

# PARADIGMAVÁLTÁS A TÜDŐRÁKOK NEM SEBÉSZI MINTAVÉTELÉBEN

Strausz János<sup>1</sup>, Tímár József<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet, <sup>2</sup>Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézet, Budapest

A nem-kissejtes tüdőrákok szövettani alcsoportjai eltérő prognosztikai tulajdonságokkal és terápiás érzékenységgel rendelkeznek. Az egyénre szabott kezelések célpontjainak azonosítása a hagyományos patológiai vizsgálatok mellett új módszerek bevezetését igényli. Az alcsoportok elkülönítésének és a célpontok kijelölésének módszereit sebészi biopsziás anyagokon dolgozták ki (erre a tüdőrákos esetek 20%-ában van lehetőség). A tüdődaganatok többsége felfedezéskor már nem operálható, így a diagnózisok többsége lényegesen kisebb, bronchoszkópos, tűbiopsziás mintákon, de döntően citológiai keneteken alapul. A korlátozott nagyságú mintákból a korrekt kezelések érdekében azonban egyre több immunmorfológiai és molekuláris patológiai vizsgálatot szükséges elvégezni. E szemléletváltás miatt a tüdőbiopsziát végző szakemberek mintavételi technikájának súlypontját meghatározóan a szövettani feldolgozásra alkalmas módszerek felé kell áthelyezni. A többféle biopsziás technika kombinálása (szövetten/citológia, illetve hörgőkefe, BAL, TBNA stb.), a citológiai minták sejtblokkokba ágyazása, valamint immunhisztokémiai és molekuláris patológiai vizsgálatokra felkészült patológiai laboratórium biztosíthatja a tüdőrákok megfelelő diagnózisát és a betegek individualizált kezelését. Magyar Onkológia 54: 297–301, 2010

**Kulcsszavak:** tüdőrák, biopszia, citológia, szövettan, célzott terápia

*Histological subgroups of non-small cell lung cancer have different prognosis and they require different therapeutic approaches. Accordingly, there is a clinical need in this field to supplement conventional pathological diagnostics with protein and genetic biomarkers that can help to recognize patients responsive to these therapies. Methods for subgroup classification and target identification were developed using surgical samples (surgical lung tumor specimens are available only in 20% of all lung cancer cases). The majority of lung cancer patients, however, have tumors that are irresectable at the time of diagnosis. Therefore, their diagnosis is usually based on bronchoscopically removed tissue or needle biopsy samples analyzed mainly by cytology. Because of the growing need for immunohistochemistry and molecular pathology in lung cancer diagnosis, emphasis should be given to diagnostic bronchoscopic procedures providing tissue samples. Combination of the different biopsy techniques (histology, cytology, bronchial brush, BAL, TBNA etc.), embedding the cells (preparing cell blocks) and, moreover, the availability of immunohistochemical and molecular pathological facilities are all required to set up the proper diagnosis and therapeutic strategy in human lung cancer. Strausz J, Tímár J. Non-surgical biopsy in lung cancer: a paradigm shift. Hungarian Oncology 54: 297–301, 2010*

**Keywords:** lung cancer, biopsy, cytology, histology, targeted therapy

## BEVEZETÉS

A fejlett országokban a leggyakoribb daganatféleség a tüdőrák (31). E daganattípusban Magyarország férfiak esetében vezeti a nemzetközi halálozási statisztikát, a nők pedig harmadikok e rangsorban. A felfedezés időpontjában a tüdődaganatok 15–25%-a operálható, a nem sebészi esetek kombinált kezelésének eredménye 12 hónapos átlagos túlélési idő.

Az tüdőrák klinikai módszerekkel felállított diagnózisa patológiai megerősítést igényel. Korábbi évtizedekben elegendőnek mutatkozott a daganatsejtek kimuta-

tása és a kissejtes/nem-kissejtes (SCLC/NSCLC) típusok elkülönítése, hiszen a daganatszövet további jellemzésének nem voltak prognosztikai és terápiás következményei. A célzott kezelések megjelenése, bizonyos hagyományos támadáspontú készítmények eltérő hatékonysága (pemetrexed), valamint a hisztológiai típustól függő eltérő mellékhatásprofil (bevacizumab) a korábbi anyagvételi és patomorfológiai technikáknak jelentős kihívást jelentenek (1, 7, 20, 29).

Hazánkban a tüdőrákok nem sebészi igazolása többségében citológiai vizsgálatokon és a direkt kenetkészítés módszerén alapul. A hagyományos citológiai feldol-

Közlésre érkezett:  
2010. szeptember 4.

Elfogadva:  
2010. október 22.

Levelezési cím:  
Dr. Strausz János  
Országos Korányi Tbc  
és Pulmonológiai Intézet  
1121 Pihenő u. 1.  
Telefon/Fax:  
(06-1) 394-3521  
E-mail:  
strausz@koranyi.hu

Rövidítések:  
BAL: broncho-alveolaris  
lavage, TBNA:  
transbronchial needle  
aspiration, SCLC: small  
cell lung cancer, NSCLC:  
non-small cell lung  
cancer, EGFR: epidermal  
growth factor receptor,  
ALK: anaplastic  
lymphoma receptor, IGF:  
insulin-like growth  
factor, HGF: hepatocyte  
growth factor, ROSE: ra-  
pid on site evaluation

1. táblázat. A tüdőrákban alkalmazott mintavételi technikák patológiai sajátosságai

	Sebészi (1A. ábra)	Bronchoszkópos (1B. ábra)	Citológiai (1C. ábra)
Fixálás	paraformaldehid	paraformaldehid	alkohol
Beágyazás	paraffin	paraffin	nincs
Tumor/normális szövet aránya	> 50%	28–47%	1–99%
Tumorszövet arányának növelése	makrodisszekció	mikrodisszekció	Laser capture (1 sejt)

gozás mellett azonban egyre nő az igény a különböző immunmorfológiai és molekuláris patológiai vizsgálatok iránt. Ezek részben már a klinikai gyakorlat részét képezik (KRAS-, EGFR-mutációanalízis), részben pedig a klinikai gyógyszerkutatások alap (belépesi) feltételei között szerepelnek (EML4-ALK, MET, IGFR meghatározása, stb.). A szövettani feldolgozásra alkalmas nem sebészi biopsziás minták iránti igény már nemzetközi ajánlás formájában is megjelent (8).

## MINTAVÉTELI MÓDSZEREK

A radiológiai eltérések és/vagy tünetek, panaszok miatt az elvégzett bronchológiai vizsgálatok eredményei széles határok között mozognak. Endoszkóppal látható endobronchialis elváltozások esetén a szövettani mintavétel alapvizsgálatnak számít, eredményessége 80–90% között mozog. A bronchuskefe, illetve -mosás technikákkal a találati arány tovább növelhető (4, 14, 18).

A bronchoszkóppal nem látható elváltozások röntgen-képerősítő alatti vizsgálatánál is a szövettani mintavétel – ha ennek nincs ellenjavallata – elvárható, minimális követelmény. A közölt találati arányokat befolyásolja a perifériás árnyékok nagysága, elhelyezkedése, valamint a patológiai feldolgozásra alkalmas minták száma (az irodalomban közölt számok 3–6-ig terjednek, az ezekből készíthető (ajánlott) metszetszám pedig 9 és 40 között (!) mozog, a találati arányok 49–97% közöttiek (22, 24)). Az eredményesség függ az excisor nagyságától, a beavatkozás közbeni gyors patológiai vizsgálat lehetőségétől, valamint az intervenciót végző orvos tapasztalatától és az elváltozás természetétől. Perifériás elváltozások esetén is emeli a találati arányt a különböző anyagvételi technikák kombinálása: az excízió mellett elvégzett lenyomati (imprint) citológiai vizsgálat, bronchusmosás, kefebiopszia, TBNA, stb.

## A BIOPSIÁS ANYAG FELDOLGOZÁSA

A hisztológiai feldolgozásra alkalmas bronchológiai minták kvantitatív (morfometriás) vizsgálata kimutatta, hogy a szövetfragmentumoknak csupán 33,4%-a tartalmaz daganatszövetet (NSCLC: 28%, SCLC: 46,5%) (6). A nem daganatos területek kötőszövetből, gyulladással elemekből, illetve normális tüdő/bronchusszövetből tevődnek össze. Ezen adatok megerősítése módosításra

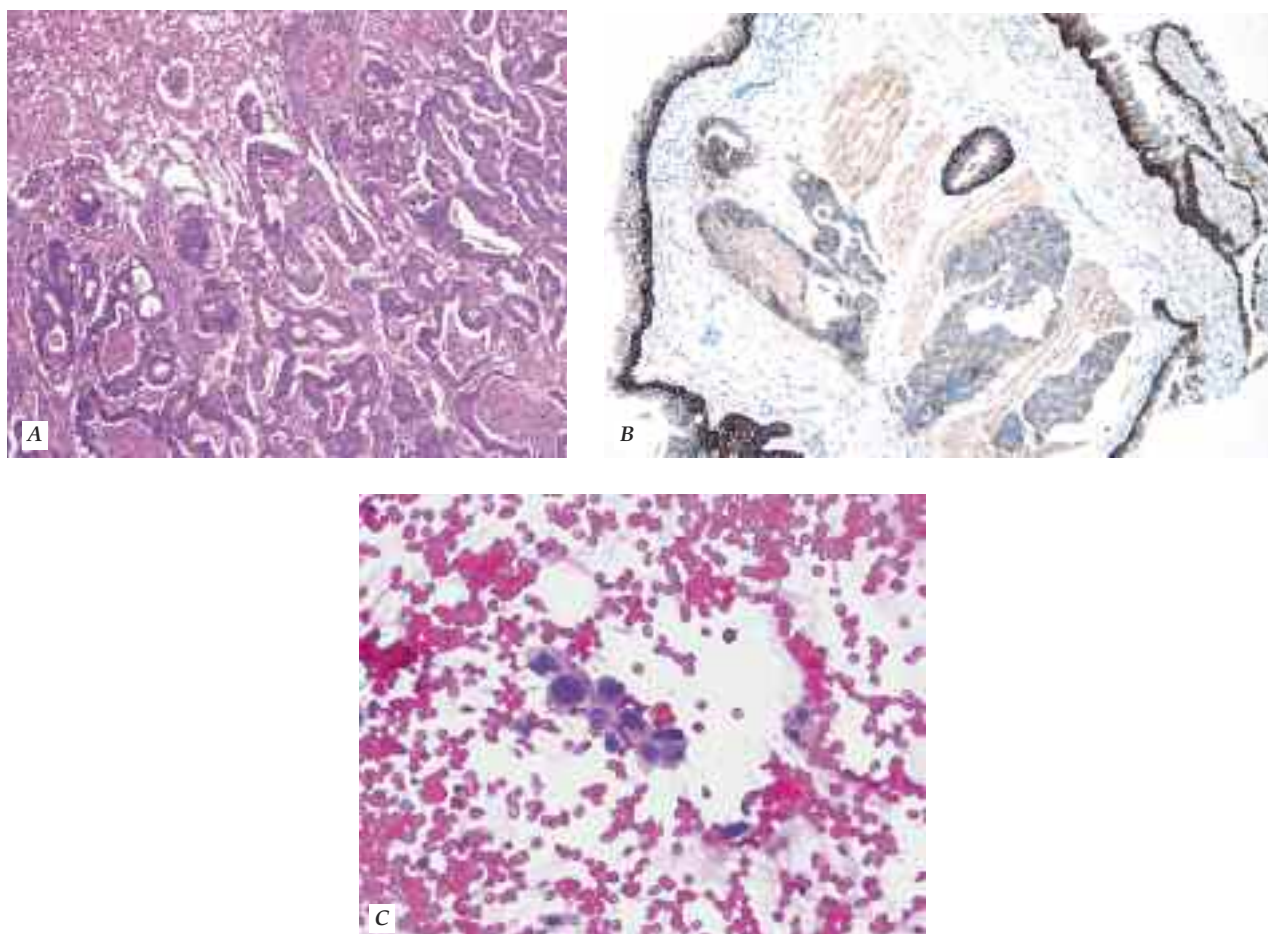
kényszerítheti a molekuláris célpontok meghatározásának rutin módszertanát is, hiszen a különböző izolálási illetve makro- és mikrodisszekciós technikák még nem képezik részét a napi rutinnak. Az sem mindegy, hogy a szövettani mintát milyen formában tárolják: paraffinos blokkokból készített, metszetként tárolt tumorszövet bizonyos antigénjei (pl. EGFR, CD3, chromogranin) immunhisztokémiai kimutathatóságának jelentős csökkenését figyelték meg (2). Fontos látni, hogy a biopsziák feldolgozási szempontból igen hasonlóak a sebészi mintákhoz, míg a citológiai minták alapvetően eltérnek, ami befolyásolja az esetelegesen alkalmazni kívánt immunhisztokémiai és molekuláris vizsgálatokat (1. táblázat).

A NSCLC heterogén daganat, mely a különbözőképpen differenciálódott (laphám-, mirigy-, nagysejtes, nem differenciált [NSCLC-NOS: not otherwise specified]) tumorsejtekből tevődnek össze (28). A kis biopsziás anyag, vagy a citológiai minta nagy valószínűséggel nem képviseli a daganatos szövet pontos összetételét, hacsak nem történik több területről mintavétel.

NSCLC szövettani feldolgozása során az adenocarcinómák 5%-a tartalmazott laphámrák komponenset, a laphámrákos eseteknél pedig 15%-ban figyeltek meg adenocarcinómát (23). A sebészi- és a preoperatív (nem sebészi) szövettani lelet összehasonlítása során a planocellularis daganatok 10%-át, az adenocarcinómák 14%-át, a nagysejtes tumorok 50%-át diagnosztizálták eltérően (5).

A nem sebészi biopsziás anyagokból végzett diagnosztikus tevékenység során a nagysejtes daganatok kevesebb, mint 50%-át, a laphámrákok, illetve az adenocarcinómák 65–90%-át sikerül azonosítani (19). Más adatok szerint endoszkópos szövettani mintában a NSCLC-NOS aránya 25%, míg a citológiai vizsgálatokban 45% (9, 19, 27). Egy lehetséges megoldást kínál a hagyományos szövettani feldolgozás mellett alkalmazott immunhisztokémiai marker-panelek alkalmazása, melyeknél pl. mucin, TTF1, p63, desmocollin-3, napsin kimutatása segítheti a laphámrák és adenocarcinoma elkülönítését (hasonló panel-technikát sikeresen alkalmaznak lymphoma, illetve lágyrésztumorok esetén is). A nem tipizált NSCLC aránya a fenti módszerekkel lényegesen csökkenthető (17, 21, 29).

A NSCLC morfológiai heterogenitása mellett a molekuláris, illetve genetikai vizsgálatok is határozott különbségeket mutatnak tüdőlaphámrák, illetve -adenocarcinoma eseteiben (pl. EGFR-, KRAS-mutáció kimuta-



1. ábra. Különböző technikákkal nyert tüdőrákminták mikroszkópos képe. A. Sebészi reszekció, kis nagyítás, HE-festés. B. Transbronchialis biopsziás minta, EGFR immunhisztokémia; nyíl: daganatszövet. C. Citológiai minta, alacsony daganatsejtszám, módosított HE-festés

tása), melyek szintén felhasználhatóak a NSCLC alcsoportjainak elkülönítésére is (17, 26). Nehézséget okoz azonban az azonos tumoron belül a molekuláris célpontok kifejezett heterogenitása is. Vonatkozik ez az EGFR protein expressziójára, génamplifikációjára, vagy mutációjára egyaránt. Hasonló eltéréseket igazoltak a primer tumor és a távoli metastasisok vonatkozásában is (13, 30).

Nemzetközi munkacsoport publikálta ajánlásait NSCLC esetén biomarkerek meghatározásáról, melynek javaslatai a 2. táblázatban láthatók (8). Hazánkban KRAS-mutációra vonatkozó validálási felmérés történt, azonban nem-sebészi tüdőrákmintákon KRAS-vagy EGFR-mutáció vizsgálatok felmérése nem történt meg (16).

Publikálás előtt áll az a nemzetközi ajánlás (IASLC/ATS/ERS), mely a tüdő-adenocarcinoma szövettani osztályozásáról készült. Ebben új javaslatok szerepelnek a terminológia, speciális festések és a szöveti feldolgozás területén egyaránt. A pulmonológusok, mellkassebészek, képalkotók, patológusok összefogása és egyetértése jelentős haladást mutat e daganatféleség komplex diagnosztikájában.

A tüdőrák diagnózisa 75%-ban csak citológiai vizsgálaton alapul (15). Becsült adatok szerint hazánkban is

háromszor–négyeszer gyakoribb a citológiai feldolgozásra alkalmas mintavételek száma, mint a szövettanié. Ez vagy a sikertelen (elégtelen, vagy eredménytelen) mintavétel, vagy bronchoszkópos vizsgálatokat követő percutan tűbiopsziás vizsgálatok következménye is lehet, melyet az esetek többségében vékony tűvel végzünk, és melyből csak citológiai feldolgozás lehetséges (25). A vastag tűvel elvégzett beavatkozásokat ritkán alkalmazzuk (rendszerint a mellkasfalhoz közeli, vagy az azt elérő elváltozások esetén). Használatukat elsősorban a gyakoribb szövődmények korlátozzák.

A hazai citológiai predominancia a tüdőgyógyászat-hoz kötődő, iskolát teremtő, nem patológiai végzettségű orvosokhoz köthető. Gyors, szinte azonnali diagnosztikus lehetőséget biztosítottak, melyek megbízhatóságát a patológiai szakma is elismerte. Tevékenységük – az adott időszakban – példaértékű és rendkívül hasznos volt. Ma azonban szolid daganatok citológiai diagnosztikáját csak citopatológus szakvizsgával rendelkező orvos végezheti.

A citológiai kenetek feldolgozása – a szövettani technikához viszonyítva – egyszerűbb és gyorsabb. Ezen előnyöket az on site vizsgálatoknál ki is használják (ROSE: rapid on site evaluation) (10). Az anyagvétele utáni azonnali véleményezésnek a betegek terhelésének

2. táblázat. Ajánlás a NSCLC biomarkerei meghatározásának standardizálására klinikai kísérletek esetén (8)

Anyagvételek	
Tumorheterogenitás	Legalább 3 reprezentatív minta vétele szükséges
Citológiai mintavétel	Sejtblokk technika ajánlott
Minimális minta nagysága	Direkt kenetkészítés FISH-hez és IHC-hez nem ajánlott 1–2 mm <sup>2</sup> tumorszövet
Biopsziás minta feldolgozása	FISH: > 100 tumorsejtmag IHC/mutációanalízis: ≈ 2000 tumorsejt Direkt szekvenálás: 50–70% tumortartalmú minta 10%-os pufferolt formalin fixálás, paraffinba ágyazás Blok-, és nem metszet formában kell archiválni
Molekuláris vizsgálatok	
IHC	KIT alapú ellenanyagok használata javasolt Megfelelő kontrollok alkalmazása szükséges
FISH	Egyszerű, standardizált pontrendszer alkalmazása szükséges Kétszínű FISH CEP-vel javasolt Pontrendszer alkalmazása javasolt
Mutációanalízis	Direkt szekvenálás a jelenlegi standard Makro- vagy mikrodisszekció szükséges lehet Az alkalmazott módszert validálni szükséges

IHC: immunhisztokémia, FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, CEP: centroméra-próba

csökkentése és az intervenció eredményességének fokozása a célja. A tárgyi feltételek nem túl jelentősek, a személyi feltételek megvalósítása (citológiai asszisztens, patológus szakorvos, esetleg kiképzett tüdőgyógyász (?) jelenléte) azonban több szempontból is nehezen megoldható feladatot jelent. A hörgőmosás, illetve a kefebiopsziás citológiai mintavétel találati arányát a molekuláris patológiai módszerek (pl. FISH) alkalmazásával jelentősen fokozni lehet (11, 12).

A direkt kenetkészítés technikájával és az elsődleges festés elvégzésével a további reakciók kivitelezhetősége megnehezedik. Az anyagvétele során nyert sejtek szuszpenzióba vitele, sejtblokkok készítése jelentősen megnöveli az elvégezhető reakciók számát. A paraffin blokkokba ágyazott sejtek további feldolgozása szövettani technikákkal történik, de az így készült metszetek nem azonosak a szolid szövetszövetmintákból készített preparátumokkal: izolált sejtek egymás mellettsége nem hasonlítható össze a szövetszöveti struktúrára, sejtek kapcsolatára és a hám/kötőszöveti viszonyra is utaló hisztológiai preparátumokkal.

A légutak menti nyirokcsomókból történő bronchoszkópos mintavétel (TBNA) vékony (21 gauge) tűvel történik, mely csak citológiai feldolgozást tesz lehetővé. A ritkábban alkalmazott vastag tű (19 gauge) az eredményességét fokozza és szélesebb körű patológiai feldolgozást tesz lehetővé (12).

## KÖVETKEZTETÉSEK

– A tumor gyanúja esetén elvégzett bronchoszkópos vizsgálatok során előnyben kell részesíteni a szövettani feldolgozásra alkalmas anyagvételi módszereket.

- Endoszkóposan látható, illetve nem látható röntgenelváltozások esetén legalább három, szövettani feldolgozásra alkalmas anyag vétele javasolt.
- Citológiai mintavétel esetén a csaknem kizárólagos direkt kenetkészítés mellett a sejtsuszpenzió/sejtblokk technikát is javasolt bevezetni.
- A különböző anyagvételi technikák kombinálása az eredményességet jelentősen javítja.

A tüdőrák gyanúja miatt indikált, az esetek többségében tervezhető biopsziás vizsgálatok elvégzése jelentős személyi és tárgyi feltételrendszer igényel, melynek hiányában az intervenció elvégzése felelőtlen: terhet jelent a beteg számára (bizonytalanság érzete, az ismételt beavatkozás fizikai és lelki megpróbáltatása), gondot okoz az onkoteam terápiás döntéseinek meghozatalában és nem utolsósorban felesleges kapacitáslekötést (és így pazarlást) jelent.

## IRODALOM

1. Azzoli CG, Baker S, Temin S, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27:1–16, 2010
2. Bertheau P, Hatem DC, Meignin V, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol* 51:370–374, 1998
3. Bozzetti C, Tiseo M, Lagrasta C, et al. Cytology reliable for epidermal growth factor receptor gene evaluation in non-small cell lung cancer? *J Thorac Oncol* 5:551–553, 2010
4. Buccheri G, Barberis P, Delfino MS. Diagnostic, morphologic, and histopathologic correlates in bronchogenic carcinoma: A review of 1,045 bronchoscopic examinations. *Chest* 99:809–814, 1991
5. Cataluna JJ, Perpina M, Greses JV, et al. Cell type accuracy of bronchial biopsy specimens in primary lung cancer. *Chest* 109:1199–1203, 2002

6. Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S, et al. Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 5:1–5, 2010
7. Crino L, Weder W, Meerbeeck J, Felip E. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21:103–115, 2010
8. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 26:983–994, 2008
9. Edwards SL, Roberts C, McKean ME, et al. Preoperative histological classification of primary lung cancer: accuracy of diagnosis and use of non-small cell category. *J Clin Pathol* 53:537–540, 2000
10. Gasparini S. It is time for this 'ROSE' to flower. *Respiration* 72:129–131, 2005
11. Halling KC, Richkman OB, Kipp BR, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest* 130:694–701, 2010
12. Hermens FHW, Limonard GJM, Hoevenaars BM, et al. Diagnostic value of histology compared with cytology in transbronchial aspiration samples obtained by histology needle. *J Bronchol Interv Pulmonol* 17:19–21, 2010
13. Italiano A, Vandebos F, Otto J, et al. Comparison of epidermal growth factor receptor gene and protein in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites: Implications for treatment with EGFR inhibitors. *Ann Oncol* 17:981–985, 2006
14. Kawaraya M, Gemba K, Ueoka H, et al. Evaluation of various cytological examinations by bronchoscopy in the diagnosis of peripheral lung cancer. *Br J Cancer* 89:1885–1888, 2003
15. Kini SR. *Color Atlas of Pulmonary Cytopathology*. Springer Verlag, New York 2002, pp. 3–5
16. Kopper L, Tímár J. A KRAS mutációjának hazai körvizsgálata (validálási vizsgálat). *Magyar Onkológia* 53:361–366, 2008
17. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 64:8919–8923, 2004
18. Liam CK, Pang YK, Poosparajah S. Diagnostic yield of flexible bronchoscopic procedures in lung cancer patients according to tumour location. *Singapore Med J* 48:625–628, 2007
19. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, et al. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 5:442–447, 2010
20. Maldonato F, Jett JR. Advances in the diagnosis of lung cancer: contribution of molecular biology to bronchoscopic diagnosis. *Curr Opin Pulm Med* 16:1–4, 2010
21. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, et al. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6 and p63 and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* 5:436–441, 2010
22. Popovich J, Kvale PA, Eichenhorn MS, et al. Diagnostic accuracy of multiple biopsies from flexible fiberoptic bronchoscopy: a comparison of central versus peripheral carcinoma. *Am Rev Respir Dis* 125:521–523, 1982
23. Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, et al. Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol* 16:569–579, 1985
24. Shure D, Astarita RW. Bronchogenic carcinoma presenting as endobronchial mass: optimal number of biopsy specimens for diagnosis. *Chest* 86:865–867, 1983
25. Strausz J. Transthoracic needle biopsy. In: *Interventional Pulmonology*. Eds: Strausz J, Bolliger CT. European Respiratory Society Monograph 48:109–118, 2010
26. Ta, IY, Chung LP, Suen WS, et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation pattern in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 12:1647–1653, 2006
27. Thomas JS, Lamb D, Ashcroft T, et al. How reliable is the diagnosis of lung cancer using small biopsy specimens? Report of UKCCCR Lung Cancer Working Party. *Thorax* 48:1135–1139, 1993
28. Tímár J, Fillinger J. Pathology of lung cancer: histology, cytology, immunohistochemistry and molecular pathology. In: *Interventional Pulmonology*. Eds: Strausz J, Bolliger CT. European Respiratory Society Monograph 48: 272–296, 2010
29. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ, et al. Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology. A paradigm shift. *J Thorac Oncol* 5:411–414, 2010
30. Varela-Garcia M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: The EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol* 1:19, 2006
31. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Cancer mortality in Europe, 2000–2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 21:1323–1360, 2010