

University of Groningen

New ways to optimize breast cancer treatment

Schröder, Carolina Pia

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Schröder, C. P. (2001). *New ways to optimize breast cancer treatment*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Hoofdstuk 12

Nederlandse samenvatting

Optimaliseren van de behandeling van borstkanker: detectie van micrometastasen

Borstkankerpatiënten zonder aantoonbare uitzaaiingen bij het stellen van de diagnose, kunnen na verloop van tijd toch opnieuw ziekteactiviteit ontwikkelen. Waarschijnlijk waren bij deze patiënten zeer kleine uitzaaiingen, micrometastasen, reeds bij het stellen van de diagnose aanwezig. Gevoelige methoden om micrometastasen te detecteren zouden mogelijk kunnen helpen bij de selectie van patiënten voor vroege systemische ('adjuvante') behandeling. Met name gelet op mogelijke nieuwe behandelingsvormen voor de vroege stadia van borstkanker (zoals bijvoorbeeld hoge-dosis chemotherapie gevolgd door een transplantatie van bloedstamcellen) wordt een goede selectie van patiënten die hier het meeste baat bij zouden kunnen hebben, belangrijk. Vrouwen voor wie geen gunstig effect van de behandeling valt te verwachten, zouden dan de bijwerkingen van een dergelijke behandeling bespaard kunnen blijven. Door detectie van micrometastasen zou mogelijk tevens het effect van de behandeling beter in kaart kunnen worden gebracht. Ook zou een dergelijke techniek de mogelijkheid bieden het effect van aanwezigheid van micrometastasen in het getransplanteerde bloedstamcelmateriaal te evalueren, na hoge-dosis chemotherapie. Daarnaast kan de detectie nuttig zijn bij de evaluatie van (in-vitro, d.w.z. celkweek) methoden om micrometastasen op te ruimen.

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven met betrekking tot micrometastasen van borstkanker. Hierbij wordt met name aandacht geschonken aan tumorcellen in bloed-stamcel transplantaten, en de effecten van hematopoïetische groeifactoren. Deze groeifactoren kunnen worden gebruikt bij de behandeling van kanker, om de negatieve effecten van chemotherapie op de bloedaanmaak tegen te gaan. In hoofdstuk 3 wordt het gebruik van de marker

(celkenmerk) 'epitheliaal-glycoproteïne-2' (EGP-2) bestudeerd, voor detectie van enkele tumorcellen. EGP-2 komt voor op de celmembraan van alle tumorcellen van epitheliale origine, en zo ook op de celmembraan van borstkankercellen. Als detectiemethoden werden gebruikt: de kwantitatieve 'reverse-transcriptase polymerase chain reaction' (qRT-PCR), alsmede aankleuringen van tumorcellen met antilichamen. Met behulp van de qRT-PCR kan de mRNA expressie van een bepaald gen (de mate waarin het gen wordt 'afgelezen' in de vorm van messenger RNA) worden gemeten. In dit geval is de expressie van EGP-2 specifiek voor epitheliale cellen, maar niet persé voor borstkanker. Voor de opsporing van borstkankercellen in bijvoorbeeld bloed, wordt daarom gebruik gemaakt van het feit dat epitheliale cellen in principe niet in het bloed voorkomen. Naast de marker EGP-2, werd in dit hoofdstuk ook gebruik gemaakt van de epitheliale marker cytokeratine 19. Deze marker wordt vaak gebruikt voor het onderzoek naar micrometastasen. Wij vonden dat de expressie van EGP-2 mRNA per tumor erg wisselde. Het vaststellen van een grens in bloed tussen achtergrond-expressie en expressie die wèl op tumorcellen duidt, wordt door de wisselende expressie in tumoren bemoeilijkt.

In hoofdstuk 4 werd gebruik gemaakt van een serie bloedmonsters (verzameld voor-, tijdens-, en na de operatie), en tumoren van dezelfde borstkankerpatiënten. Tevens kon bij dezelfde patiënten de zogenaamde schildwachtklier worden bestudeerd. Deze lymfklier uit de okselregio, wordt beschouwd als de eerste klier waar de borstkanker zich naar toe uitzaait. In deze studie werd wederom gebruik gemaakt van antilichaamkleuringen. Daarnaast werd de qRT-PCR geautomatiseerd met behulp van de 'real-time' methode. Hiermee worden de expressiesignalen in de loop van de tijd gemeten, in plaats van aan het einde van de qRT-PCR reactie. Met behulp van deze technieken kon zo laag als 1 tumorcel per 1 tot 2 miljoen leukocyten (kernhoudende cellen in het bloed) worden gemeten. In controle lymfklierweefsel van patiënten zonder kanker werd specifieke CK19 kleuring gezien, maar geen qRT-PCR

signaal. Ook controle bloedmonsters waren negatief. In de primaire borsttumoren van 58 patiënten werd weer een grote variatie gevonden in de expressie van EGP-2 en CK19. Bij de schildwachtklier van 16 patiënten werden tumorcellen aangetoond met routine morfologisch onderzoek of met antilichaamkleuring voor EGP-2 en CK19. Met de qRT-PCR methode werden echter ook vals-positieve en vals-negatieve uitslagen waargenomen, ondanks dat er een correlatie tussen de aanwezigheid van tumor was met de hoogte van het expressie niveau. De bloedmonsters (149 totaal) waren allemaal negatief met de antilichaamkleuringen, maar met de qRT-PCR hadden 19 patiënten (één derde deel van de patiënten) op één of meerdere momenten een positief monster.

Concluderend werd ook in deze studie een grote variatie van expressie van EGP-2 en CK19 gevonden in primaire borsttumoren. Omdat niet alle tumorcellen deze markers simultaan op een hoog niveau tot expressie brengen, is de sensitiviteit (gevoeligheid) van de detectie waarschijnlijk gebaat bij het gebruik van beide markers, los van elkaar. Bij de schildwachtklieren werd een sensitievere en specifiekere detectie gevonden m.b.v. antilichaamkleuringen dan met de qRT-PCR methode. Een voordeel van de antilichaamkleuringen was, dat door visuele controle een onderscheid tussen aspecifieke kleuring en tumorcellen gemaakt kon worden. De bloedmonsters waren allemaal negatief met antilichaamkleuringen, terwijl juist bij een groot deel van de patiënten een bloedmonster positief werd bevonden met qRT-PCR. Mogelijk geeft dit aan dat de gevoeligheid van de qRT-PCR methode voor de detectie van micrometastasen in bloedmonsters, beter is dan die van de antilichaamkleuringen. De betekenis van deze bevindingen zal duidelijk worden, bij het koppelen met de gegevens over het klinische beloop op lange termijn. Een belangrijke bevinding van deze studie was dat de negatieve controles negatief bleven met de qRT-PCR methode. Hierdoor verviel de noodzaak van het koppelen van

tumorweefsel aan bloed voor de bepaling van een expressie grens voor EGP-2 of CK19, met de vernieuwde real-time qRT-PCR methode.

In hoofdstuk 5 werd derhalve deze qRT-PCR methode toegepast op bloed- en bloed-stamcelmonsters, die waren verzameld van 59 borstkankerpatiënten, vooraf, tijdens en na de behandeling. Deze patiënten, met vier of meer tumor positieve okselklieren, namen allemaal deel aan een landelijke studie waarin het effect van standaard-dosis chemotherapie werd vergeleken met hoge-dosis chemotherapie plus bloed-stamcel transplantatie. Van de 174 monsters werden er met de antilichaamkleuringen tumorcellen aangetroffen bij twee patiënten: in één bloedmonster en één bloed-stamcelmonster. Met de qRT-PCR methode waren monsters van 13 patiënten positief. Het betrof hierbij 8 bloedmonsters en 5 bloed-stamcelmonsters. Eén patiënt had een positief monster met beide technieken, maar wel op verschillende tijdstippen. Ook voor deze studie geldt, dat de klinische betekenis van dit soort bevindingen pas duidelijk kan worden, indien gecombineerd met gegevens over het klinische beloop van een grote groep van dergelijke patiënten.

Optimaliseren van de behandeling van borstkanker: verwijderen van micrometastasen

In hoofdstuk 6 werd een methode beschreven om in een experimenteel in-vitro systeem micrometastasen te kunnen verwijderen vanuit bloed-stamcellen. De achtergrond hiervoor is, dat de aanwezigheid van micrometastasen in bloed-stamcelmateriaal, na transplantatie mogelijk aanleiding kan geven tot terugkeer van de ziekte. Epitheliale tumorcellen kunnen specifiek worden opgeruimd door gebruik te maken van bispecifiek antilichaam BIS-1. Dit antilichaam is gericht tegen EGP-2 en de T cel receptor CD3. Door de verbinding die het bispecifieke antilichaam kan leggen tussen de tumorcellen en geactiveerde T cellen (die een belangrijke rol spelen

bij de afweer van het lichaam), kunnen de tumorcellen zeer specifiek door de T cellen worden gedood. De T cellen, die aanwezig zijn in het bloed-stamcelmateriaal, werden hiervoor gebruikt. Bij het bestuderen van de samenstelling van het bloed-stamcelmateriaal werd al gevonden dat dit materiaal meer cytotoxische T cellen bevat dan normaal controle bloed. Na verdere activatie van deze T cellen, m.b.v. het antilichaam gericht tegen de CD3 receptor, werd een toename gezien van de tumorcel dood door de T cellen, die nog verder toenam o.i.v. BIS-1. Het maximale effect van het toevoegen van BIS-1 werd na 72 uur pre-activatie gezien, waarbij een > 3 log tumorcel dood werd gevonden. Dit betekent dat meer dan 99,9% van de tumorcellen werden gedood door deze methode. Een belangrijk aspect hierbij was dat het delingspotentieel van de bloed-stamcellen door deze procedure niet werd aangetast. Daarom werd geconcludeerd dat in een in-vitro model specifieke tumorcel dood door bloed-stamcelmateriaal zelf, kan worden bereikt door pre-activatie van dit materiaal, gevolgd door BIS-1 toediening.

Op basis van deze resultaten werd deze methode toegepast in een andere situatie, beschreven in hoofdstuk 7. Hierbij werd een experimenteel in-vitro model ontwikkeld om enkele epitheliale tumorcellen te verwijderen uit ovarium (eierstok)weefsel. Door chemotherapie of radiotherapie kunnen de eierstokken van jonge vrouwen dermate aangetast raken, dat ze er onvruchtbaar door worden. Het invriezen van eierstokweefsel, om het na de behandeling terug te plaatsen bij de vrouw zelf, is een potentiële nieuwe methode om de fertiliteit (vruchtbaarheid) van deze vrouwen te handhaven. Echter, het risico bestaat dat micrometastasen in het eierstokweefsel aanleiding kan geven tot terugkeer van de ziekte. Daarom werd in-vitro het effect van geactiveerde T cellen en BIS-1 op tumorcel dood bestudeerd, in de aan- of afwezigheid van eierstokweefsel. In dit systeem werd geen negatief effect gezien van het toevoegen van eierstokweefsel op tumorcel dood, veroorzaakt door de T cellen met BIS-1. Een belangrijke bevinding was dat het eierstokweefsel na de

procedure nog steeds morfologisch intacte eicellen bevatte. Mogelijkerwijs kan deze methode bijdragen aan het veilig terugplaatsen in de toekomst van eierstokweefsel bij jonge vrouwen, na behandeling zijn voor kanker.

Meer manieren om de behandeling van borstkanker te optimaliseren

In hoofdstuk 8 werd de hematopoïetische groeifactor rhG-CSF (recombinant human granulocyte-colony stimulating factor) gebruikt voor de preventie van koorts bij leucopenie. Bij leucopenie is het aantal witte bloedcellen dat voor de afweer zorgt sterk gedaald; dit komt (tijdelijk) voor door chemokuren. Omdat de afweer hierdoor verminderd is, kan koorts ontstaan. Door het toedienen van rhG-CSF kan de vermindering van het aantal cellen voor de afweer door de chemokuur worden tegengegaan. In een gerandomiseerde studie bij 40 borstkankerpatiënten, die intermediaire hoge-dosis chemotherapie kregen (cyclophosphamide, 5-fluorouracil plus epirubicine of methotrexaat), werd het gebruik van preventieve rhG-CSF vergeleken met preventieve antibiotica (ciprofloxacin en amfotericine B). In de groep die rhG-CSF kreeg, ontwikkelden 7 van de 18 patiënten koorts bij leucopenie (na 10 van de 108 kuren); in de groep die antibiotica kreeg, gebeurde dit bij 7 van de 22 patiënten (na 7 van de 98 kuren); er zat geen verschil tussen beide groepen. De duur van de ziekenhuisopname en de kosten hiervan waren ook niet verschillend voor beide groepen, maar rhG-CSF gebruik was wel 6,6 keer duurder per kuur dan de preventieve antibiotica. De conclusie was, dat ciprofloxacin en amfotericine B een vergelijkbare effectiviteit hebben als rhG-CSF ter voorkoming van koorts bij leucopenie, en goedkoper zijn.

In hoofdstuk 9 werd onderzocht of bloed-stamcellen verouderen door hoge-dosis chemotherapie en transplantatie van bloed-stamcellen. Veroudering van bloed-stamcellen kan mogelijk ongunstige gevolgen hebben op de lange termijn, zoals

maligne afwijkingen in de bloedvormende cellen. Juist bij patiënten met een goede prognose, zijn dat soort lange termijn effecten klinisch relevant. Door het meten van telomeerlengte kan iets worden gezegd over de leeftijd van cellen, omdat telomeren (de uiteinden van chromosomen) bij elke normale celdeling iets korter worden. Telomerase is het enzym dat deze verkorting kan tegengaan. Bij borstkankerpatiënten, die adjuvante behandeling kregen met standaard-dosis chemotherapie (17 patiënten), of hoge-dosis chemotherapie en transplantatie van bloed-stamcellen (16 patiënten), werd daarom telomeerlengte en telomerase activiteit gemeten, voor en na de behandeling. Ook werden de waarden in het bloed gemeten van hemoglobine, MCV, leukocyten en thrombocyten, voorafgaand aan de chemotherapie, en 5 en 9 maanden daarna (t_0 , t_1 , en t_2). Deze waarden in het bloed waren verlaagd op t_1 en t_2 vergeleken met t_0 (hoge-dosis groep: alle waarden; standaard-dosis groep: leukocyten en thrombocyten), en alle waarden waren lager na hoge-dosis chemotherapie vergeleken met standaard-dosis chemotherapie op t_1 . Gepaarde leukocytenmonsters van t_0 en t_1 lieten telomeerlengte veranderingen zien van +0.8 tot -2.2 kb, waarbij 9 patiënten in beide groepen een verkorting hadden (deze verandering was niet significant). Telomerase activiteit bleef onder de detectiegrens in leukocytenmonsters op t_0 en t_1 . De conclusie was, dat zowel standaard- als hoge-dosis chemotherapie een negatief effect op de waarden in het bloed (hemoglobine, MCV, leukocyten en thrombocyten) hebben. Ondanks het feit dat de bloed-stamcellen in deze situatie waarschijnlijk sneller hebben moeten delen om dit negatieve effect te compenseren, werd slechts bij een deel van de patiënten een verkorting van telomeerlengte gevonden, die niet aan de chemotherapie dosering was gerelateerd.

In hoofdstuk 10 werden primaire borsttumoren bestudeerd. Apoptose, d.w.z. gereguleerde celdood, kan in tumorcellen o.a. worden veroorzaakt door middel van de Tumor Necrosis Factor (TNF) familie van receptoren. Deze familie bestaat o.a. uit de zogenaamde 'death receptors' Fas (de receptor voor Fas Ligand, FasL) en DR4 en DR5

(receptoren voor 'TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand, TRAIL). Behandeling met TRAIL zou mogelijk effect kunnen hebben bij tumoren met DR4 en DR5 receptoren. Daarom werd de aanwezigheid van Fas, FasL, DR4 en DR5 in borsttumoren bestudeerd, met behulp van antilichaamkleuringen. Verder werd tumorcelproliferatie, celdood en inhibitie van celdood bestudeerd. Omdat uit in-vitro studies is gebleken dat het onttrekken van oestrogenen aan borstkankercellen effect kan hebben op deze parameters, werd hier ook naar gekeken in een groep primaire borsttumoren, na anti-oestrogene voorbehandeling. Primaire borsttumoren van 35 pre-menopauzale hormoonreceptor-positieve borstkankerpatiënten werden bestudeerd. Negentien patiënten waren niet voorbehandeld; 16 patiënten hadden voorafgaand aan de operatie dagelijks 40 mg tamoxifen (een oestrogeen antagonist) gedurende 7-10 dagen gekregen, plus een injectie van 3,6 mg gosereline (een agonist van LH-RH: luteïnizing hormone releasing hormone). De combinatie van deze medicijnen doet de oestrogeen spiegel bij pre-menopauzale vrouwen dalen, tot een niveau dat vergelijkbaar is met de situatie na verwijdering van de eierstokken. De 'death receptors' DR4 en DR5 waren ruimschoots aanwezig in de meerderheid van de borsttumoren, terwijl dit bij normaal borstweefsel niet- of veel minder het geval was. Anti-oestrogene behandeling voorafgaand aan de operatie beïnvloedde deze aanwezigheid verder niet. Deze resultaten geven aan dat TRAIL mogelijk een tumor-specifieke behandeling voor hormoonreceptor-positieve borstkanker van pre-menopauzale patiënten zou kunnen vormen in de toekomst.

Optimaliseren van de behandeling van borstkanker: toekomstperspectieven

Bij de vroege stadia van borstkanker heeft de invoering van adjuvante systeemtherapie een groot effect op de behandeling gehad. Patiënten met borstkanker in een vroeg stadium hebben een relatief gunstige prognose. Daarom is het van belang

om de klinische voordelen voor individuele patiënten goed te kunnen inschatten van tevoren. In dat kader is het aantrekkelijk om borstkanker in een zeer vroeg, microscopisch stadium te kunnen detecteren. Theoretisch lopen patiënten met micrometastasen risico op het ontwikkelen van uitzaaiingen, en zouden zij bij uitstek baat kunnen hebben bij vroegtijdige systemische behandeling. Net als bij de meeste andere zogenaamde solide tumoren, is er bij borstkanker nog geen gangbare tumor-specifieke marker beschikbaar voor de detectie van micrometastasen. Bij het zoeken naar de 'speld in de hooiberg', brengt dit moeilijkheden met zich mee met betrekking tot de sensitiviteit en specificiteit van de detectie. Het kwantificeren van de expressie van de beschikbare tumor geassocieerde weefsel-specifieke markers (met name met de geavanceerde metingen continue in het verloop van de tijd), heeft de moleculaire detectie van micrometastasen zeer verbeterd. Mogelijk kan deze detectiemethode van waarde zijn voor de evaluatie van bloedmonsters (hoofdstuk 4 en 5 van dit proefschrift). In de expressie van deze weefsel-specifieke markers in primaire tumoren wordt echter een grote variatie aangetroffen (hoofdstuk 3 en 4 van dit proefschrift). Daardoor blijft het maken van onderscheid tussen tumor en gewone cel moeilijk. Werkelijke vooruitgang in dit onderzoeksgebied is dan ook met name te verwachten, als echt tumor-specifieke markers worden ontdekt. Dit zouden bijvoorbeeld tumor-specifieke mutaties kunnen zijn (zoals mutaties in het p53 tumor-suppressor gen). Aan de andere kant blijken de traditionelere antilichaamkleuringen steeds vaker van waarde te zijn. De mogelijkheid om visueel te controleren of de aangekleurde cel werkelijk een tumorcel is, is een voordeel dat andere detectiemethoden nu niet bieden. Het feit dat deze methode arbeidsintensief is, kan mogelijk worden opgevangen door het automatiseren van de eerste evaluatie op hoofdlijnen van grote aantallen cellen (1), waarna het fijnere onderzoek van daadwerkelijk aangekleurde cellen sneller kan worden afgerond.

Terwijl micrometastasen in het beenmerg mogelijk een aanvullende stageringsparameter kan worden bij borstkankerpatiënten zonder duidelijke uitzaaiingen op afstand (2), is de rol van micrometastasen in bloed-stamcelmateriaal minder duidelijk. De resultaten van een aantal grote, gerandomiseerde studies zullen binnenkort duidelijkheid geven over de rol van hoge-dosis chemotherapie en bloed-stamcel transplantaties bij de vroege, adjuvante behandeling van borstkanker (3). Het bestuderen van eventuele aanwezigheid van micrometastasen in bloed-stamcelmateriaal van patiënten die in het kader van deze studies zijn behandeld, en het relateren aan het klinische beloop in de tijd, zal uiteindelijk duidelijkheid geven over het effect van micrometastasen in bloed-stamcelmateriaal. Dit kan dan de rationele onderbouwing bieden voor het al dan niet verwijderen van deze micrometastasen.

Zoals bij bloed-stamcelmateriaal, bestaat ook bij eierstokweefsel van kankerpatiënten de kans op micrometastasen. Voor het mogelijke behoud van vruchtbaarheid bij jonge vrouwen die voor kanker behandeld worden, is een methode in ontwikkeling waarbij eierstokweefsel van deze vrouwen kan worden ingevroren. Het doel hierbij is om het weefsel t.z.t., na de behandeling voor kanker, bij hen terug te plaatsen. Terugplaatsen van eierstokweefsel zou echter, bij de aanwezigheid van micrometastasen, het risico op terugkeer van de ziekte met zich mee kunnen brengen. Terwijl de kans op de aanwezigheid van deze micrometastasen verder onderzocht zou kunnen worden door eierstokweefsel van (borst)kankerpatiënten systematisch hierop te evalueren, kunnen de methoden voor het veilige behoud van vruchtbaarheid bij deze vrouwen verder worden uitgebouwd. Naast de technieken om de tumorcellen uit eierstokweefsel te verwijderen (zoals beschreven in hoofdstuk 7), kunnen hierbij ook ontwikkelingen op het gebied van het uitrijpen van eicellen van belang zijn. Op dit moment lijkt het dat eicellen het beste in de vrouw kunnen uitrijpen, in het ondersteunende eierstokweefsel. Indien echter geselecteerde eicellen in een

kweekstelsel zouden kunnen uitrijpen (in vitro maturatie), zal daardoor het risico van micrometastasen niet meer aanwezig zijn. Een dergelijke kweekmethode voor eicellen van (jonge) vrouwen is op dit moment echter nog niet goed mogelijk.

De behandeling van borstkanker is in toenemende mate gericht op het optimaliseren van de behandeling van individuele patiënten. Hiertoe worden onderzoeksgegevens steeds meer vertaald naar de klinische praktijk. Behandeling van borstkanker 'op maat', door het in kaart brengen van de eigenschappen van de primaire tumor en het toespitsen van de behandeling hierop, lijkt geen utopie meer. Zoals bijvoorbeeld in hoofdstuk 10 van dit proefschrift werd besproken, zou de aanwezigheid van de receptoren DR4 en DR5 in borsttumoren wellicht iets kunnen zeggen over de mogelijkheid van behandeling met hun 'ligand' TRAIL, of een modificatie hiervan. Een snelle, klinisch toepasbare, evaluatie van de verwachte (on)gevoeligheid van primaire tumoren voor verschillende behandelingen kan in de toekomst wellicht een reële optie worden, door de vele (genetische) eigenschappen van tumoren te onderzoeken met nieuwe technieken (zoals een selectief micro-array systeem). De toename van inzicht in de moleculaire achtergrond van tumorgroei, uitzaaiingen en gevoeligheid voor behandelingen, tezamen met de verbetering van beschikbare technieken, biedt de mogelijkheid van steeds beter gefundeerde keuzen in de behandeling. Deze ontwikkeling zal de optimalisatie van de behandeling van borstkanker verder kunnen bevorderen.

Literatuur:

1. 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* 6: 3552-3559, 2000.
2. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CRM, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller 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* 342: 525-533, 2000.

3. Nieto Y, Champlin RE, Wingard JR, Vredenburgh JF, Elias AD, Richardson P, Glaspy J, Jones RB, Stiff PJ, Bearman SI, Cagnoni PJ, McSweeney PA, LeMaistre CF, Pecora AL, Shpall EF. Status of high-dose chemotherapy for breast cancer: a review. *Biol Blood Marrow Transplant* 6: 476-495, 2000.