

Od ponad 20 lat znany jest fakt występowania u pacjentek z pierwotnie operacyjnym rakiem piersi mikroprzerzutów w różnych tkankach i narządach. Obserwuje się m.in. obecność rozsianych komórek nabłonkowych w szpiku kostnym. Materiał uzyskuje się drogą aspiracji z talerza kości biodrowej, a następnie poddaje obróbce, celem wyodrębnienia populacji komórek jednojądrzastych. Spośród nich należy wyizolować komórki wykazujące cechy tkanki nabłonkowej. Do tej pory opracowano szereg metod służących temu celowi, różniących się znacznie zarówno swoistością, jak i czułością uzyskiwanych wyników. Są to m.in. barwienia immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych oraz badania molekularne. Najczęściej wykrywa się obecność cytokeratyn lub kodujących je fragmentów RNA czy DNA. Na podstawie wielu przeprowadzonych badań klinicznych nie udało się jednoznacznie potwierdzić znaczenia prognostycznego występowania komórek nabłonkowych w szpiku kostnym. Wynika to m.in. z faktu stosowania różnych, nieporównywalnych metod wykrywczych, różnych kryteriów doboru chorych, nielicznych grup oraz krótkiego czasu obserwacji. Dla potwierdzenia tej wysoce prawdopodobnej tezy niezbędne jest więc opracowanie standaryzowanych metod wykrywania mikroprzerzutów do szpiku oraz oceny ich fenotypowej i genotypowej charakterystyki. Dzięki nim wieloletnie obserwacje kobiet po radykalnym leczeniu raka piersi z obecnością komórek nabłonkowych w szpiku pozwolą nie tylko na potwierdzenie ich znaczenia prognostycznego, ale i na wdrożenie zindywidualizowanego leczenia przeciwnowotworowego z zastosowaniem najnowszych metod, w tym immunoterapii i terapii genowej.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, czynniki prognostyczne, szpik kostny, mikroprzerzuty, immunohistochemia, cytokeratyny.

# Wykrywanie i znaczenie kliniczne mikroprzerzutów raka piersi do szpiku kostnego

*Detection and clinical significance of micrometastases in bone marrow of patients with breast cancer*

Krzysztof Rożnowski, Maria Litwiniuk,  
Mieczysław Komarnicki

Oddział Chemioterapii, Klinika Onkologii Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Rak piersi jest najczęściej występującym w Polsce nowotworem złośliwym u kobiet. Rocznie notuje się ok. 11 tys. nowych zachorowań [1]. Fakt, iż rak piersi stanowi ogromny problem społeczny powoduje, że od dziesięcioleci wysiłki naukowców i klinicystów onkologów skupione są na coraz dokładniejszym poznawaniu epidemiologii, etiologii, czynników ryzyka występowania tego nowotworu. Pozwoliło to na wyodrębnienie grupy kobiet o zwiększonym ryzyku zachorowania na raka piersi. Upowszechnienie mammografii jako narzędzia badań przesiewowych spowodowało, że w krajach, gdzie programami skryningowymi objęte są wszystkie kobiety, większość przypadków raka piersi wykrywana jest w stadium przedklinicznym. Poznanie biologii nowotworu dało podstawy do standaryzowanego stosowania systemowego leczenia adjuwantowego lub neoadjuwantowego, wychodząc z założenia, że nawet miejscowo zaawansowany nowotwór może, mimo radykalnego leczenia operacyjnego, ulec po miesiącach lub latach uogólnieniu.

Wprowadzenie badań przesiewowych oraz chemioterapii i/lub

hormonoterapii z skojarzeniem z leczeniem operacyjnym pozwoliło na znaczne zmniejszenie ryzyka zgonu z powodu raka piersi. W latach dziewięćdziesiątych XX w. po raz pierwszy zaobserwowano m.in. w Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii spadek umieralności na raka piersi, mimo ciągłej tendencji wzrostowej zapadalności na ten nowotwór. Jednym z istotnych czynników decydujących o sukcesie leczenia jest precyzyjne ustalenie stopnia zaawansowania choroby. Dotyczy to zarówno przypadków kwalifikujących się do operacji jako leczenia pierwszego rzutu, jak i tych, gdzie nowotwór jest zaawansowany miejscowo. W tej sytuacji zastosowanie systemowej terapii indukcyjnej umożliwi radykalny zabieg operacyjny i łącznie z uzupełniającą radioterapią poprawia odległe wyniki leczenia.

Standardy onkologiczne zakładają, że u chorych, które pierwotnie kwalifikują się do leczenia operacyjnego należy poza oceną guza pierwotnego (badanie kliniczne, potwierdzenie histopatologiczne, obustronna mammografia i USG piersi) wykonać badanie radiologiczne klatki piersiowej

*Since early 1980's it is known that in different mesenchymal organs and tissues of patients with primary operable breast cancer disseminated epithelial cells are observed. Several methods have been used to detect those cells. First attempts were made with immunohistochemical staining using monoclonal antibodies against cell membrane epitopes or elements of cytoskeleton like cytokeratins. Other methods include reverse transcriptase polymerase chain reaction, fluorescent hybridisation in situ, negative and positive immunomagnetic selection to detect genes coding molecules typical for epithelial tissues. But so far, on the basis of results of many clinical trials it is not possible to certify that disseminated epithelial cells' presence in bone marrow is independent prognostic factor for estimating disease free survival and overall survival. This might be due to different, uncomparable methods of disclosing these cells used, different criteria of recruitment into clinical trials, small groups of patients or to short time of follow-up.*

*It is necessary to elaborate standardised methods not only for detection of bone marrow metastases but for their phenotype and genotype characterisation as well. Long-term follow-up of patients after radical breast cancer treatment with detection of epithelial cells in bone marrow could prove their independent prognostic character. It also might form the basis for individualized treatment (tailored therapy) with use of all novel anticancer strategies for example immunotherapy or gene therapy.*

*Key words: breast cancer, prognostic factors, bone marrow, micrometastases, immunohistochemistry, cytokeratins.*

i badanie ginekologiczne. W przypadkach stwierdzenia guza o średnicy powyżej 5 cm lub zajęcia węzłów chłonnych oceniono go jako N2 należy rozszerzyć zakres badań dla oceny ewentualnego rozprzestrzenienia procesu nowotworowego. Zaleca się m. in. badanie scyntygraficzne kośćca [2]. Wybór optymalnego leczenia na podstawie stopnia zaawansowania oraz innych klasycznych czynników rokowniczych (stan receptorów estrogenowych i progesteronu, stopień złośliwości histologicznej, typ histologiczny) jest postępowaniem standardowym. Jednak mimo zastosowania klasycznych metod oceny stopnia zaawansowania oraz klasycznych czynników rokowniczych, wśród kobiet zaliczanych do grupy o dobrym rokowaniu (brak zajęcia regionalnych węzłów chłonnych) notuje się do 30 proc. nawrotów choroby w ciągu 10 lat obserwacji. Wynika to z biologii nowotworu, który w wielu przypadkach we wczesnych fazach swojego rozwoju może rozprzestrzeniać się pod postacią mikroprzerzutów niemożliwych do wykrycia klasycznymi metodami diagnostycznymi.

Rak piersi, jak każdy nowotwór, powstaje wskutek ciągu wydarzeń mutacyjnych, doprowadzających do powstania komórek o różnym stopniu odróżnicowania morfologicznego, biologicznego i genetycznego od komórki macierzystej. Guz pierwotny jest strukturą heterogenną, zawiera komórki będące na różnych etapach ciągu mutacyjnego. Część komórek wcześniej nabywa zdolności penetracji do światła naczyń krwionośnych, migracji z krwią krążącą, ponownego przenikania przez śródbłonki naczyń włosowatych narządów, zasiedlania się w przestrzeniach okołonaczyniowych i tworzenia tam stosownego dla siebie środowiska, umożliwiającego powstanie ogniska przerzutowego.

Już od wielu lat wykrywano pojedyncze komórki bądź skupiska komórek raka piersi w węzłach chłonnych, krwi obwodowej, szpiku kostnym [3]. Jednak do chwili obecnej nie udało się jednoznacznie określić znaczenia klinicznego obecności tych komórek. Do tej pory wielu badaczy twierdzi, że obecność mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych nie pogarsza rokowania. Podobnie mimo stwierdzenia u ponad 30 proc. kobiet komórek nabłonkowych w szpiku kostnym w momencie rozpoznania raka piersi po przeprowadzonym skutecznym leczeniu skojarzonym (terapia lokoregionalna+systemowa) po roku jedynie u 2 proc. pacjentek w dalszym ciągu obserwuje się obecność tych komórek [4].

O braku jednoznacznego stanowiska w kwestii znaczenia rokowniczego tych komórek świadczą też różnice terminologiczne w pracach analizujących ten temat [5]. Wielu autorów preferuje określenia *komórki guza* lub *rozsiane komórki nabłonkowe*, co wydaje się trafniej określać charakter zjawiska. Są to pojedyncze komórki lub niewielkie ich skupiska, które oddzieliły się od pierwotnego złośliwego guza nabłonkowego i z biegiem krwi lub chłonki zawędrowały do obcych im ontogenetycznie tkanek lub narządów, np. do wywodzącego się z mezenchymy szpiku kostnego. Ich obecność w innych niż piersi narządach niewątpliwie świadczy o ich złośliwym charakterze, jednak nie dysponuje się obecnie metodami mogącymi jednoznacznie potwierdzić ich zdolności klonogenne i możliwość rozwoju w makroprzerzuty. Obecnie jedynie ich detekcja, a następnie wieloletnia obserwacja grup kobiet wykazujących oraz nie wykazujących obecności tych komórek oraz ocena wyników obserwacji za pomocą metod statystycznych może dać odpowiedź na to pytanie. Dlatego oprócz doskonalenia metod detekcji rozsianych komórek na-

blonkowych należy dążyć do ich fenotypowego i genotypowego scharakteryzowania w odniesieniu do komórek guza pierwotnego [6]. Może to stanowić w przyszłości kolejny element służący indywidualizacji leczenia (tzw. *tailored therapy*). Jest to jednak kwestia przyszłości, gdyż rozsiane komórki epitelialne trudno poddać takiej analizie ze względu na ich niewielką liczbę. Co więcej, mimo ponaddwudziestoletnich doświadczeń do tej pory nie wypracowano standaryzowanej metody wykrywania komórek nabłonkowych wśród komórek mezenchymalnych. Obecnie najpowszechniej używa się technik immunohistochemicznych oraz molekularnej analizy badanego materiału [5].

Większość badaczy uzyskuje szpik kostny drogą aspiracji z talerza kości biodrowej w znieczuleniu ogólnym jednocześnie z przeprowadzaniem radykalnym zabiegiem operacyjnym. Z uzyskanego aspiratu szpiku wyizolowuje się populację komórek jednojądrzastych, np. przy użyciu techniki wirowania w gradiencie stężeń. Następnie materiał jest zagęszczany w cytowirówce, a uzyskany osad utrwalany na szkiełkach mikroskopowych. Tak wyodrębnione komórki poddaje się działaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko specyficznym tylko dla komórek nabłonkowych epitopom. Początkowo za cel przyjęto antygeny występujące w błonie komórkowej: nabłonkowy antygen błonowy (EMA), grupę polimorficznych mucyn nabłonkowych (PEM) – wśród nich antygen MUC-1 – oraz rzadziej antygenów HMFG i TAG [7]. Jednak w ostatnich latach donoszono o obecności tych antygenów również na powierzchni komórek pochodzenia mezenchymalnego – prekursorach linii erytroidalnej, komórkach plazmatycznych, komórkach limfoidalnych [7–9]. Dlatego ocenia się, że uzyskiwano wiele wyników fałszywie pozytywnych. Bardziej specyfic-

ne wydają się być elementy cytoszkieletu, głównie białka z grupy cytokeratyn (CK). Najwyższą czułość i swoistość wykazują testy z użyciem poliwalentnych przeciwciał przeciwko cytokeratynom 8, 18 i 19 [10]. Stosowanie przeciwciał przeciwko pojedynczym cytokeratynom, np. 18, może prowadzić do fałszywie ujemnych wyników, gdyż obserwowano zmniejszoną ekspresję tych cząsteczek w komórkach o jednoznacznie nabłonkowym charakterze, co świadczyło o dużym stopniu odróżnicowania od komórek macierzystych i korelowało z innymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi [11].

Metodami przewyższającymi czułością techniki immunohistochemiczne są badania molekularne. Najczęściej wykrywa się przekątnikowy RNA z sekwencjami kodującymi elementy cytoszkieletu, np. cytokeratyn. Metoda rtPCR (odwrotna transkryptazowa polimerazowa reakcja łańcuchowa) polega na odwrotnej transkrypcji mRNA na komplementarny do niego odcinek DNA, a następnie jego amplifikację techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej [12].

Inną metodą molekularną jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, skierowana bezpośrednio przeciwko kodującemu daną cytokeratynę mRNA. Zaletą tej techniki jest niski odsetek fałszywie dodatnich wyników.

Do detekcji rozsianych komórek nabłonkowych zastosowano również cytometrię przepływową, jednak wyniki uzyskane w ten sposób są niejednoznaczne [13].

Wykorzystano również metody stosowane do oczyszczania materiału przeszczepowego – szpiku bądź komórek krwiotwórczych krwi obwodowej. Dokonuje się zarówno selekcji pozytywnej, jak i negatywnej. Bardziej czuła wydaje się być negatywna separacja immunoma-

gnetyczna [14]. Za pomocą przeciwciał antyCD45 sprzężonych z elementem magnetycznym wyodrębnia się z całej populacji komórek jednojądrzastych komórki hematopoetyczne, tworzące typowe struktury rozetkowe, podczas gdy komórki nabłonkowe pozostają niesprężone. Pozytywne techniki immunomagnetyczne działają odwrotnie – za pomocą przeciwciał przeciwko epitopom nabłonkowym tworzą się struktury rozetkowe, zawierające rozsiane komórki nabłonkowe. Użycie tych metod pozwoliło na ocenę 10 razy większej liczby komórek jednojądrzastych, co zaowocowało 4-krotnym wzrostem częstości i ilości wykrywanych komórek CK-pozytywnych.

W prowadzonych do tej pory badaniach chodzi nie tylko o zwiększenie czułości stosowanych metod – jest to niewątpliwie istotne ze względu na bardzo rzadkie występowanie komórek nabłonkowych wśród mezenchymalnych komórek szpiku. Równie istotne jest jednak zachowanie integralności tych komórek dla oceny ich fenotypu czy też dla oceny nieprawidłowości genetycznych. Krokiem w tym kierunku jest praca Brauna i wsp., w której przedstawiono ekspresję cytokeratyn z innymi antygenami, np. białkiem cerbB-2. Pozytywny wynik podwójnego barwienia immunohistochemicznego może stanowić podstawę do celowanej immunoterapii skierowanej przeciwko białku cerbB-2 [15].

Przedstawione powyżej metody wykrywania rozsianych komórek nabłonkowych różnią się zarówno czułością, jak i swoistością. Między innymi dlatego wiele przeprowadzonych w ostatnich latach badań dostarczyło sprzecznych danych, co uniemożliwia wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących znaczenia klinicznego obecności mikropzerzutów raka piersi w szpiku.

Pierwsze badania z użyciem metod immunohistochemicznych

przeprowadził w 1981 r. Dearnaley z *Royal Marsden Hospital*. Wieloletnia obserwacja zidentyfikowanej przez niego grupy kobiet z obecnością komórek nabłonkowych w szpiku pozwoliła na stwierdzenie, że czas wolny od choroby i całkowite przeżycia tych chorych były znamienne statystycznie krótsze niż pacjentek bez mikroprzerzutów w szpiku [16].

Znaczących danych dostarczyła praca Mansi z 1999 r. analizująca 12-letnią obserwację 350 pacjentek [17]. Spośród nich 25,4 proc. wykazywało w momencie rozpoznania choroby obecność w szpiku komórek nabłonkowych, prezentujących nabłonkowy antygen błonowy (EMA) – wiązało się to z krótszym czasem wolnym od choroby i krótszym całkowitym przeżyciem, jednak nie miało charakteru niezależnego czynnika rokowniczego. Wyciągnięto z tego badania wnioski, iż obecność komórek nabłonkowych w szpiku może mieć znaczenie prognostyczne w przypadku, gdy inne niezależne czynniki, jak wielkość guza, naciekanie naczyń, czy zajęcie węzłów chłonnych jest niemożliwe do oceny z powodu, np. przedoperacyjnej chemioterapii.

Pierwszym badaniem oceniającym komórki nowotworowe w szpiku na podstawie pozytywnego wyniku barwień na obecność cytokeratyn była praca Cote z 1991 r. Wykazał on, że stwierdzenie komórek nabłonkowych w szpiku stanowi niezależny czynnik rokowniczy w odniesieniu do prognozowania czasu wolnego od choroby. Wykazał w analizie wieloczynnikowej, że obecność więcej niż 10 komórek CK-pozytywnych wiąże się z wysokim ryzykiem wczesnego nawrotu choroby [18]. Przeciwnie wyniki uzyskał Singletary w badaniu, którego wyniki ogłosił też w 1991 r. Oceniał szpik 71 pacjentek, 38 proc. z nich wykazywało obecność komórek z ekspre-

sją cytokeratyn, jednak obserwacja ich losów nie dowiodła żadnego znaczenia prognostycznego tego faktu.

Podobnie Molino, w badaniu opublikowanym w 1997 r. wykazał, że losy 31,1 proc. pacjentek spośród 109-osobowej grupy, u których zidentyfikowano w szpiku komórki CK-pozytywne, nie różniły się ani w zakresie czasu wolnego od choroby, ani całkowitego przeżycia od pacjentek wolnych od mikroprzerzutów w szpiku [19].

Do tej pory największą grupę chorych ocenił w badaniu Diel [20]. U 315 chorych (43 proc.) spośród 727 stwierdził obecność komórek nabłonkowych w szpiku, a 36-miesięczna obserwacja wykazała, że obecność mikroprzerzutów jest niezależnym czynnikiem prognostycznym zarówno w odniesieniu do czasu wolnego od choroby, jak i do całkowitych przeżyć. Co więcej, Diel uznając obecność mikroprzerzutów w szpiku za niekorzystny czynnik rokowniczy przeprowadził badanie kliniczne z zastosowaniem kłodronianu w uzupełniającym leczeniu raka piersi, z założeniem zmniejszenia częstości występowania przerzutów do kości [21]. W badaniu wzięty udział 302 pacjentki po operacyjnym leczeniu raka i ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych, określanym poprzez pozytywny wynik badania immunocytochemicznego na obecność komórek CK-dodatnich w szpiku kostnym. Obecność przynajmniej jednej komórki raka w pobranym materiale uznawano za zwiększone ryzyko. Chore randomizowane były do dwóch grup: przyjmujących kłodronian 1 600 mg dziennie przez 2 lata i otrzymujących placebo. Po 36 mies. obserwacji w grupie stosującej kłodronian stwierdzono niższy odsetek przerzutów do kości. W grupie tej zaobserwowano również mniej przerzutów do narządów

mięszkowych, dłuższy czas wolny od choroby i dłuższe przeżycie. Różnice te były istotne statystycznie. Zmniejszenie liczby przerzutów w kościach to efekt oczekiwany, zgodny z wcześniejszymi doniesieniami [22]. Zaskoczenie wywołało natomiast zmniejszenie liczby przerzutów w narządach mięszkowych i wydłużenie przeżycia. Podobne badanie, obejmujące liczniejszą grupę pacjentek potwierdziło ochronny wpływ kłodronianu na kości. U pacjentek otrzymujących kłodronian stwierdzono mniej przerzutów w kościach, nie powtórzyło się jednak korzystne działanie w stosunku do narządów mięszkowych [23]. Inne badanie zakończyło się odmiennymi spostrzeżeniami [24]. Ponieważ badania te mogą nieść bardzo istotne przesłanki praktyczne, a przyniosły różne wyniki, pojawiło się wiele komentarzy i porównań. Celem tych badań było wyjaśnienie roli kłodronianu w leczeniu uzupełniającym pacjentek z rakiem piersi. Tylko w badaniu Diela wybrano do pomiarów grupę chorych, u których przed leczeniem uzupełniającym stwierdzano mikroprzerzuty w szpiku kostnym. Być może jest to właśnie grupa pacjentek odnosząca największe korzyści z uzupełniającego leczenia kłodronianem. Do tej pory badanie Diela było jedynym, które przenosiło uzyskane wyniki oceny obecności mikroprzerzutów w szpiku na konkretne działania terapeutyczne.

Inny bardzo istotny aspekt wykrywania komórek nabłonkowych w szpiku kostnym przedstawiony został w pracy Janni i wsp., opublikowanej w 2000 r. Oceniano w niej znaczenie prognostyczne mikroprzerzutów w szpiku u pacjentek z pierwszym nawrotem raka piersi. Szereg sprawdzonych czynników rokowniczych, takich jak wielkość guza, zajęcie węzłów chłonnych, wynik badania histopatologicznego czy obecność recep-

## PIŚMIENICTWO

1. Pieńkowski T. *Rak piersi*. W: *Onkologia kliniczna*. M. Krzakowski (red). Borgis Wyd. Medyczne, Warszawa 2001; 87-140.
2. Jassem J. *Ocena stopnia zaawansowania*. W: *Rak sutka*. J. Jassem. Springer PWN, Warszawa 1998; 168-81.
3. Sloane JP, Ormerod MG, Neville AM. *Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases*. *Cancer Res* 1980; 40: 3079-82.
4. Domagała W. *Klasyczne i nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku sutka u kobiet*. Nowotwory 1996; 46: 669.
5. Muller P, Schlimok G. *Bone marrow „micrometastases” of epithelial tumors: detection and clinical relevens*. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 607-18.
6. Diel IJ. *Bone marrow staging for breast cancer: is it better than axillary nodal dissection?* *Semin Oncol* 2001; 28 (3): 236-44.
7. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, et al. *Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin*. *J Biol Chem* 1996; 265: 15286-93.
8. Delsol G, Gatter KC, Stein H, et al. *Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implication for diagnosis of human neoplasms*. *Lancet* 1984; 11: 1123-29.
9. Brugger W, Buhning HJ, Grunebach F, et al. *Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implication of micrometastatic tumor cells*. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1535-44.
10. Stosiek P, Kasper M, Karsten U, et al. *Detection of cancer metastases in regional lymph nodes: comparative histological and immunohistological investigations with broad-range anticytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3*. *Neoplasma* 1991; 38: 43-7.
11. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, et al. *Elevated keratin 18 protein indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer*. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1879-85.
12. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm I, et al. *The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry nad reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19*. *Eur J Cancer* 1997; 33: 854-61.
13. Nap M, Brockhoff G, Brandt B, et al. *Flow cytometric DNA and phenotype analysis in pathology*. *Virchows Arch* 2001; 438: 425-32.
14. Naume B, Borgen E, Nesland JM, et al. *Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast cancer patients by negative immunomagnetic separation*. *Int J Cancer* 1998; 78: 556-60.
15. Braun S, Hepp F, Sommer HL, et al. *Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease*. *Int J Cancer* 1999; 84: 1-5.
16. Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP. *Micrometastases in breast cancer: long-term follow up of the first patient cohort*. *Eur J Cancer* 1991; 27: 236-9.
17. Mansi JL, Easton D, Berger U, et al. *Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up*. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1552-5.
18. Cote RJ, Rosen PP, Lesser LM, et al. *Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases*. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749-56.
19. Molino A, Pelosi G, Turazza M, et al. *Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlation with clinical and pathological features and prognosis*. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42: 23-30.
20. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, et al. *Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status*. *J Natl Cancer Ins* 1996; 88: 1652-64.
21. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, et al. *Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment*. *N Engl J Med* 1998; 339: 357-63.
22. Kanis JA, Powles T, Paterson AHG, et al. *Clodronate decreases the frequency of skeletal metastases in women with breast cancer*. *Bone* 1996; 6: 663-7.
23. Powles TJ, Paterson AHG, Nevantaus A, et al. *Adjuvant clodronate reduces the incidence of bone metastases in patients with primary operable breast cancer*. *Prog Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: 123a. Abstract.
24. Saarto T, Blomquist C, Virkkunen P, et al. *No reduction of bone metastases with adjuvant clodronate treatment in node-positive breast cancer patients (abstract no. 489)*. *Proceedings of American Society of Clinical Oncologists*; vol. 18. 35<sup>th</sup> Annual General Meeting; 1999 May 15-18; Atlanta.
25. Janni W, Gastroph S, Hepp F, et al. *Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast cancer*. *Cancer* 2000; 88: 2252-9.

## ADRES DO KORESPONDENCJI

lek. med. **Krzysztof Rożnowski**  
 Oddział Chemioterapii  
 Klinika Onkologii  
 Akademia Medyczna  
 ul. Łąkowa 1/2  
 61-878 Poznań  
 tel. (061) 854 90 19  
 e-mail:  
 krzysztof.roznowski@oncology.am.poznan.pl