische Färbung bedeckt zumindest partiell Zellkern
▶ einzelne Zytokeratinfilamente sind erkennbar (netzartige Struktur)

seminierten Tumorzellen herausgegeben (wie in **Tab. 2** zusammengefasst) [8, 25] (**Abb. 1**).

### Empfehlungen zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Die folgenden Empfehlungen und deren Auslegung wurden im Rahmen des Konsensustreffens diskutiert und als derzeitiger Standard definiert (**Tab. 3**, Empfehlung I).

**Klassifikation zytokeratin-positiver Zellen** But molecular analysis provided evidence to assume that cytokeratin-positive DTC are malignant cells [36–40].

In den meisten Studien erfolgt eine Klassifikation der immunhistochemisch positiven Ereignisse als Tumorzellen und falsch positive hämatopoetische Zellen. Die Bestätigung des malignen Charakters der detektierten Zelle kann zwar über den Nachweis von genetischen Änderungen erfolgen, beruht aber meist auf zytomorphologischen Kriterien [35–39]. Da der maligne Charakter der detektierten Zellen nicht immer eindeutig aufgrund der Zytomorphologie festgelegt werden kann, wurde aus diesem Grund in verschiedenen Untersuchungen mehr als zwei Kategorien für die immunhistochemische Auswertung vorgeschlagen. Die zusätzlichen Kategorien umfassen apoptotische Zellen, wahrscheinlich hämatopoetische Zellen und wahrscheinlich Tumorzellen [23, 26, 40]. Die klinische Bedeutung solcher Kategorien ist derzeit noch unklar. Aus diesem Grund wurde von dem Konsensuspanel folgende Basisklassifikation vorgeschlagen (**Tab. 4** und **5**, Empfehlung II/III).

**Tab. 3** Empfehlung I: Richtlinien für den standardisierten Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mittels Immunzytochemie

1. Mindestens 5–10 ml Knochenmark sollten jeweils von zwei Seiten des vorderen oder hinteren Beckenkamms entnommen werden. Als Antikoagulans kann entweder Heparin (2 ml) oder EDTA (2% w/v) verwendet werden.
2. Die Knochenmarkproben sollten innerhalb 48 Stunden verarbeitet werden. Falls keine sofortige Verarbeitung des Knochenmarks möglich ist, sollte die Lagerungstemperatur zwischen 4 °C und 20 °C liegen.
3. Zur Anreicherung der mononukleären Zellschicht sollte eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll™ durchgeführt werden.
4. Falls die Objektträger/Zytospins innerhalb 48 h immunzytochemisch gefärbt werden, können diese bei 4 °C oder Raumtemperatur gelagert werden. Ansonsten sollte die Lagerungstemperatur der Objektträger –20 °C – 80 °C betragen.
5. Für die Fixierung kann derzeit kein Standard definiert werden. Übliche Fixierungen sind gepuffertes Formalin (10 min, RT) Azeton (5 min oder 10 min, 4 °C). Alternativ können die Objektträger mit p-Formaldehyd (5 min, RT) oder eisgekühltem Methanol fixiert werden.
6. Zum immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen sollten Anti-Zytokeratin-AK, wie z. B. A 45-B/B3, and AE 1/AE3, oder monoklonale Panzytokeratin-AK mit validierter Spezifität verwendet werden. Als Detektionssystem sollte das APAAP-System eingesetzt werden.
7. Die endogene alkalische Phosphatase sollte mit Levamisol (oder mit einem kommerziell erhältlichen Blocking-Reagens) geblockt werden.
8. Mammakarzinom-Zelllinien (z. B. MCF-7 oder SKBR3) sowie Leukozyten gesunder Blutspender sollten als Positiv- bzw. Negativkontrollen verwendet werden. Zusätzlich sollten Isotypen-gematchte Kontrollen (IgG) als Negativkontrollen mitgeführt werden.
9. Sowohl für den Nachweis disseminierter Tumorzellen als auch für die negativen (Isotypen-gematchten) Kontrollen müssen mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen gefärbt und von zwei unabhängigen Untersuchern „geblindet“ ausgewertet werden.

**Tab. 4** Empfehlung II: Klassifizierung zytokeratin-positiver Zellen

- Positiv:** Zytokeratin-positiv/immunzytochemisch positive Zellen, Morphologie entsprechend einer disseminierten Tumorzelle (Anzahl der disseminierten Tumorzellen sollte dokumentiert werden).
- Negativ:** Kein Nachweis immunzytochemisch positiver Zellen oder nur Nachweis von immunzytochemisch-positiven Zellen jedoch zytomorphologisch nicht tumorzellartig, z. B. hämatopoetische Zelle, squamöse (epidermale) Zellen.

**Tab. 5** Empfehlung III: Interpretation und Dokumentation des Knochenmarkstatus

- positiv:** Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark
- negativ:** kein Hinweis auf disseminierte Tumorzellen

### Klinische Wertigkeit des Knochenmarkstatus

#### Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen gilt als unabhängiger prognostischer Marker. Dies konnten mehrere unizentrische Studien belegen [8, 10, 12–15, 26, 41]. Darüber hinaus wurden kürzlich die Daten der Pooled Analysis vorgestellt [17]. Im Rahmen dieser Analyse wurden die Überlebensdaten von 4703 Mammakarzinompatientinnen im Stadium I–III aus 9 verschiedenen Zentren hinsichtlich des Knochenmarkstatus ausgewertet. Die Positivi-

**Tab. 6** Empfehlung IV: Knochenmarkstatus als Prognosefaktor

Basierend auf Ergebnissen von verschiedenen unizentrischen Studien sowie den Daten der Pooled Analysis ist der Knochenmarkstatus ein Prognosefaktor mit Level of Evidence I.

**Tab. 7** Empfehlung V: Knochenmarkstatus als Stratifizierungsparameter für klinische Studien

Der Knochenmarkstatus sollte als Parameter für therapeutische Entscheidungen nur im Rahmen von prospektiven klinischen Studien eingesetzt werden.

**Tab. 8** Empfehlung VI: Reevaluierung des Knochenmarkstatus nach adjuvanter Chemotherapie

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen bei rezidivfreien Mammakarzinopatientinnen nach Operation und erfolgter adjuvanter Therapie ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Level of Evidence III).

**Tab. 9** Empfehlung VII: Therapiemonitoring mittels Reevaluierung des Knochenmarkstatus

Therapeutische Konsequenzen sollten bei rezidivfreien Patientinnen mit Nachweis persistierender Tumorzellen nicht außerhalb klinischer prospektiver Studien erfolgen.

tätsrate im Knochenmark betrug insgesamt 31%. Der positive Knochenmarkstatus war ein unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben sowie das Mammakarzinom-spezifische Überleben (● **Tab. 6** und **7**, Empfehlung IV/V).

### Reevaluierung des Knochenmarkstatus nach Abschluss der adjuvanten (Chemo-)therapie

Mittlerweile haben verschiedene Studien gezeigt, dass nicht nur der präoperative Nachweis disseminierter Tumorzellen sondern auch die Tumorzellpersistenz im Knochenmark nach Abschluss der adjuvanten Therapie mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [18–20]. In der Studie von Braun et al. erhielten High-Risk-Patientinnen (> 3 Lymphknoten befallen oder ausgeprägte Lymphangiosis) eine taxan- oder anthrazyklinhaltige Chemotherapie. Die Knochenmarkaspirationen erfolgten vor und nach adjuvanter Chemotherapie [19]. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen nach abgeschlossener Therapie war mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Zwei neuere Studien untersuchten die prognostische Relevanz persistierender Tumorzellen im KM von Mammakarzinopatientinnen zwei bis drei Jahre nach Primärdiagnose und bestätigten die Ergebnisse [18,20]. Auch zu dieser Fragestellung liegt mittlerweile eine gemeinsame Analyse mehrerer europäischer Studien vor [42,43]. Basierend auf der Hypothese, dass die persistierenden Tumorzellen Ausgangspunkt für eine beginnende Makrometastasierung sind, kann der Knochenmarkstatus nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie möglicherweise als Entscheidungsgrundlage für eine sekundäre adjuvante Therapie herangezogen werden. Die persistierenden Tumorzellen sind in der Regel nicht proliferierend [19, 44–46]. Daher erscheinen insbesondere therapeutische Ansätze viel versprechend, die zellzyklusunabhängig wirken, wie z. B. die Antikörpertherapie, Bisphosphonate, endokrine Therapien [47–50]. Insbesondere für die Auswahl einer geeigneten „zielgerichteten“ Therapie („targeted therapy“), z. B. gegen HER-2/neu, wird möglicherweise die weitergehende Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen mittels Phäno- und Genotypisierung hilfreich sein [10,51,52]. Der Vorteil einer sekundären adjuvanten Therapie ist derzeit Gegenstand zahlreicher klinischer Studien (● **Tab. 8** und **9**, Empfehlung VI/VII).

### Perspektiven für die klinische Anwendung des Nachweises disseminierter Tumorzellen bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Zahlreiche Studien sowie die Daten der Pooled Analysis belegen, dass der Nachweis von DTZ im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ein unabhängiger Prognosefaktor ist (level of evidence I). Dies gilt für alle wichtigen Zielkriterien wie Gesamtüberleben und Brustkrebs-spezifisches Überleben, sowie für das krankheitsfreie Überleben und das metastasenfreie Überleben, auch in den verschiedenen Untergruppen [17]. Um über die Rolle der DTZ im Knochenmark als reinen Prognosefaktor hinausgehende Anwendungen zu erschließen, sind prospektive klinische Studien notwendig. So kann möglicherweise neben der prognostischen Aussage zum Zeitpunkt der Erstdiagnose hinaus auch eine „Erfolgskontrolle“ der (neo)adjuvanten Therapie durch Reevaluation des Knochenmarkstatus stattfinden [53,54]. Darüber hinaus sollte es in Zukunft möglich sein, durch eine Genotypisierung und Phänotypisierung von DTZ (und möglicherweise auch zirkulierender Zellen im Blut, siehe unten) ein besseres Verständnis des Prozesses der Metastasierung zu entwickeln und eine direkte Untersuchung des Wirkungsmechanismus „zielgerichteter“ Therapieansätze zu ermöglichen [16,51,53].

Eine unabdingbare Voraussetzung für solche Untersuchungen und klinische Studien ist die Etablierung und Publikation eines Konsensus für methodische Fragen des Nachweises von DTZ, wie er in dieser Arbeit auf der Basis vorliegender Daten und der Erfahrungen der Konsensusgruppe formuliert wurde. Die weitere Standardisierung methodischer Fragen ist auch das Ziel einer Reihe internationaler Kooperationen wie dem DISMAL-Projekt (*Disseminated Malignancies*, Koordination K. Pantel), das von der Europäischen Union gefördert wird.

Im Gegensatz zum Knochenmark ist die Datenlage zum prognostischen Wert des Tumorzellnachweises im Blut noch nicht eindeutig. Erste Studien lassen den Schluss zu, dass bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom der Nachweis von zirkulierenden TZ zum Zeitpunkt der Operation dem von DTZ im Knochenmark unterlegen ist [26,55]. Der Nachweis von zirkulierenden TZ im Blut kann jedoch möglicherweise eine wichtige Rolle für die Überwachung des Therapieerfolges einer adjuvanten Therapie spielen, da wiederholte Blutentnahmen einfacher durchzuführen sind als Knochenmarkpunktionen [56,57].

Um die Rolle des Nachweises von DTZ im Knochenmark oder von zirkulierenden Tumorzellen im Blut im Rahmen einer adjuvanten Therapie zu untersuchen, wurde bereits eine Reihe von kli-

nischen Studien geplant bzw. haben bereits begonnen (z.B. www.abcsrg.at/trial21, SUCCESS, ZOL-MRD 1). Die entscheidende Frage ist, ob der Nachweis DTZ die Optimierung und Individualisierung von Therapiestrategien für die einzelne Patientin ermöglicht. Darüber hinaus sollen diese Studien klären, ob die Elimination DTZ als Marker für adjuvantes Therapieansprechen fungieren kann. Dies würde die schnellere Evaluation neuer Therapieansätze in der adjuvanten Situation ohne die bislang notwendigen langen Nachbeobachtungszeiten ermöglichen.

### Fazit für die Praxis

Internationale Studien haben auf höchstem Evidenzniveau den unabhängigen prognostischen Wert des Nachweises von DTZ im Knochenmark von Patientinnen mit einem primären Mammarkarzinom belegt. Mit diesem Konsensus ist es gelungen, Standards für den Tumorzellnachweis im Knochenmark zu definieren. Dies ist die Grundvoraussetzung, um den Tumorzellnachweis im Knochenmark als Stratifizierungsparameter in klinischen (Therapie-)Studien aufnehmen zu können.

### Institute

- <sup>1</sup> Universitätsfrauenklinik Tübingen, Calwerstraße 7, 72076 Tübingen
- <sup>2</sup> Universitätsfrauenklinik Hamburg, Martinistraße 52, 20246 Hamburg
- <sup>3</sup> Universitätsfrauenklinik LMU, Maistraße 11, 80337 München
- <sup>4</sup> Universitätsfrauenklinik Innsbruck, Anichstraße 35, 6020 Innsbruck, Österreich
- <sup>5</sup> Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Vossstraße 9, 69115 Heidelberg
- <sup>6</sup> Institut für Pathologie, Radium Hospital, Ullernchaussen 70, 0310 Oslo, Norwegen
- <sup>7</sup> Institut für Tumorbiologie, Martinistraße 52, 20246 Hamburg
- <sup>8</sup> stellvertretend für die Kommission Tumorzell dissemination der Senologie
- <sup>9</sup> stellvertretend für DISMAL (Disseminated Malignancies) Projekt Konsortium (unterstützt durch das European Community's Framework programme, LSHC-CT-2005-018911)

### Literatur

- 1 Coombes RC, Berger U, Mansi J, Redding H, Powles TJ, Neville AM, McKinna A, Nash AG, Gazet JC, Ford HT. Prognostic significance of micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer. *NCI* 1986; 1: 51–53
- 2 Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, Bastert G. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4102–4108
- 3 Porro G, Menard S, Tagliabue E, Orefice S, Salvadori B, Squicciarini P, Andreola S, Rilke F, Colnaghi MI. Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients. *Cancer* 1988; 61: 2407–2411
- 4 Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F, Barletta L, Menard S, Colnaghi MI. Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1990; 26: 865–867
- 5 Mathieu MC, Friedman S, Bosq J, Caillou B, Spielmann M, Travagli JP, Contesso G. Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15: 21–26
- 6 Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP. Micrometastases in breast cancer: long-term follow-up of the first patient cohort. *Eur J Cancer* 1991; 27: 236–239
- 7 Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749–1756
- 8 Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3469–3478
- 9 Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: Results of a 3-year median follow-up. *British J Cancer* 1994; 69: 566–571

- 10 Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1099–1101
- 11 Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H, Schildberg FW, Jauch KW. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* 1996; 65: 755–761
- 12 Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 1999; 354: 197–202
- 13 Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 525–533
- 14 Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001; 19: 960–971
- 15 Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3669–3674
- 16 Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448–456
- 17 Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 793–802
- 18 Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5342–5348
- 19 Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 80–86
- 20 Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005; 103: 884–891
- 21 Janni W, Hepp F, Rjosk D, Kantenich C, Strobl B, Schindlbeck C, Hantschmann P, Sommer H, Pantel K, Braun S. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer* 2001; 92: 46–53
- 22 Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T, Kumar T, Nesland JM. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: Comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4122–4129
- 23 Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, Bossy B, Ludmann S, Yamamoto K, Masih AS, Espinoza FP, Harrington DS. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3552–3559
- 24 Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Naume B. Detection of isolated tumor cells in BM from breast-cancer patients: significance of anterior and posterior iliac crest aspirations and the number of mononuclear cells analyzed. *Cytotherapy* 2003; 5: 40–45
- 25 Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, Diel IJ, Solomayer E-F, Theocharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau J-P, Garcia J, Pantel K (The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection). Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1999; 5: 377–388
- 26 Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelenat H. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1392–1400
- 27 Choessel V, Anract P, Hoifodt H, Thiery JP, Blin N. A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion mol-

- ecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases. *Cancer* 2004; 101: 693–703
- 28 Kraeft SK, Sutherland R, Gravelin L, Hu GH, Ferland LH, Richardson P, Elias A, Chen LB. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 434–442
- 29 Borgen E, Naume B, Nesland JM, Nowels KW, Pavlak N, Ravkin I, Goldbard S. Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples. *Cytometry* 2001; 46: 215–221
- 30 Fehm T, Becker S, Pergola-Becker G, Kramer B, Gruber I, Sotlar K, Kurek R, Wallwiener D, Solomayer E. Influence of tumor biological factors on tumor cell dissemination in primary breast cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 4211–4216
- 31 Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3: 165–173
- 32 Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8672–8676
- 33 Thor A, Viglione MJ, Ohuchi N, Simpson J, Steis R, Cousar J, Lippman M, Kufe DW, Schlom J. Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow. *Breast Cancer Res Treat* 1988; 11: 133–145
- 34 Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer EF. Image analysis systems for the detection of disseminated breast cancer cells on bone-marrow cytopins. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 115–119
- 35 Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 7737–7742
- 36 Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3457–3464
- 37 Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360: 683–689
- 38 Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2073–2084
- 39 Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 2005; 8: 227–239
- 40 Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Harbitz T, Nesland JM. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3091–3097
- 41 Wong GYC, Yu QQ, Osborne MP. Bone marrow micrometastasis is a significant predictor of long-term relapse-free survival for breast cancer by a non-proportional hazards model. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82: 99
- 42 Janni W, Naume B, Rack B, Gerber B, Braun S, Friese K. Persistierende Tumorzellen (PTZ) im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen als Surrogatmarker für ein erhöhtes Rezidivrisiko in der onkologischen Nachsorge – Resultate einer europäischen Pooled-Analysis. *Geburtsh Frauenheilk* 2005; 66: ■
- 43 Becker S, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nach adjuvanter systemischer Therapie. *Senologie* 2005; 2: ■
- 44 Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1419–1424
- 45 Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herylyn D, Terstappen LWMM, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Uhr JW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8152–8162
- 46 Braun S, Hepp F, Kantenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, Willgeroth F, Sommer HL. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3999–4004
- 47 Kirchner EM, Gerhards R, Voigtman R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. *Ann Oncol* 2002; 7: 1044–1048
- 48 Janni W, Rack B, Sommer, Rjosk D, Thieleke W, Schindlbeck C, Gerber B, Friese K. Der Einfluss von Zoledronat auf den Verlauf persistierender isolierter Tumorzellen im Knochenmark von rezidivfreien Brustkrebspatientinnen. *Geburtsh Frauenheilk* 2003; 63: ■
- 49 Krämer B, Solomayer EF, Wallwiener D. Einfluss von Zoledronsäure auf die Tumorzell dissemination beim primären Mammakarzinom. *Geburtsh Frauenheilk* 2005; 66: ■
- 50 Solomayer EF, Wallwiener D, Fehm T. Aktuelle Bedeutung der Bisphosphonate in der systemischen Therapie des Mammakarzinoms. *Senologie* 2005; 2: ■
- 51 Fehm T, Gebauer G, Becker S, Vogel U, Biltmann B, Wallwiener D, Solomayer E. Genotypisierung von disseminierten epithelialen Zellen bei Mammakarzinompatientinnen. *Geburtsh Frauenheilk* 2004; 64: 255–260
- 52 Fehm T, Becker S, Neubauer, Huober J, Wallwiener D, Solomayer E. HER2 Status disseminierter Tumorzellen im Vergleich zum Primärtumor bei Mammakarzinompatientinnen. *Geburtsh Frauenheilk* 2003; 63: ■
- 53 Braun S, Naume J. Circulating and disseminated tumor cells. *Clin Oncol* 2005; 23: 1623–1626
- 54 Fehm T, Becker S, Wallwiener D, Solomayer E. Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf den Nachweis disseminierter Zellen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen. *Senologie* 2006; 3: 162
- 55 Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer*, in press ■
- 56 Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Janicke F, Pantel K. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3678–3685
- 57 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781–791