

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



**XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ GEN KRAS
QUYẾT ĐỊNH TÍNH ĐÁP ỨNG THUỐC
TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ PHỔI
KHÔNG TẾ BÀO NHỎ**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2014

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

**XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ GEN KRAS
QUYẾT ĐỊNH TÍNH ĐÁP ỨNG THUỐC
TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ PHỔI
KHÔNG TẾ BÀO NHỎ**

Chuyên ngành : HÓA SINH Y HỌC

Mã số : 62720112

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

TB.BS. Trần Văn Khánh

GS.Đỗ Đình Hồ

HÀ NỘI - 2014

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng tri ơn sâu sắc tới GS.Đỗ Đình Hồ và TS.BS.Trần Văn Khánh, là những người thầy, người hướng dẫn khoa học, đã tận tình giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu, góp ý và sửa chữa luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS.Tạ Thành Văn, Phó Hiệu trưởng Trường Đại học Y Hà Nội là người đã tận tình truyền đạt kiến thức và những kinh nghiệm quý báu đồng thời tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến những thầy cô, đồng nghiệp, những người đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án:

- Ban Giám Hiệu và Phòng Đào tạo Sau Đại Học của Trường Đại học Y Hà Nội.

- PGS.TS. Phạm Thiện Ngọc, Trưởng Bộ môn Hóa Sinh cùng các thầy cô trong Bộ môn Hóa Sinh Trường Đại học Y Hà Nội.

- TS.BS. Phạm Tuyết Mai, Trưởng Khoa Nội 1 Bệnh Viện K Trung Ương, cùng toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng của Khoa.

- PGS.TS.Mai Trọng Khoa và PGS.TS.Phạm Đình Hà, là Giám Đốc và Phó Giám Đốc Trung Tâm Y học hạt nhân và Ung Bướu Bệnh Viện Bạch Mai cùng toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng của Trung Tâm.

- Toàn thể các đồng nghiệp, các nghiên cứu viên của Trung Tâm nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Xin được gửi lời cảm ơn đến các bệnh nhân cùng gia đình của họ đã giúp tôi có được các số liệu trong luận án này.

Xin cảm ơn các bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin ghi nhớ công ơn sinh thành, nuôi dưỡng và tình yêu thương của bố mẹ tôi, bố mẹ chồng tôi cùng sự ủng hộ, động viên của chồng, hai con và các em trong gia đình, những người đã luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hà Nội, tháng 12 năm 2014

Nguyễn Minh Hà

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Minh Hà, nghiên cứu sinh khóa 30 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hóa Sinh Y Học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Cô Trần Vân Khánh và Thầy Đỗ Đình Hồ
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 20 tháng 12 năm 2014

Người viết cam đoan

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ALK	: Anaplastic lymphoma kinase
AKT	: Gen thuộc họ v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ASCO	: Hiệp hội ung thư học lâm sàng Hoa Kỳ (American Society of Clinical Oncology)
ATP	: Adenosine triphosphate
BRAF	: Gen thuộc họ v-Raf murine sarcoma viral oncogen, mã hóa cho protein serine/threonine-protein kinase B-raf.
COSMIC	: Danh mục các đột biến sinh dưỡng trong bệnh ung thư (Catalogue of Somatic Mutations In Cancer)
CT	: Chụp cắt lớp vi tính hóa (computerised tomography)
Ct	: Chu kỳ ngưỡng (Cycle of threshold)
CTCAE	: Tiêu chuẩn <i>Đánh giá độc tính và tác dụng phụ của hóa chất</i> của Viện Ung thư quốc gia Mỹ (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events)
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoxyribose nucleoside triphosphate
EGFR	: Thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (Epidermal Growth Factor Receptor)
FDA	: Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration)
FISH	: Lai tại chỗ phát huỳnh quang (fluorescence in situ hybridization)
HGFR	: Thụ thể yếu tố phát triển tế bào gan (Hepatocyte Growth Factor Receptor)
HR	: Tỷ số nguy cơ (Hazard Ratio)
GAP	: Guanosine activated protein (protein hoạt hóa GTPase)
GDP	: Guanosine diphosphate

GEFs	: Yếu tố chuyển đổi nucleotide guanine (Guanine nucleotide Exchange Factors)
GTP	: Guanosine triphosphate
IASLC	: Hiệp hội quốc tế nghiên cứu Ung thư phổi (International Association for the Study of Lung Cancer)
kDa	: kiloDalton
KRAS	: Gen thuộc họ v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogen
LPĐTTĐ	: Liệu pháp điều trị trúng đích
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEK	: Protein thuộc nhóm serinee/threonine-selective protein kinases
MIBI	: Methoxy-Isobutyl-Isonitrite
MRI	: Chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging)
mRNA	: RNA thông tin (messenger RNA)
MSCT	: Chụp cắt lớp điện toán đa lát cắt (Multi-slides Computed Tomography)
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
OD	: Mật độ quang (Optical Density)
OS	: Thời gian sống thêm toàn thể (Overall Survival)
ORR	: Tỷ lệ đáp ứng (overall response rate)
PCR	: Phản ứng khuếch đại chuỗi (polymerase chain reaction)
PI3K	: Phosphatidyl inositol 3-kinase
RFLP	: Sự đa hình về chiều dài các phân đoạn cắt hạn chế (Restriction Fragment Length Polymorphism)
PET-CT	: Chụp cắt lớp phát xạ positron (Positron Emission Tomography)
PFS	: Thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (Progression-Free Survival)
Scorpion ARMS	: Scorpion Amplification Refractory Mutation System
SMAP	: Smart Amplification Process

SNP	: Biến đổi đa hình thái đơn nucleotid (Single Nucleotide Polymorphism)
SPECT	: Chụp cắt lớp điện toán bức xạ đơn photon (Single-photon Emission Computed Tomography)
TKI	: Chất ức chế hoạt tính tyrosine kinase (tyrosine kinase inhibitor)
UTP	: Ung thư phổi
UTPKTBN	: Ung thư phổi không tế bào nhỏ
VEGF	:Yếu tố phát triển nội mô mạch máu (Vascular Endothelial Growth Factor)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ	4
1.1.1. Cơ chế phân tử bệnh	4
1.1.2. Lâm sàng	6
1.1.3. Các giai đoạn của ung thư phổi.....	6
1.1.4. Cận lâm sàng	8
1.1.5. Điều trị.....	13
1.1.6. Tiên lượng	14
1.2. VAI TRÒ CỦA CON ĐƯỜNG TÍN HIỆU EGFR TRONG CƠ CHẾ BỆNH VÀ ĐIỀU TRỊ UTPKTBN	15
1.2.1. Thụ thể yếu tố phát triển biểu mô	15
1.2.2. Đột biến gen EGFR	17
1.2.3. Các biến đổi ở cấp độ phân tử của con đường tín hiệu EGFR.....	19
1.2.4. Hiệu quả điều trị của các chất ức chế tyrosine kinase của EGFR..	23
1.2.5. Tình hình nghiên cứu đột biến gen EGFR, gen KRAS và hiệu quả của EGFR TKIs trong điều trị UTPKTBN tại Việt Nam	29
1.3. PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ KRAS .	31
1.3.1. Kỹ thuật PCR-RFLP.....	31
1.3.2. Kỹ thuật giải trình tự gen	33
1.3.3. Kỹ thuật Scorpion ARMS	34
1.3.4. Kỹ thuật Smart Amplification Process.....	36
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	38
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	38
2.1.1. Xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS	38
2.1.2. Đánh giá hiệu quả điều trị	39
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	40
2.2.2. Phương pháp tiến hành nghiên cứu.....	40

2.3. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ THỐNG KÊ	47
2.4. DỤNG CỤ, TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU ...	48
2.4.1. Dụng cụ	48
2.4.2. Hóa chất.....	48
2.5. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU	50
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	51
3.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ GEN KRAS.....	51
3.1.1. Kết quả tách chiết DNA từ mẫu mô ung thư	51
3.1.2. Kết quả khuếch đại exon 18-21 gen EGFR và exon 2 gen KRAS	54
3.1.3. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen.....	55
3.1.4. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật Scorpion ARMS.....	66
3.1.5. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen.....	74
3.2. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ	82
3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân.....	82
3.2.2. Hiệu quả điều trị.....	83
3.2.3. Tác dụng phụ của erlotinib.....	87
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	88
4.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ GEN KRAS.....	88
4.1.1. Kỹ thuật xác định đột biến gen EGFR và KRAS.....	88
4.1.2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR	100
4.1.3. Tỷ lệ đột biến gen KRAS	109
4.2. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ ĐÍCH BƯỚC 1 BẰNG ERLOTINIB TRÊN BỆNH NHÂN UTPKTBN CÓ ĐỘT BIẾN GEN EGFR.....	111
4.2.1. Đáp ứng điều trị.....	112
4.2.2. Thời gian sống thêm.....	120
4.2.3. Tác dụng phụ của erlotinib.....	122
KẾT LUẬN	125
KIẾN NGHỊ	126
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các nghiên cứu lâm sàng so sánh phác đồ gefitinib bước 1 và hóa trị có platinum	26
Bảng 2.1.	Các dạng đột biến exon 18-21 gen EGFR được phát hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	43
Bảng 2.2.	Các dạng đột biến exon 2 gen KRAS được phát hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	44
Bảng 2.3.	Đánh giá toàn trạng theo chỉ số Karnofsky.....	46
Bảng 2.4.	Đánh giá đáp ứng thực thể theo tiêu chuẩn RECIST v1.1 đối với các tổn thương đo lường	46
Bảng 2.5.	Đánh giá đáp ứng thực thể theo tiêu chuẩn RECIST v1.1 đối với các tổn thương không đo lường được	47
Bảng 3.1.	Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA	51
Bảng 3.2.	Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR.....	75
Bảng 3.3.	Tỷ lệ phân bố đột biến theo exon trên gen EGFR	76
Bảng 3.4.	Tỷ lệ bệnh nhân theo số lượng đột biến/bệnh nhân.....	77
Bảng 3.5.	Tỷ lệ đột biến theo tính đáp ứng thuốc EGFR TKIs.....	77
Bảng 3.6.	Tỷ lệ các loại đột biến gen KRAS	78
Bảng 3.7.	Tỷ lệ phân bố đột biến gen KRAS theo codon tại exon 2	79
Bảng 3.8.	Phân bố tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS.....	80
Bảng 3.9.	Tình trạng đột biến gen của các bệnh nhân mang đột biến cả 2 gen	81
Bảng 3.10.	Đặc điểm của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib.....	82
Bảng 3.11.	Kết quả xác định đột biến gen EGFR trong nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib.....	83
Bảng 3.12.	Đáp ứng thực thể của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib	83
Bảng 3.13.	Đáp ứng toàn trạng của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib.....	84

Bảng 3.14.	Thời gian sống thêm của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib	84
Bảng 3.15.	Tương quan giữa đặc điểm bệnh nhân và thời gian sống thêm	85
Bảng 3.16.	Các tác dụng phụ của erlotinib trong nghiên cứu	87
Bảng 4.1.	So sánh kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS.....	99
Bảng 4.2.	Tỷ lệ đột biến gen EGFR trong bệnh UTPKTBN ở một số nghiên cứu trên thế giới	102
Bảng 4.3.	Phân bố đột biến gen EGFR trên exon 18-21 theo một số nghiên cứu.....	106
Bảng 4.4.	Tỷ lệ đột biến gen KRAS trong bệnh UTPKTBN.....	110
Bảng 4.5.	So sánh ORR ở bệnh nhân có đột biến gen EGFR với các nghiên cứu trên thế giới	113
Bảng 4.6.	So sánh thời gian sống thêm ở bệnh nhân có đột biến gen EGFR với các nghiên cứu trên thế giới	121

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR trong nghiên cứu	76
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ các loại đột biến gen KRAS trong nghiên cứu	79
Biểu đồ 3.3. Phân bố tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS.....	80
Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS trong nghiên cứu.....	81
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ Kaplan-Meier thể hiện thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS) và thời gian sống thêm tổng cộng (OS) của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib	86

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu xác định đột biến gen và theo dõi điều trị ...	42
--	----

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	(a) Cấu trúc thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR); (b) Sự hoạt hóa của EGFR	15
Hình 1.2.	Các con đường truyền tín hiệu nội bào khởi nguồn từ EGFR	16
Hình 1.3.	Các dạng đột biến gen EGFR quyết định tính đáp ứng với EGFR TKIs	18
Hình 1.4.	Vai trò của đột biến KRAS trong việc phát sinh ung thư	21
Hình 1.5.	Cấu trúc của gefitinib và erlotinib	24
Hình 1.6.	Đáp ứng điều trị với gefitinib.....	27
Hình 1.7.	Phát hiện đột biến exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật RFLP.....	32
Hình 1.8.	Phát hiện đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen..	34
Hình 1.9.	Nguyên lý của kỹ thuật ARMS.....	35
Hình 1.10.	Nguyên tắc của kỹ thuật Scorpion ARMS.....	36
Hình 3.1.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng môi GAPDH.....	54
Hình 3.2.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các exon 18, 19, 20 và 21 gen EGFR (A) và exon 2 gen KRAS (B) trên gel agarose ..	54
Hình 3.3.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L858R trên exon 21 của gen EGFR	55
Hình 3.4.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L861Q trên exon 21 của gen EGFR	56
Hình 3.5.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 của gen EGFR.....	57
Hình 3.6.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G719S trên exon 18 của gen EGFR	58
Hình 3.7.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến T790M trên exon 20 và đột biến L858R trên exon 21 gen EGFR của cùng một bệnh nhân.....	58
Hình 3.8.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến S768I và V769L trên exon 20 gen EGFR của cùng một bệnh nhân	59

Hình 3.9.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến xóa 1 nucleotid A tại vị trí 2137 (c.2137delA) trên exon 18 của gen EGFR.....	60
Hình 3.10.	Kết quả xác định đột biến xóa 2 nucleotid c.2373_2374delAA exon 20 gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen	60
Hình 3.11.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện biến xóa đoạn c.2499_2521del23 trên exon 21 của gen EGFR	61
Hình 3.12.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến thêm 3 nucleotid ACA tại vị trí 2554-2555 (c.2554/2555insACA) trên exon 21 của gen EGFR.....	61
Hình 3.13.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12C trên exon 2 của gen KRAS.....	62
Hình 3.14.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12V trên exon 2 của gen KRAS.....	63
Hình 3.15.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12A trên exon 2 của gen KRAS.....	63
Hình 3.16.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12D trên exon 2 của gen KRAS.....	64
Hình 3.17.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12S trên exon 2 của gen KRAS.....	64
Hình 3.18.	Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G13D trên exon 2 của gen KRAS.....	65
Hình 3.19.	Hình ảnh phát hiện đột biến L858R (exon 21) + T790M (exon 20) gen EGFR của cùng một bệnh nhân (mã số mẫu 48) bằng kỹ thuật Scorpion ARMS.....	66
Hình 3.20.	Hình ảnh kết quả đột biến L858R exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	67
Hình 3.21.	Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến L861Q trên exon 21 của gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	68
Hình 3.22.	Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến LREA trên exon 19 của gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS.....	69

Hình 3.23.	Hình ảnh xác định đột biến S768I và V769L exon 20 trên cùng bệnh nhân bằng kỹ thuật giải trình tự gen (trên) và Scorpion ARMS (dưới).....	70
Hình 3.24.	Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến G12D (codon 12) của gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	71
Hình 3.25.	Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến G12V (codon 12) gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	72
Hình 3.26.	Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến G13D (codon 13) của gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS	73
Hình 4.1.	Hình ảnh vùng tập trung tế bào UT (vùng khoanh tròn) trên kính hiển vi (x100).....	89
Hình 4.2.	Hình ảnh CT ngực (bên trái) và MRI sọ não (bên phải) ở thời điểm trước điều trị erlotinib của bệnh nhân VTTT.....	114
Hình 4.3.	Hình ảnh CT ngực (bên trái) và MRI sọ não (bên phải) ở thời điểm tháng thứ 9 sau điều trị erlotinib của bệnh nhân VTTT	115
Hình 4.4.	Hình ảnh MSCT ngực của bệnh nhân NTH trước và sau 1 tháng điều trị erlotinib.....	116
Hình 4.5.	Hình ảnh MSCT ngực của bệnh nhân NTH sau 1 tháng và sau 5 tháng điều trị erlotinib.....	117
Hình 4.6.	Hình ảnh xạ hình xương của bệnh nhân NTH trước và sau 5 tháng điều trị erlotinib.....	117

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, trên toàn thế giới, bệnh ung thư đã vượt qua bệnh tim mạch để trở thành căn nguyên gây tử vong hàng đầu với tỷ lệ mắc bệnh cao và độ tuổi mắc bệnh ngày càng giảm [1]. Với tốc độ phát triển dân số và sự gia tăng tuổi thọ như hiện nay thì ước tính đến năm 2050, thế giới sẽ có thêm khoảng 27 triệu trường hợp ung thư mới mắc và khoảng 17,5 triệu bệnh nhân tử vong mỗi năm [1]; trong đó phải kể đến ung thư phổi (UTP), căn nguyên gây tỷ lệ mắc và tử vong hàng đầu với thể ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) chiếm đến 85% các trường hợp.

Những nghiên cứu thực hiện ở các nước có nền y học tiên tiến cho thấy việc áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán và điều trị đã mang lại những lợi ích nổi bật cho bệnh nhân ung thư. Các nhà khoa học có thể đánh giá một cách tổng quát sự tương tác gen, các con đường dẫn truyền tín hiệu nội bào và ảnh hưởng của các dòng thác tín hiệu trong tế bào đến quá trình tái bản, sao chép và phiên mã, từ đó tác động lên quá trình sinh trưởng, biệt hóa, di chuyển và chết theo chương trình của tế bào. Như vậy, với mỗi một biến đổi gen xảy ra đều có thể làm thay đổi sự cân bằng các hoạt động sống tế bào, biến một tế bào lành trở thành tế bào ác tính hoặc gây chết tế bào. Mặt khác, có những biến đổi gen lại khiến các tế bào trở nên nhạy cảm hoặc đề kháng hơn với những tác nhân ngoại bào như tác nhân lý, hóa. Trong đó, sự thay đổi tính đáp ứng của tế bào với các thuốc điều trị ung thư là một ví dụ điển hình. Đây là cơ sở khoa học để các nhà khoa học nghiên cứu và ứng dụng các loại thuốc mới tác động trực tiếp lên các thụ thể tế bào nhằm ức chế sự phát triển của tế bào ung thư gọi là liệu pháp điều trị ung thư trúng đích (targeted cancer therapy). Ưu điểm của phương pháp này là liệu điều trị

thấp, đặc hiệu, ít độc hại và đặc biệt là hiệu quả được nâng cao một cách rõ rệt, thể trạng người bệnh được tăng cường và kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân.

Việc phân tích tình trạng các gen đóng vai trò chủ chốt trong quá trình phát sinh khối u thư giúp các bác sĩ lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp nhất để nâng cao hiệu quả điều trị đích cho người bệnh. Qua nhiều công trình nghiên cứu cũng như sự kiểm duyệt khắt khe của các Tổ chức quản lý y dược uy tín trên thế giới (FDA-Hoa Kỳ, EMEA-Liên Minh Châu Âu), liệu pháp điều trị trúng đích (LPĐTTĐ) đã chứng tỏ hiệu quả rất tốt trong việc điều trị cho các bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối: kích thước các khối u giảm đáng kể, thời gian sống kéo dài hơn, chất lượng cuộc sống được cải thiện, ... Tuy nhiên, mức độ đáp ứng với thuốc điều trị đích ở mỗi bệnh nhân UTPKTBN phụ thuộc phần lớn vào tình trạng một số gen, mà quan trọng nhất là gen EGFR và gen KRAS. Việc xác định đột biến gen hay sự tương tác protein bị đột biến có ý nghĩa rất lớn giúp bác sĩ lựa chọn được phác đồ điều trị thích hợp để nâng cao hiệu quả điều trị đích cho bệnh nhân. Tháng 6/2009, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chính thức đưa ra khuyến cáo: bệnh nhân trước khi được chỉ định dùng thuốc ức chế EGFR cần phải được làm xét nghiệm tình trạng gen.

Tại Việt Nam, số lượng bệnh nhân bệnh ung thư ngày càng nhiều, nhu cầu sử dụng LPĐTTĐ ngày càng tăng, trên thị trường đã có một số dược phẩm điều trị đích đang được lưu hành; tuy nhiên chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu mối liên hệ giữa đột biến các gen chủ chốt và khả năng đáp ứng thuốc ở bệnh nhân ung thư nói chung hay UTPKTBN nói riêng và việc xét nghiệm cũng như theo dõi hiệu quả điều trị đích cho từng bệnh nhân chưa được tiến hành một cách đồng bộ và khoa học. Xuất phát từ thực tiễn đó, đề tài nghiên cứu **“Xác định đột biến gen EGFR quyết định tính đáp ứng**

thuốc trong điều trị bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ” được thực hiện với các mục tiêu sau :

1. *Xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS quyết định tính đáp ứng thuốc điều trị đích trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn.*
2. *Bước đầu đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1 bằng erlotinib trên các bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn có đột biến gen EGFR.*

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ

Hiện tại, UTP là một trong những bệnh ung thư đứng đầu trên thế giới và tại Việt Nam, cả về số ca bệnh mới mắc và số trường hợp tử vong [1]. Khoảng 90% trường hợp UTP đã được chứng minh là có liên quan đến thói quen hút thuốc lá. Nhiều yếu tố nguy cơ khác, độc lập hoặc kết hợp với khói thuốc lá, đóng vai trò là tác nhân sinh UTP. Các yếu tố này bao gồm: sự nhạy cảm di truyền của người bệnh, ô nhiễm không khí, nhiễm đồng vị phóng xạ, viêm phổi mô kẽ mạn tính và các tác nhân sinh khối u từ môi trường như nhiễm a-mi-ăng, nhiễm arsen, niken, chrom, halogen ether...[2], [3].

1.1.1. Cơ chế phân tử bệnh

Sự phát sinh, phát triển UTP diễn ra qua nhiều giai đoạn dưới tác động của các yếu tố nguy cơ, sự đáp ứng của gen và quá trình tích lũy đột biến xảy ra trên các gen gây ung thư và gen áp chế ung thư, hậu quả là làm mất cân bằng của hai hệ thống gen này [2].

1.1.1.1. Tiếp xúc với các tác nhân sinh khối u

Việc tiếp xúc với các yếu tố sinh khối u (trong môi trường và do nghề nghiệp) cùng với tính nhạy cảm về di truyền với các yếu tố này của người bệnh đều làm tăng nguy cơ phát sinh UTP của người đó. Theo một số thống kê ở Hoa Kỳ, 90% các trường hợp UTP là do người bệnh có hút thuốc lá, còn lại 9-15% là tiếp xúc với các tác nhân sinh khối u khác trong môi trường làm việc. Khói thuốc lá chứa hơn 300 hợp chất có hại cho sức khỏe, trong đó có hơn 40 chất là các tác nhân sinh khối u đã được chứng minh. Các

hydrocacbon đa vòng nhân thơm và nitrosamines gây tổn thương DNA ở mô hình thí nghiệm trên động vật; *benzo-A-pyrene* kích hoạt một số con đường dẫn truyền tín hiệu nội bào như AKT cũng như làm tăng tần suất đột biến ở gen p53 và các gen ức chế khối u khác [3].

Yếu tố nguy cơ do nghề nghiệp phổ biến nhất của UTP là phơi nhiễm a-mi-ăng. Bên cạnh đó, nhiễm phóng xạ radon có liên quan đến 10% các trường hợp UTP, trong khi ô nhiễm không khí đóng vai trò chính trong khoảng 1-2% trường hợp [4]. Ngoài ra, việc người bệnh đã có tiền căn bệnh phổi trước đó như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, xơ phổi nguyên phát hoặc lao phổi cũng làm tăng tỷ lệ phát sinh UTP. Nguyên nhân có thể do những tổn thương gây độc tế bào tái diễn trong thời gian dài sẽ phá vỡ sự cân bằng di truyền trong tế bào.

1.1.1.2. Tính nhạy cảm di truyền

Trong những năm gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã giúp khám phá ra tình trạng khuếch đại các gen sinh khối u và bất hoạt của các gen kiềm hãm khối u trong bệnh sinh UTPKTBN.

Phát hiện được xem là quan trọng nhất là những đột biến liên quan đến họ gen sinh khối u RAS. Các gen này mã hóa cho một loại protein nằm ở mặt trong của màng tế bào, có hoạt tính GTPase tham gia con đường dẫn truyền tín hiệu nội bào. Những nghiên cứu trên chuột cho thấy có mối liên quan giữa đột biến gen RAS và cơ chế phân tử bệnh UTPKTBN. Những nghiên cứu trên người cho thấy sự kích hoạt gen RAS sẽ thúc đẩy tiến triển của khối u phổi, đặc biệt ở phân nhóm ung thư biểu mô tuyến trên bệnh nhân hút thuốc lá [5].

Sau đột biến gen RAS, biến đổi di truyền quan trọng khác trong bệnh UTP là đột biến gen EGFR, gây rối loạn trong con đường dẫn truyền tín hiệu thông qua thụ thể yếu tố phát triển biểu bì EGFR. Trong các tế bào ung thư, hoạt tính tyrosine kinase của EGFR bị rối loạn bởi đột biến gen EGFR, tăng số lượng bản sao gen EGFR hoặc biểu hiện quá mức protein EGFR [6].

Biến đổi di truyền tiếp theo là rối loạn hoạt hóa BRAF. Protein BRAF với hoạt tính serine/threonine kinase tiếp nối con đường tín hiệu của KRAS trong tế bào. Sự phosphoryl hóa BRAF hoạt hóa các gen MEK1 và MEK2 thúc đẩy phân bào và làm tăng khả năng sống sót của tế bào UT [7].

Ngoài đột biến gen EGFR, KRAS và BRAF, các bất thường về di truyền khác có thể làm thay đổi liệu trình điều trị bệnh UTPKTBN còn có phức hợp chuyển vị liên quan đến hoạt tính tyrosine kinase của thụ thể ALK (vốn nhạy cảm với các tác nhân ức chế ALK), phức hợp chuyển vị ROS1, phức hợp chuyển vị RET, đột biến MEK và sự khuếch đại gen MET (mã hóa cho thụ thể yếu tố phát triển tế bào gan)....

1.1.2. Lâm sàng

Khoảng 25% bệnh nhân UTP không có triệu chứng lâm sàng cụ thể và chỉ có thể được phát hiện tình cờ qua khám sức khỏe định kỳ khi chụp X-quang lồng ngực hoặc chụp cắt lớp điện toán (CT). Trong giai đoạn ung thư tiến triển, bệnh nhân có thể có các triệu chứng lâm sàng như: ho, khó thở, đau ngực và đặc biệt là ho ra máu; ngoài ra bệnh nhân có thể có các triệu chứng tại những cơ quan khác khi khối u di căn như đau xương, giảm sức nhìn, đau đầu, đột quỵ và các triệu chứng không điển hình khác như suy nhược, giảm cân... Tuy nhiên, các triệu chứng lâm sàng của UTPKTBN thường không đặc hiệu nên chỉ có ý nghĩa gợi ý cho chẩn đoán [8], [9], [10], [11].

1.1.3. Các giai đoạn của ung thư phổi

Bệnh UTPKTBN được phân độ theo hệ thống TNM của AJCC 2010 [121].

T (Tumor): U nguyên phát

T0: không xác định được u nguyên phát, chỉ có tế bào học dương tính

Tx: có tế bào ác tính trong chất tiết phế quản nhưng không thấy u trên phương tiện chẩn đoán hình ảnh.

Tis: UT biểu mô tại chỗ

T1: đường kính lớn nhất của khối u nhỏ hơn hoặc bằng 3 cm, xung quanh là tổ chức lành. Soi phế quản chưa phát hiện dấu hiệu xâm lấn phế quản phân thùy.

T1a: đường kính lớn nhất của khối u nhỏ hơn hoặc bằng 2 cm

T1b: đường kính lớn nhất của khối u lớn hơn 2 cm nhưng nhỏ hơn hoặc bằng 3 cm

T2: đường kính lớn nhất của khối u lớn hơn 3cm nhưng nhỏ hơn hoặc bằng 7 cm, gây tổn thương lá tạng màng phổi, xẹp phổi hoặc viêm phổi do bít tắc phế quản vùng rốn phổi. Soi phế quản thấy tổn thương phế quản thùy hoặc phế quản gốc, cách carina lớn hơn 2cm.

T2a: đường kính lớn nhất của khối u lớn hơn 3cm nhưng nhỏ hơn hoặc bằng 5 cm

T2b: đường kính lớn nhất của khối u lớn hơn 5cm nhưng nhỏ hơn hoặc bằng 7 cm

T3: kích thước u lớn hơn 7 cm hoặc có bất kỳ dấu hiệu xâm lấn (lá tạng màng phổi, thành ngực, cơ hoành, thần kinh hoành, màng phổi trung thất, màng tim); hoặc u ở phế quản chính; hoặc có dấu hiệu xẹp phổi hoặc viêm phổi tắc nghẽn phổi cùng bên có u; hoặc có nốt u khác ở cùng thùy phổi có u. Soi phế quản thấy tổn thương phế quản gốc cách carina lớn hơn 2cm nhưng chưa xâm lấn carina.

T4: khối u không kể kích thước và có bất kỳ dấu hiệu xâm lấn sau: trung thất, tim, khí quản, thần kinh quặt ngược thanh quản, đốt sống, hoặc một khối u khác ở một thùy phổi khác cùng bên, tràn dịch màng phổi ác tính.

N (lymph node): hạch lympho tại chỗ

N0: không có dấu hiệu di căn hạch vùng.

Nx: không đánh giá được hạch vùng.

N1: có dấu hiệu di căn hạch quanh phế quản và rốn phổi cùng bên

N2: có dấu hiệu di căn hạch trung thất và/hoặc hạch dưới carina cùng bên

N3: có dấu hiệu di căn hạch trung thất, hạch rốn phổi đối bên; hạch dọc cơ thang, hạch thượng đòn cùng hoặc đối bên.

M (metastatic): di căn xa, không kể hạch

M0: không có dấu hiệu di căn

M1: có dấu hiệu di căn xa

M1a: di căn phổi đối bên

M1b: di căn xa các cơ quan khác (xương, tuyến thượng thận, não...)

Dựa theo phân độ TNM như trên, UTPKTBN được chia làm 4 giai đoạn:

Giai đoạn 0 : TisN0M0

Giai đoạn 1A : T1aN0M0; T1bN0M0

Giai đoạn 1B : T2aN0M0

Giai đoạn IIA : T2bN0M0; T1aN1M0; T1bN1M0; T1bN1M0; T2aN1M0

Giai đoạn IIB : T2bN1M0; T3N1M0

Giai đoạn IIIA : T1aN2M0; T1bN2M0; T2aN2M0; T3N1M0; T3N2M0; T4N1M0

Giai đoạn IIIB: (bất kể T, N3M0); (T4, bất kể N, M0)

Giai đoạn IV : bất kể T, bất kể N, M1a hoặc M1b

1.1.4. Cận lâm sàng

1.1.4.1. Các xét nghiệm máu

- Các xét nghiệm điện giải (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^- và Mg^{++}) và một số hormon được chỉ định khi các bệnh nhân UTP có các triệu chứng cận ung thư:

- Hạ Na^+ máu kết hợp với giảm áp lực thẩm thấu máu là dấu hiệu của hội chứng tăng tiết ADH, vốn gặp ở nhiều loại u ác tính khác nhau, trong đó có UTP.

- Hạ K^+ máu nặng kết hợp với tăng nồng độ ACTH huyết thanh gặp trong hội chứng tăng tiết ACTH lạc chỗ, thường gặp trong UTP thể tế bào nhỏ.

- Hội chứng tăng Canxi máu ác tính gặp nhiều nhất trong UTPKTBN thể biểu mô vảy.

- Ngoài ra trong UTP, đặc biệt là UTPTBN, có thể gặp tình trạng tăng nồng độ một số hormon khác trong máu như hormon tăng trưởng GH (trong hội chứng Pierre-Marie), calcitonin, prolactin insulin...

- Các dấu ấn ung thư: dấu ấn ung thư là các chất được tổng hợp từ các tế bào ung thư hoặc từ các tế bào tham gia vào quá trình đáp ứng của cơ thể với khối u. Mặc dù không có dấu ấn ung thư nào trong UTP có đủ độ nhạy để sử dụng như một xét nghiệm sàng lọc ở những bệnh nhân không có triệu chứng, nhưng một số dấu ấn ung thư có giá trị như một công cụ bổ sung vào việc chẩn đoán UTP khi mà các phương pháp lâm sàng bị hạn chế. Một số dấu ấn ung thư đã được nghiên cứu là có giá trị trong việc tiên lượng và theo dõi điều trị bệnh UTPKTBN nói riêng, gồm có CYFRA21-1 (protein cytokeratin 19) [12], [13], CEA (Carcino Embryonic Antigen) [14], [15], [16], TPS (Tissue Ploypeptide Specific Antigen) [17], [18] và SCCA (Squamous Cell Carcinoma Antigen) [19], [20].

1.1.4.2. Các xét nghiệm tế bào học

- Xét nghiệm tế bào học từ đờm (hoặc dịch chải rửa phế quản): hàng ngày, các tế bào bề mặt của các khối u sẽ bong tróc ra dịch tiết phế quản (đờm), do đó, hầu hết các trường hợp dương tính là ung thư biểu mô tế bào vảy. Mẫu đờm sẽ được soi dưới kính hiển vi để xác định sự có mặt của tế bào ung thư. Tỷ lệ

ương tính giả của xét nghiệm này là 1% nhưng tỷ lệ âm tính giả có thể lên đến 40% do trong mẫu đờm lấy ngẫu nhiên có thể không chứa tế bào ác tính. Do đó, nên làm 3 mẫu liên tiếp để tăng độ nhạy của xét nghiệm. Độ chính xác của việc phát hiện tế bào ác tính là 90% nhưng xét nghiệm này lại không có giá trị cao trong việc phân định các tít mô bệnh học.

- Xét nghiệm mô bệnh học khối u (giải phẫu bệnh) : là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán xác định UTPKTBN. Mẫu bệnh phẩm có thể lấy từ mô khối u sau phẫu thuật hoặc sinh thiết bằng kim qua thành ngực dưới sự hướng dẫn của CT. Ngoài xác định phân nhóm, hình ảnh giải phẫu bệnh còn cho biết mức độ ác tính và xâm lấn của khối u, góp phần lựa chọn phác đồ điều trị và tiên lượng bệnh. ung thư biểu mô tại phổi được chia thành vào hai nhóm chính là UTPKTBN chiếm 80% và UT phổi tế bào nhỏ chiếm khoảng 20%. Theo *Phân loại mô học khối u phổi và màng phổi WHO/IASLC 1999*, UTPKTBN được chia thành 7 phân nhóm nhỏ như sau [21]:

- Ung thư biểu mô vảy (squamous cell carcinoma)
- Ung thư biểu mô tuyến (adenocarcinoma)
- Ung thư biểu mô tế bào lớn (large cell carcinoma)
- Ung thư biểu mô tuyến vảy (adenosquamous cell carcinoma)
- Ung thư biểu mô dạng sarcoma (sarcomatoid carcinoma)
- U carcinoid
- Ung thư biểu mô tít tuyến nước bọt

1.1.4.3. Chẩn đoán hình ảnh

- X-Quang ngực: là phương tiện hình ảnh học được chỉ định đầu tiên ở bệnh nhân nghi ngờ có khối u ở phổi. Nếu thấy và đo được kích thước khối u trên phim X-Quang ngực đầu tiên, bác sỹ có thể sử dụng phương tiện này để

theo dõi hiệu quả điều trị hàng tháng. Đây là phương tiện được áp dụng rộng rãi, kinh tế và liều phóng xạ bệnh nhân hấp thu thấp, nhưng hầu như chỉ phát hiện được khi bệnh đã vào giai đoạn tiến xa.

- Nội soi phế quản: là một phương tiện phổ biến, quan trọng để chẩn đoán UTP, cho phép đánh giá mức độ tắc nghẽn các đường dẫn khí, lấy mẫu mô hoặc dịch phế quản làm giải phẫu bệnh hoặc tế bào học thông qua sinh thiết trực tiếp, sinh thiết xuyên phế quản hoặc lấy dịch chải rửa phế quản, đồng thời đánh giá khả năng phẫu thuật. Tuy nhiên, nội soi phế quản ống mềm chỉ soi được đến nhánh phế thứ 6 (vùng trung tâm và vùng giữa), không thấy được tổn thương ngoại vi.

- CT ngực (và phần trên bụng, bao gồm gan và tuyến thượng thận): giúp chẩn đoán và đánh giá giai đoạn của bệnh. Ngoài hình ảnh khối u (hình cầu hoặc bầu dục, bờ phẳng hoặc không đều, nhiều cung, tạo hốc, hình ảnh đóng vôi...), phim CT còn cung cấp chính xác tình trạng xẹp phổi, tràn dịch màng phổi, hình ảnh phế quản hẹp, nham nhỏ... cũng như các dữ kiện để đánh giá khả năng phẫu thuật khối u. Gan và tuyến thượng thận là hai vị trí di căn thường gặp nhất của UTPKTBN. Do đó, chụp CT vùng ngực và phần bụng trên bao gồm gan và tuyến thượng thận là tiêu chuẩn tối thiểu phải có để đánh giá một bệnh nhân mới chẩn đoán UTPKTBN.

- PET-CT: chụp PET-CT (*Positron Emission Tomography – Computed Tomography*) là kỹ thuật chụp cắt lớp bằng bức xạ positron kết hợp với chụp cắt lớp vi tính. PET-CT cho thấy mối tương quan giữa kích thước và mức độ hoạt động với mức hấp thụ phóng xạ của khối u, với độ nhạy và độ đặc hiệu là 85-90% [22]. Chỉ định của PET-CT trong UTPKTBN là chẩn đoán, xác định giai đoạn bệnh, phát hiện di căn, chẩn đoán tái phát, theo dõi đáp ứng điều trị và lập kế hoạch xạ trị.

- SPECT: là một công cụ chẩn đoán không xâm nhập sử dụng đồng vị phát tia gamma để ứng dụng xạ hình (99m Tc MIBI), có giá trị trong chẩn đoán đánh giá di căn hạch trung thất để xác định giai đoạn trong UTP chính xác hơn CT, giúp dự báo khả năng đáp ứng cũng như theo dõi đáp ứng hóa trị.

- MRI: có ưu thế hơn CT trong việc đánh giá tình trạng xâm lấn vào màng tim, tim và các mạch máu lớn; mức độ chèn ép tủy sống của khối u và phát hiện di căn hệ thần kinh trung ương.

- Nội soi trung thất giúp đánh giá bản chất các hạch phì đại ở trung thất trước khi tiến hành phẫu thuật.

- Nội soi lồng ngực: dùng đánh giá các khối u chưa thể chẩn đoán chính xác sau khi nội soi phế quản hoặc sinh thiết xuyên thành ngực. Ngoài ra, nội soi lồng ngực còn giúp sinh thiết các nốt đơn độc ngoại vi và chẩn đoán nguyên nhân tràn dịch màng phổi.

- Xạ hình xương, CT sọ não, MSCT toàn thân, siêu âm bụng: giúp đánh giá các di căn xa.

1.1.4.4. Xét nghiệm phân tích gen

Trong một vài năm trở lại đây các thuốc ức chế hoạt tính tyrosine kinase của thụ thể EGFR (như erlotinib, gefitinib) đã được áp dụng điều trị UTPKTBN và mang lại hiệu quả khích lệ. Bệnh nhân có tiến triển tốt: kích thước các khối u giảm đáng kể, thời gian sống kéo dài hơn, ít tác dụng phụ hơn so với điều trị bằng hóa chất hoặc tia xạ. Tuy nhiên mức độ đáp ứng của cơ thể người bệnh với thuốc phụ thuộc vào tình trạng có hay không có đột biến trên gen EGFR, gen KRAS và một số biến đổi di truyền khác như phức hợp chuyển đoạn ALK...Chính vì vậy bệnh nhân phải được làm xét nghiệm xác định tình trạng các gen này trước khi áp dụng LPĐTTĐ [23], [24], [25].

Hiện tại, rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử giúp xác định đột biến gen EGFR đã được xây dựng và phát triển dựa trên cơ sở tỷ lệ tế bào ung thư trong mô phân tích, có thể kể đến một số như kỹ thuật giải trình tự gen, kỹ thuật phân tích đa hình thái chiều dài phân đoạn giới hạn (PCR-RFLP), kỹ thuật phân tích cấu trúc đa hình thái chuỗi đơn, kỹ thuật real-time PCR dựa trên công nghệ Scorpion-ARMS, kỹ thuật real-time PCR sử dụng đoạn dò TaqMan, kỹ thuật sắc ký lỏng cao áp biến tính một phần, kỹ thuật SMAP...

1.1.5. Điều trị

Chỉ định điều trị UTPKTBN phụ thuộc vào giai đoạn bệnh, chức năng hô hấp và toàn trạng của bệnh nhân. Các phương pháp điều trị chính là phẫu thuật, tia xạ và hóa trị.

- Phẫu thuật: là biện pháp điều trị tốt nhất cho ung thư giai đoạn sớm, nếu bệnh nhân có thể chịu đựng được cuộc phẫu thuật. Tuy nhiên, trên thực tế chỉ có khoảng 25% bệnh nhân đến viện ở giai đoạn còn khả năng phẫu thuật được khi khối u còn nhỏ và khu trú [9], [10], [11]. Đối với bệnh ở giai đoạn III, vai trò của phẫu thuật còn đang bàn cãi. Nếu ở giai đoạn IV, bệnh nhân không còn chỉ định phẫu thuật. Vấn đề hoá trị bổ trợ sau mổ cũng đã được ghi nhận giúp cải thiện tiên lượng sống nếu khối u ở giai đoạn IIIA và toàn trạng bệnh nhân còn tương đối tốt.

- Xạ trị: mục đích của xạ trị là làm khối ung thư ngừng phát triển tạm thời, bệnh nhân đỡ đau, đỡ khó thở; hoặc tiêu diệt những tế bào ác tính còn sót lại sau phẫu thuật hoặc hạch di căn ở trung thất. Trong giai đoạn sớm (I, II), xạ trị đơn thuần được chỉ định khi bệnh nhân không có chỉ định phẫu thuật (chức năng hô hấp kém, toàn trạng yếu, nhiều bệnh phối hợp...) [26] với tỉ lệ sống 5 năm là 13-39% [27]. Vai trò của xạ trị bổ trợ sau mổ vẫn còn

nhieuu bần cãi do làm giảm nguy cơ tái phát tại chỗ nhưng không làm cải thiện thời gian sống [28], [29].

- Hóa trị: được xem là một phần của quá trình đa trị liệu đối với các trường hợp UTPKTBN tiến triển. Các nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng và các phân tích tổng hợp cỡ mẫu lớn (large meta-analyses) đều khẳng định ưu thế của việc đa hóa trị đối với UTPKTBN tiến triển. Liệu pháp kết hợp hai thuốc cho tỷ lệ đáp ứng cao hơn (26% so với 13%) cũng như cải thiện thời gian sống 1 năm (35% so với 30%). Dùng thêm một hóa chất gây độc tế bào thứ ba sẽ gia tăng độc tính cho bệnh nhân, tỷ lệ đáp ứng của bệnh cải thiện vừa phải và không tăng thời gian sống [30]. Do đó, hóa trị hai thuốc được sử dụng phổ biến hơn. Trong một vài năm trở lại đây, các thuốc ức chế hoạt tính tyrosine kinase của thụ thể EGFR (như erlotinib, gefitinib) đã được áp dụng điều trị UTPKTBN và mang lại hiệu quả cao. Ngoài những đáp ứng tốt về lâm sàng và thời gian sống, điều đáng quan tâm là bệnh nhân không phải chịu những độc tính tính lũy và gây ức chế tùy như các phác đồ hóa trị truyền thống.

1.1.6. Tiên lượng

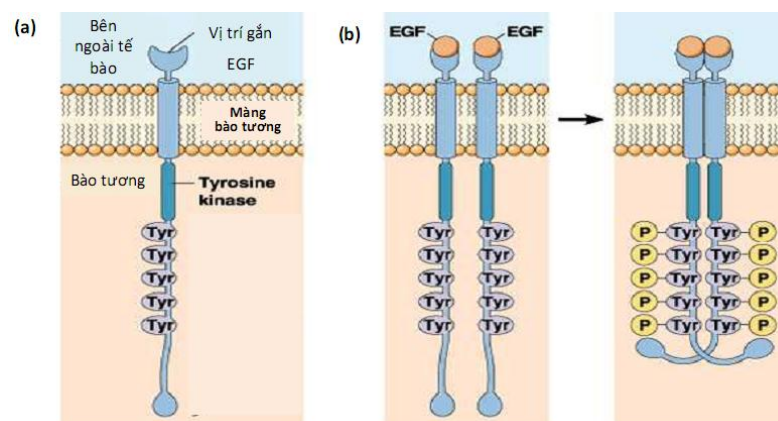
Tiên lượng UTP phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giai đoạn phát hiện, kích thước, mức độ khu trú của khối u, loại ung thư và thể trạng của bệnh nhân. UTPKTBN nhạy cảm với tia xạ và hóa trị, đây là thể ung thư tiến triển, người bệnh thường có tiên lượng không tốt, chỉ 5-10% người bệnh sống trên 5 năm kể từ khi phát hiện. UTPKTBN có tiên lượng tốt nếu được phát hiện sớm khi phẫu thuật còn được thực hiện để loại bỏ hoàn toàn khối u và kết hợp với các phương pháp trị liệu khác. Tỷ lệ bệnh nhân sống trên 5 năm có thể lên tới 50%. Đối với các trường hợp phát hiện muộn, ung thư đã tiến triển, tiên lượng thường không tốt, chỉ khoảng 3-5% bệnh nhân sống trên 5 năm kể từ khi phát hiện bệnh [31].

1.2. VAI TRÒ CỦA CON ĐƯỜNG TÍN HIỆU EGFR TRONG CƠ CHẾ BỆNH VÀ ĐIỀU TRỊ UTPKTBN

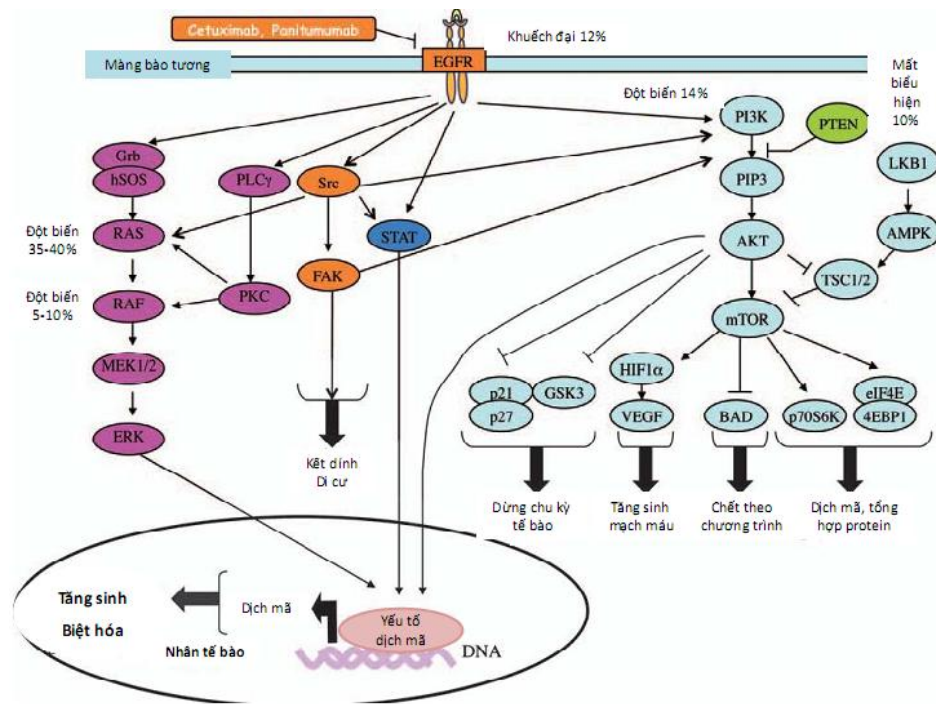
1.2.1. Thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (EGFR)

EGFR là một nhóm protein có chức năng thụ thể màng tế ở các tế bào có nguồn gốc biểu mô, trung mô và thần kinh, được phát hiện lần đầu tiên bởi Carpenter và cộng sự năm 1978 [32], bao gồm 4 thành viên: EGFR (HER1/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) và HER4 (ErbB4). Các protein này có vai trò quan trọng trong việc điều hòa các quá trình sinh trưởng, phát triển, trao đổi chất và sinh lý của tế bào [33].

Protein EGFR mang hoạt tính tyrosine kinase, là khởi nguồn của con đường tín hiệu tyrosine kinase trong tế bào. Phân tử EGFR gồm một vùng gắn kết các phối tử nằm ngoài màng tế bào, một vùng xuyên màng đặc hiệu và một vùng nội bào. Phần ngoài màng của EGFR có trọng lượng khoảng 100 kDa có hai vùng giàu cystein là nơi để gắn kết các phối tử của EGFR. Vùng xuyên màng trọng lượng nhỏ 3 kDa, tập trung tại vùng phân cực phospholipid màng. Phần trong tế bào trọng lượng khoảng 60 kDa là protein kinase với đuôi tận cùng carboxyl là nơi xảy ra phản ứng tự phosphoryl hóa của EGFR.



Hình 1.1. (a) Cấu trúc thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR); (b) Sự hoạt hóa của EGFR [34]



Hình 1.2. Các con đường truyền tín hiệu nội bào khởi nguồn từ EGFR [38]

Hoạt động của EGFR kích thích nhiều con đường tín hiệu nội bào phức tạp, vốn được điều hòa chặt chẽ bởi sự hiện diện của phối tử đặc hiệu. Hai con đường tín hiệu chính được kích hoạt bởi EGFR là RAS/RAF/MEK/ERK và PI3K/AKT (Hình 1.2), ngoài ra còn có Src tyrosine kinase, PLC γ , PKC và STAT [35], [36]. Ngay sau khi được hoạt hóa, vùng nội bào của EGFR sẽ tự phosphoryl hóa, khởi đầu một dòng thác tín hiệu lan tỏa khắp tế bào, gây kích hoạt sự tăng sinh mạch máu, di căn và ức chế quá trình chết theo chương trình, kích thích phân bào, và các con đường dẫn truyền tín hiệu phiên mã [33], [37]. Trong tế bào bình thường, sự hoạt hóa của EGFR cần thiết cho nhiều chức năng quan trọng của tế bào như quá trình tăng sinh và biệt hóa tế bào. Tuy nhiên, sự hoạt hóa EGFR quá mức không phụ thuộc vào sự hiện diện của phối tử có thể dẫn đến sự tăng sinh bất thường cũng như sự chuyển dạng ác tính của tế bào. Có nhiều cơ chế dẫn đến sự hoạt động bất thường của EGFR như sự biểu hiện quá mức của thụ thể, sự khuếch đại của gen EGFR hoặc đột biến gen

EGFR [6]. Do giữ vị trí khởi nguồn của con đường tín hiệu tyrosine kinase trong các tế bào có nguồn gốc biểu mô nên EGFR đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của một số bệnh ung thư biểu mô của người, gồm có ung thư biểu mô tế bào vảy đầu cổ, UTPKTBN, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư tụy và ung thư vú. Ngoài ra, cũng do vị trí quan trọng này nên EGFR còn trở thành đích nhắm tiềm năng cho các thế hệ thuốc mới điều trị ung thư.

1.2.2. Đột biến gen EGFR

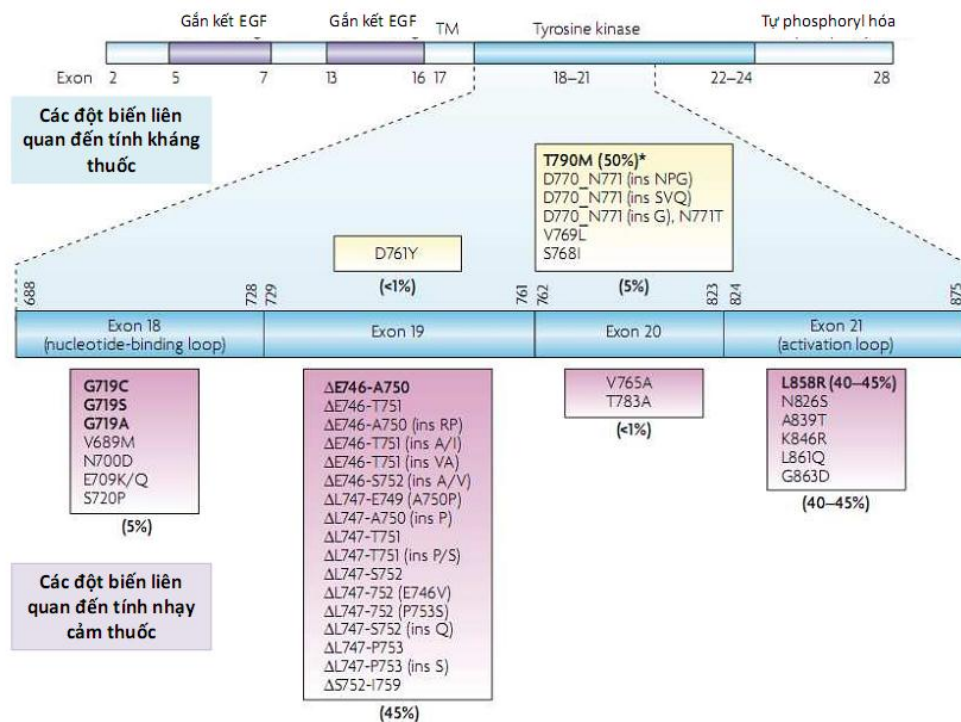
Gen EGFR, nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 7, tại locus 7p12, được xếp vào nhóm gen tiền sinh khối u (proto-oncogen), dài 110 kb và được chia thành 28 exon. Đột biến gen EGFR xảy ra ở giai đoạn rất sớm và có tỷ lệ cao trong UTPKTBN. Tất cả các đột biến gây hoạt hóa EGFR đều thuộc vùng bám adenosine triphosphate (ATP) của thụ thể tyrosine kinase, cũng đồng thời là vị trí tương tác của các loại thuốc ức chế tyrosine kinase của EGFR (EGFR TKIs) [36], [39]. Các đột biến gen EGFR (Hình 1.3), thuộc bốn exon 18-21, mã hóa vùng tyrosine kinase, khiến cho protein EGFR luôn trong trạng thái hoạt hóa không phụ thuộc vào phối tử, có tác dụng tăng sự nhạy cảm của khối u hoặc giúp kháng lại các EGFR TKIs. Những đột biến này được chia làm ba nhóm, trong đó, các đột biến làm tăng tính nhạy cảm của khối u với EGFR TKIs chủ yếu thuộc hai nhóm I và II.

- Nhóm I gồm các đột biến xóa đoạn ở exon 19, phổ biến nhất (khoảng 44%) là kiểu đột biến xóa từ vị trí acid amin vị trí 747-leucine tới acid amin vị trí 749-acid glutamic (đột biến LREA).

- Nhóm II gồm các đột biến thay thế một nucleotid làm thay đổi acid amin ở exon 18 và 21. Đột biến điểm thường gặp nhất (khoảng 41%) là đột biến ở exon 21 thay arginine bằng leucine tại codon 858 (đột biến L858R). Một số đột biến khác như đột biến thay thế glycine ở codon 719 thành serine

(G719S), thành alanine (G719A) hoặc thành cysteine (G719C) chiếm 4%; một số đột biến vô nghĩa khác chiếm 6%.

- Nhóm III (5%) gồm các đột biến lặp đoạn, thêm đoạn và đột biến điểm tại exon 20 gen EGFR. Exon 20 chứa hầu hết là các đột biến làm cho tế bào UTP kháng lại với thuốc điều trị đích như đột biến điểm T790M, V769L, S768I và các đột biến thêm đoạn. Tuy nhiên, gần đây các nhà khoa học đã phát hiện ra một ngoại lệ, một đột biến thêm 4 acid amin tại exon 20, đột biến A763_Y764insFQEA, lại làm tăng tính nhạy cảm của tế bào UTP với thuốc điều trị đích [40].



Hình 1.3. Các dạng đột biến gen EGFR quyết định tính đáp ứng với EGFR TKIs [38]

Cho đến nay, đã có nhiều bằng chứng cho thấy trạng thái cân bằng “tắt-mở” của hoạt tính tyrosine kinase-EGFR bị ảnh hưởng mạnh mẽ bởi đột biến gen. Những phân tích động học đã chứng minh đột biến thuộc hai nhóm I và

II làm tăng hệ số phân li K_m của ATP với EGFR và giảm hệ số phân li K_m của EGFR TKIs so với khi thụ thể ở trạng thái bình thường. Những đột biến này khiến EGFR giảm mạnh ái lực với ATP, giúp EGFR TKIs không phải cạnh tranh tại vị trí tương tác với thụ thể, thụ thể trở nên nhạy cảm một cách đặc biệt với các thuốc này [41], [42].

Khoảng 10 - 60% bệnh nhân UTPKTBN có đột biến ở exon 18-21 của gen EGFR. Các đột biến này tạo ra protein EGFR có ái lực mạnh với thuốc điều trị đích, do đó, bệnh nhân UTPKTBN mang đột biến gen EGFR thường đáp ứng tốt với thuốc điều trị đích [43]. Đột biến gen EGFR chiếm tỷ lệ cao ở nhóm người không hút thuốc lá, ở nhóm ung thư biểu mô tuyến so với các phân nhóm mô bệnh học khác của UTPKTBN, ở nữ giới so với nam giới và ở nhóm bệnh nhân Đông Á so với các chủng tộc khác [44], [45].

1.2.3. Các biến đổi ở cấp độ phân tử của con đường tín hiệu EGFR

1.2.3.1. Đột biến gen KRAS

Họ gen RAS (gồm HRAS, NRAS và KRAS) là những gen có tỷ lệ đột biến cao trong các bệnh ung thư ở người [46]. Trong UTPKTBN, KRAS là một trong những gen sinh ung thư (oncogenes) bị đột biến chiếm tỷ lệ cao (khoảng 15-25%) với chủ yếu là dạng đột biến thay thế một nucleotid tại codon 12 và 13 [5].

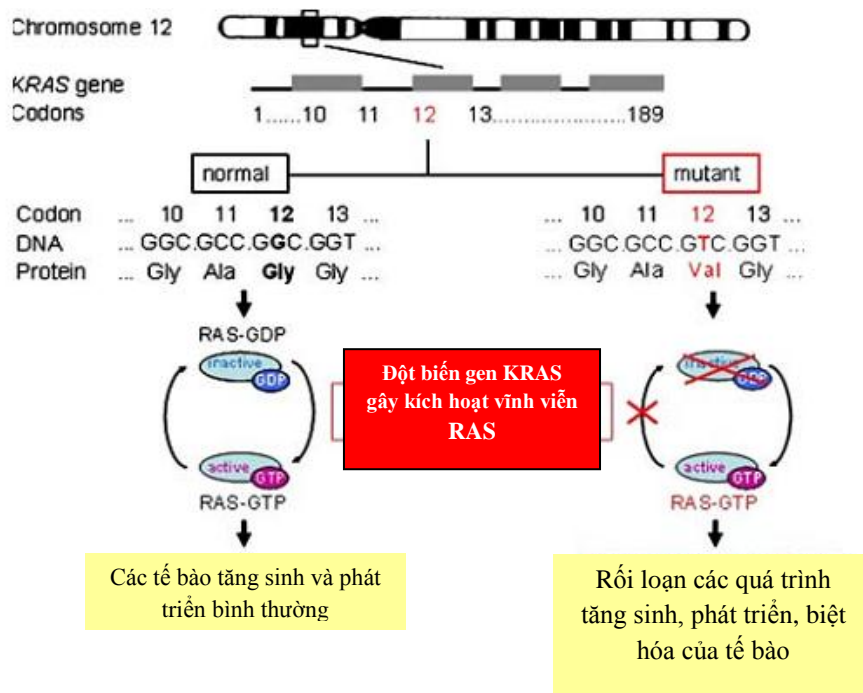
Gen KRAS mã hóa cho protein KRAS đóng vai trò truyền tín hiệu nội bào xuôi dòng từ EGFR (Hình 1.2). Các protein này có hoạt tính serine/threonine kinase với chức năng truyền tín hiệu từ các thụ thể bề mặt tế bào tới những mục tiêu nội bào thông qua các dòng thác tín hiệu (bao gồm con đường RAS-MAPK). Trong tế bào, protein RAS được giữ cân bằng thông qua sự hình thành hai phức hợp tương ứng với các trạng thái hoạt động, gồm

phức hợp RAS-GTP (protein RAS hoạt hóa) và phức hợp RAS-GDP (protein RAS bất hoạt). Protein RAS được hoạt hóa nhờ yếu tố chuyển nucleotid guanine (guanine nucleotide exchange factors, GEFs). Việc truyền tín hiệu của protein RAS bị ức chế khi phức hợp RAS-GTP bị thủy phân thành phức hợp RAS-GDP nhờ một loại protein có chức năng hoạt hóa GTPase (GAPs). Ở điều kiện sinh lý, nồng độ RAS-GTP trong cơ thể được kiểm soát chặt chẽ nhờ sự hoạt động nhịp nhàng của hai yếu tố GEFs và GAPs [33], [37], [47].

Gen KRAS bị đột biến sẽ mã hóa những protein RAS mới có khả năng chống lại hoạt tính GTPase của GAPs. Do đó, những protein RAS đột biến này luôn luôn tồn tại ở trạng thái hoạt hóa RAS-GTP. Không giống như các protein RAS lành tính luôn bị bất hoạt sau một khoảng thời gian rất ngắn, các protein RAS đột biến có khả năng kích hoạt vĩnh viễn các con đường truyền tín hiệu nằm xuôi dòng nó (con đường MEK-ERK và con đường PI3K/AKT) bất kể có sự hoạt hóa của thụ thể EGFR hay không [46] (Hình 1.4). Đây chính là cơ sở ở mức độ phân tử giải thích việc các LPĐTTĐ cho EGFR trở nên vô tác dụng một khi gen KRAS bị đột biến, bởi lúc này protein RAS không còn bị phụ thuộc vào sự hoạt hóa từ EGFR [48], [49]. Lievre và cộng sự là nhóm nghiên cứu đầu tiên đã báo cáo mối quan hệ giữa đột biến gen KRAS và sự đề kháng của khối u với các thuốc ức chế EGFR [50]. Kết quả này được củng cố bằng nghiên cứu của Benvenuti và cộng sự khi các tác giả tiến hành chuyển nhiễm gen KRAS đột biến (G12V) vào dòng tế bào ung thư đại trực tràng kiểu đại DiFi và nhận thấy toàn bộ tế bào xuất hiện tính kháng với cetuximab (một loại kháng thể đơn dòng kháng EGFR) [51].

Cho đến nay, có hơn 3000 đột biến điểm trên gen KRAS đã được công bố. Trong đó, đột biến thường gặp nhất là đột biến thay thế nucleotid ở codon 12 (chiếm 82%) và codon 13 (chiếm 17%) ở exon 2 gen KRAS [52], [53],

[54]. Đột biến tại codon 12 và 13 đã được chứng minh đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tiến triển ung thư và tạo nguy cơ kháng thuốc ức chế EGFR của khối u [48], [49]. Đột biến tại những vị trí khác như codon 61 và 146 cũng đã được báo cáo nhưng chiếm tỉ lệ nhỏ và ảnh hưởng của những dạng đột biến này lên lâm sàng chưa được làm sáng tỏ.



Hình 1.4. Vai trò của đột biến KRAS trong việc phát sinh ung thư [46]

Đột biến gen KRAS không phát hiện trên bệnh nhân UTP thể tế bào nhỏ và xảy ra với tần suất khoảng 15-25% trên bệnh nhân UTPKTBN, trong đó chủ yếu ở nhóm ung thư biểu mô tuyến hơn là ung thư biểu mô vảy. Khác với đột biến gen EGFR thường được phát hiện ở người châu Á và không hút thuốc lá (hút dưới 100 bao trong suốt cuộc đời), đột biến gen KRAS lại xảy ra phổ biến ở người da trắng và hút thuốc lá lâu năm [5], [52], [55]. Một phân tích tổng hợp (meta-analysis) của Mao và cộng sự cho thấy đột biến gen

KRAS hiện diện ở 26% bệnh nhân UTPKTBN có tiền sử hút thuốc lá và chỉ xuất hiện khoảng 6% ở những bệnh nhân không hút thuốc lá [56].

1.2.3.2. Đột biến BRAF

BRAF là phân tử điều hòa hạ nguồn KRAS (Hình 1.2), có khả năng kích hoạt con đường tín hiệu MAP. Đột biến BRAF hiện diện ở khoảng 1-3% UTPKTBN và bệnh nhân thường có thói quen hút thuốc lá và mô bệnh học thể biểu mô tuyến [57], [58], [59]. Đã có giả thuyết cho rằng đột biến BRAF là một trong những cơ chế gây kháng EGFR TKIs [60].

1.2.3.3. Những biến đổi PIK3CA, AKT1, PTEN

PIK3CA mã hóa cho bán đơn vị của phosphatidyl 3-kinase (PI3K), một chất điều hòa sự sống tế bào ở nội bào. AKT1 nhận tín hiệu xuôi dòng từ PI3K (Hình 1.2). PTEN ức chế AKT thông qua khử phosphoryl hóa. Những biến đổi sinh khối u này bao gồm các đột biến làm tăng hoạt PIK3CA và AKT1, và mất chức năng của PTEN. Những biến đổi trên con đường tín hiệu PI3K thường xuất hiện ở bệnh nhân UTPKTBN thể biểu mô vảy và có thói quen hút thuốc lá [61], [62].

Trong 552 mẫu mô UTPKTBN được làm xét nghiệm gen, đột biến tăng hoạt PIK3CA chiếm 4% (có cả ung thư biểu mô tuyến và vảy), không có đột biến AKT1 [57]. Trong 50 mẫu mô ung thư biểu mô vảy trong nghiên cứu của Malanga, đột biến AKT chiếm 6% [63]. Trong 178 mẫu mô ung thư biểu mô vảy được phân tích bởi dự án Bản đồ gen ung thư (The Cancer Genome Atlas), tỷ lệ đột biến PIK3CA, AKT1 và PTEN lần lượt là 16%, 20% và 15% [64].

Đột biến PIK3CA cũng được xem là một trong những cơ chế gây kháng EGFR TKIs ở những bệnh nhân có đột biến EGFR [65].

1.2.3.4. Đột biến MEK1

Gen MAP2K1 mã hóa protein MEK1, phân tử hạ nguồn của BRAF trong con đường tín hiệu MAP (Hình 1.2), là chất điều hòa trung tâm của sự tăng sinh tế bào. Đột biến MEK1 có tần suất khoảng 1% các trường hợp UTPKTBN thể biểu mô tuyến [7]. Hiệu quả lâm sàng của các chất ức chế MEK1 vẫn đang được nghiên cứu.

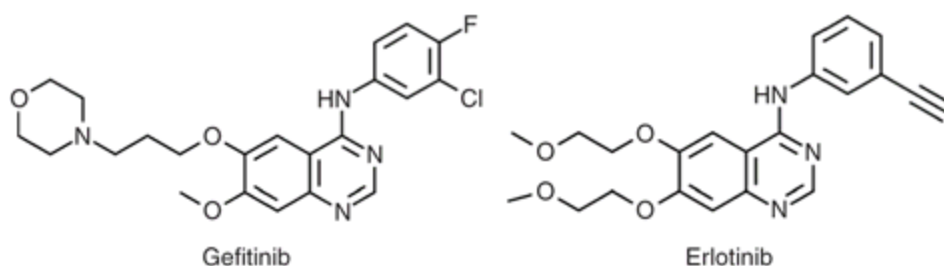
1.2.4. Hiệu quả điều trị của các chất ức chế tyrosine kinase của EGFR

1.2.4.1. Các kháng thể đơn dòng kháng EGFR

Các kháng thể đơn dòng có vai trò ngăn chặn sự gắn kết của các phối tử nội sinh với phần ngoại bào của EGFR gồm có *cetuximab* và *pantuximab*. *Cetuximab* chủ yếu được sử dụng đơn trị liệu hoặc kết hợp trong UTĐTT [66], [67], [68], [69] và ung thư biểu mô vảy đầu cổ di căn [70], [71], có biểu lộ EGFR. Trong bệnh UTPKTBN, *cetuximab* kết hợp với hóa trị truyền thống đã cho thấy lợi ích trên các bệnh nhân có đột biến EGFR [72],[73]. Nghiên cứu pha III FLEX đã kết luận điều trị bước 1 bộ đôi *cetuximab* và hóa chất truyền thống giúp cải thiện thời gian sống cho những bệnh nhân có mức biểu lộ EGFR cao (chẩn đoán bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch), đặc biệt là những bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến [73].

1.2.4.2. Các chất EGFR TKIs dạng phân tử nhỏ

TKIs dạng phân tử nhỏ là các phân tử tổng hợp có trọng lượng phân tử thấp, có nguồn gốc từ nhóm quinazoline, có vai trò ngăn chặn vị trí gắn kết magnesium-ATP của vùng tyrosine kinase nội bào (làm giảm ái lực của EGFR và phối tử), từ đó ngăn chặn sự tự phosphoryl hóa của EGFR và các con đường tín hiệu xuôi dòng [74]. Nhóm gefitinib và erlotinib đặc hiệu cho chỉ EGFR, trong khi các nhóm khác như lapatinib, vandetanib và AEE788 ức chế thêm cả VEGFR2 bên cạnh EGFR.



Hình 1.5. Cấu trúc của gefitinib và erlotinib

Hiệu quả đơn trị bước 2 của EGFR TKIs

Nghiên cứu lâm sàng pha II về đơn trị gefitinib cho bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn sau khi thất bại với hóa trị platinum-docetaxel đã cho thấy đáp ứng lâm sàng và cải thiện triệu chứng tốt, tỷ lệ đáp ứng (response rate, RR)(theo tiêu chuẩn RECIST [75]) đạt 10-15% [44], [76], do đó, vào tháng 05/2003, FDA đã công nhận sử dụng gefitinib điều trị bước 2 cho bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn [76], [77].

Erlotinib đơn trị bước 2 (điều trị bước 2: đã thất bại với một công thức hóa trị trước đó) cho RR khoảng 10% [23], [44], [78]. Nghiên cứu BR.21 cho thấy điều trị erlotinib bước 2 hoặc bước 3 cải thiện được thời gian sống cho bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối: thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (Progressive-free survival, PFS) của nhóm sử dụng erlotinib là 2,2 tháng so với nhóm dùng giả dược là 1,8 tháng (HR 0,61; $p < 0,001$), thời gian sống thêm toàn thể (Overall survival, OS) của nhóm sử dụng erlotinib là 6,7 tháng so với nhóm dùng giả dược là 4,7 tháng (HR 0,7; $p < 0,001$) [77]. Từ những bằng chứng lâm sàng trên, tháng 12/2004, erlotinib được FDA công nhận là thuốc đơn trị cho bệnh nhân UTPKTBN đã thất bại với ít nhất một công thức hóa trị cổ điển trước đó.

Năm 2010, erlotinib tiếp tục được chấp thuận dùng điều trị duy trì cho bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn không tiến triển bệnh sau bốn chu kỳ

hóa chất có chứa platinum nhờ kết quả từ một nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên, đa trung tâm trên 889 bệnh nhân. Trung vị PFS của nhóm dùng erlotinib dài hơn so với nhóm dùng giả dược (12,3 tuần so với 11,1 tuần, HR 0,71; 95%CI 0,62-0,82; $p < 0,0001$). Ngoài ra, trung vị PFS của nhóm có đột biến gen EGFR được điều trị bằng erlotinib cũng kéo dài hơn nhóm dùng giả dược có ý nghĩa thống kê (12,3 tuần so với 11,1 tuần, HR 0,69; 95%CI 0,58-0,82; $p < 0,0001$) [79].

Hiệu quả trị liệu kết hợp EGFR TKIs và hóa chất truyền thống

Khi sử dụng kết hợp đồng thời các hóa chất truyền thống có platinum, cả gefitinib và erlotinib đều không đem lại cải thiện về lâm sàng và thời gian sống. Cả 3 nghiên cứu lâm sàng pha III (INTACT 1, INTACT 2 và ISEL), điều trị bước 1 gefitinib kết hợp với hóa trị cổ điển 2 thuốc đều không cho cải thiện về OS và PFS [80], [81] (điều trị bước 1: chưa điều trị kháng ung thư đặc hiệu trước đó). Đồng thời, hai nghiên cứu lâm sàng pha III kết hợp erlotinib với hóa trị cổ điển 2 thuốc (nghiên cứu TALENT và TRIBUTE) trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối không cho cải thiện về OS [82], [83].

Hiệu quả đơn trị bước 1 trên bệnh nhân có đột biến gen EGFR

Ngược lại với các đáp ứng kém trên bệnh nhân UTPKTBN không chọn lọc hoặc chưa được xác định tình trạng gen EGFR, gefitinib và erlotinib đem lại cải thiện lâm sàng rất tốt trên bệnh nhân UTPKTBN có đột biến gen EGFR, dù là trị liệu bước 1 hoặc bước 2 [84]. Nhiều nghiên cứu lâm sàng sử dụng đơn trị EGFR TKIs bước 1 trên các bệnh nhân có đột biến EGFR đều cho RR khoảng 50-70%, với sự cải thiện tốt về cả PFS (khoảng 6-14 tháng) và OS (20-24 tháng) [85], [86], [87], [88], [89]. Không những vậy, những

nghiên cứu lâm sàng này còn cho thấy khả năng dung nạp thuốc TKIs tốt khi so sánh với phác đồ hóa trị 2 thuốc truyền thống.

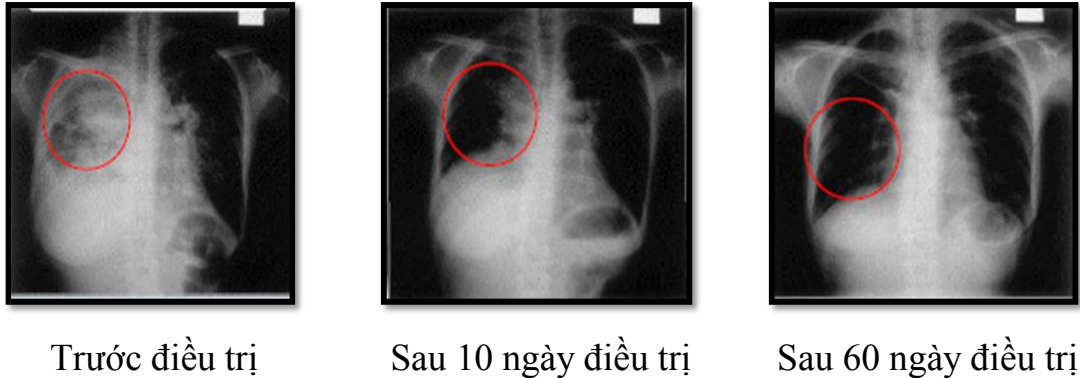
Gefitinib: nhằm đánh giá khả năng điều trị bệnh UTPKTBN của gefitinib có phụ thuộc vào tình trạng đột biến gen EGFR hay không, 3 nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên pha III đã được tiến hành, so sánh hiệu quả đơn trị bước 1 giữa gefitinib và hóa trị truyền thống có platinum (Bảng 1.1). Các bệnh nhân được chọn đều là người châu Á, UTPKTBN giai đoạn cuối, không hút thuốc lá và có mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến. Từ các kết quả này, tại Châu Âu, gefitinib đã được chấp thuận chỉ định đơn trị bước 1 cho bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn có đột biến gen EGFR.

Bảng 1.1. Các nghiên cứu lâm sàng so sánh phác đồ gefitinib bước 1 và hóa trị có platinum

Nghiên cứu lâm sàng	n	Phương pháp điều trị	RR	Trung vị PFS (tháng)	Trung vị OS (tháng)
IPASS [90]	261	Đột biến EGFR (+)			
		Gefitinib	71,2%	9,5	-
		Carboplatin/Paclitaxel	47,3%	6,3	-
			p<0,001	HR 0,48; p<0,001	
WJTOG3405 [91]	177	Đột biến EGFR (+)			
		Gefitinib	61,2%	9,2	-
		Cisplatin/Docetaxel	32,2%	6,3	-
				HR 0,489; p<0,0001	
NEJ002 [92]	230	Đột biến EGFR (+)			
		Gefitinib	73,7%	10,8	30,5
		Carboplatin/Paclitaxel	30,7%	5,4	23,6
			p<0,0001	HR 0,3; p<0,0001	p=0,31

Erlotinib: các nghiên cứu pha III khác, như OPTIMAL tại châu Á và EURTAC tại châu Âu, so sánh hiệu quả đơn trị bước 1 của erlotinib liều 150 mg/ngày với hóa chất có platinum trên các bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn có đột biến gen EGFR. Trong nghiên cứu OPTIMAL, tỷ lệ RR của

nhóm dùng erlotinib là 83% so với nhóm dùng carboplatin-gemcitabine là 36% ($p < 0,001$) và PFS của hai nhóm này lần lượt là 13,1 tháng và 4,6 tháng (HR 0,16; $p < 0,001$) [94].



Hình 1.6. Đáp ứng điều trị với gefitinib [93].

Sau 60 ngày điều trị bằng erlotinib, khối u phổi phải của bệnh nhân có đột biến L858R gần như biến mất hoàn toàn.

Tháng 05/2013, erlotinib được FDA chấp thuận sử dụng đơn trị bước 1 cho bệnh nhân UTPKTBN có đột biến gen EGFR dạng xóa đoạn điển hình tại exon 19 hoặc đột biến điểm L858R tại exon 21, dựa vào kết quả của một nghiên cứu đối chứng ngẫu nhiên, đa trung tâm trên 134 bệnh nhân. Tỷ lệ RR của nhóm erlotinib và nhóm hóa trị hai thuốc có platinum lần lượt là 65% và 16%; trung vị PFS và OS của hai nhóm lần lượt là 10,4 tháng so với 5,2 tháng (HR 0,34; 95%CI 0,23-0,49; $p < 0,001$) và 22,9 tháng so với 19,5 tháng (HR 0,93; 95%CI 0,64-1,35; $p = 0,6482$), cho thấy hiệu quả tốt của erlotinib trên quần thể bệnh nhân này.

Đáp ứng của EGFR TKIs với các loại đột biến EGFR khác nhau

Các số liệu thống kê cho thấy có sự khác biệt về kết quả đáp ứng thuốc giữa các bệnh nhân mang các dạng đột biến EGFR khác nhau. Mô hình thực

nghiệm trên tế bào cho thấy những dòng tế bào ung thư mang đột biến xóa đoạn exon 19, đột biến L858R, G719X và L861Q rất nhạy cảm với tác động của thuốc gefitinib [95], [96]. Bệnh nhân có các đột biến này đáp ứng rất tốt với các EGFR TKIs (RR đạt 60-80%) so với nhóm bệnh nhân không được sàng lọc bằng xét nghiệm gen (RR 10-20%) [95]. Bệnh nhân mang đột biến xóa đoạn exon 19 có RR cao hơn và có thời gian sống dài hơn bệnh nhân mang đột biến điểm ở exon 21.

Những trường hợp UTPKTBN có đột biến gen EGFR được điều trị bằng gefitinib hoặc erlotinib luôn phát triển khả năng kháng lại các EGFR TKIs này [97], [98]. Cơ chế phổ biến nhất (khoảng 50%) và được xác định sớm nhất là người bệnh có mang đột biến kháng thuốc T790M (thay thế Threonine bằng Methionine ở vị trí acid amin 790) ở exon 20 gen EGFR. Đột biến này gây nên hiện tượng “trở” do ảnh hưởng bởi sự thay đổi cấu hình tại nơi gắn kết với TKIs [99], [100]. Các đột biến gây kháng thuốc khác ít gặp hơn đã được xác định là đột biến L747S, D761Y, T854A, S768I và V769L...[87], [101], [102]. Sự khuếch đại của gen mã hóa thụ thể yếu tố phát triển tế bào gan HGFR1 [101], [103] hoặc tình trạng quá biểu hiện của yếu tố tăng trưởng tế bào gan HGF [104] được phát hiện trong khoảng 20% số bệnh nhân UTPKTBN có đột biến EGFR được điều trị bằng gefitinib hoặc erlotinib, tuy nhiên, chúng có thể xảy ra đồng thời với các đột biến kháng thuốc như T790M [108], [110]. Mô hình kháng thuốc tương tự như nhau giữa các bệnh nhân được điều trị bằng erlotinib hoặc gefitinib [101], [103], [104]. Cách kiểm soát bệnh cho các trường hợp kháng TKIs của bệnh nhân UTPKTBN có đột biến EGFR chưa được khuyến cáo rõ ràng vì chưa có kết quả đầy đủ và chính xác từ các nghiên cứu lâm sàng đang tiến hành.

1.2.5. Tình hình nghiên cứu đột biến gen EGFR, gen KRAS và hiệu quả của EGFR TKIs trong điều trị UTPKTBN tại Việt Nam

Năm 2009, Lê Thượng Vũ báo cáo 5 trường hợp điều trị erlotinib bước 2/3 tại bệnh viện Chợ Rẫy TP.Hồ Chí Minh, ghi nhận được RR là 2/5 (40%), đều là đáp ứng một phần và có mô bệnh học là thể biểu mô vảy, 1/5 trường hợp đạt bệnh ổn định, PFS trung bình là 5,4 tháng [106]. Đây là kết quả đầu tiên rất khả quan cho việc điều trị đích trên bệnh nhân Việt Nam.

Năm 2010, Vũ Văn Vũ đánh giá hiệu quả điều trị erlotinib trên 10 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn tại bệnh viện Ung Bướu TP.Hồ Chí Minh. Kết quả thu được RR đạt 4/10 (40%) trong đó có 1/10 trường hợp đáp ứng hoàn toàn (đáp ứng hoàn toàn này được duy trì ở tháng 12 khi kết thúc nghiên cứu), 6/10 trường hợp đạt bệnh ổn định. Tất cả các bệnh nhân đều có đáp ứng chủ quan, triệu chứng bệnh thuyên giảm sau 1-2 tuần dùng thuốc. Trung vị PFS là 11 tháng (khoảng dao động từ 4 tháng đến 34 tháng). Kết quả trên chứng tỏ erlotinib có hiệu quả trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn khi dùng bước 1 hoặc các bước sau [107].

Năm 2010, Nguyễn Thiện Nhân báo cáo một trường hợp ung thư phế quản-phổi thể biểu mô vảy, xâm lấn chít hẹp khí quản đã đáp ứng hoàn toàn sau 10 ngày điều trị erlotinib [108].

Năm 2011, bằng kỹ thuật giải trình tự gen, Hoàng Anh Vũ và CS phát hiện được 2 bệnh nhân có đột biến ở exon 19 và 1 bệnh nhân có đột biến tại exon 21 gen EGFR trong 4 bệnh nhân UTPKTBN có đáp ứng với erlotinib tại bệnh viện Lao và Bệnh Phổi Phạm Ngọc Thạch TP.Hồ Chí Minh [109], [110]. Sau đó, khi giải trình tự 71 mẫu mô UTPKTBN, Hoàng Anh Vũ công bố tỷ lệ đột biến gen EGFR là 42% và đột biến gen KRAS là 46,5% [111].

Năm 2011, nhóm nghiên cứu thuộc Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein thuộc Trường Đại Học Y Hà Nội đã công bố những tỷ lệ ban đầu về tình trạng đột biến gen EGFR trong UTPKTBN tại Việt Nam. 11/42 (26,2%) mẫu mô UTPKTBN giai đoạn muộn được xác định có đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen [112].

Năm 2013, Phạm Lê Anh Tuấn và cộng sự áp dụng kỹ thuật Scorpion ARMS (kỹ thuật khuếch đại alen đột biến) với độ nhạy cao hơn song song với kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện đột biến gen EGFR trên 70 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối [113]. Trong 25/70 bệnh nhân mang đột biến (35,7%), kỹ thuật Scorpion ARMS đã khẳng định một trường hợp đột biến L858R (exon 21) cho đỉnh tín hiệu đột biến thấp, không rõ ràng trên kết quả giải trình tự gen.

Năm 2013, Nguyễn Tuyết Mai và cộng sự đã khảo sát hiệu quả điều trị bước 2/3 của erlotinib trên 36 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn thể biểu mô tuyến điều trị tại bệnh viện K Trung Ương. Chỉ có 11/36 bệnh nhân được làm xét nghiệm gen EGFR, trong đó có 6 trường hợp đột biến. Kết quả cho thấy điều trị bước erlotinib 2/3 có thể giúp kéo dài sự sống ở những bệnh nhân ung thư phổi thể biểu mô tuyến với trung vị PFS và OS lần lượt là 8,15 tháng và 12,1 tháng [114].

Năm 2013, Lê Thượng Vũ, Trần Văn Ngọc đã đánh giá hiệu quả điều trị erlotinib trên 98 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn. Trên những bệnh nhân có đáp ứng, 80% cải thiện triệu chứng ngay tháng đầu, trong đó 8% ở ngay tuần đầu. Tỷ lệ đáp ứng chung là 35,5%. Trung vị PFS là 7 tháng, trong đó đối với nhóm sử dụng erlotinib bước 2/3 là 8 tháng và bước 1 là 4 tháng. Trung vị OS tính chung là 11 tháng, trong đó là 18 tháng đối với điều trị

bước 2/3 và 8 tháng đối với bước 1. Tần suất bệnh nhân sống thêm trên 1 năm là 50% [115].

Năm 2014, nghiên cứu Pioneer xác định tần suất đột biến gen EGFR trên 1482 bệnh nhân UTPKTBN thể biểu mô tuyến từ 51 trung tâm ở 7 nước châu Á. Tỷ lệ đột biến gen EGFR của Việt Nam là 64,2%, cao nhất trong các nước tham gia nghiên cứu. Trong đó, tỷ lệ đột biến xóa đoạn tại exon 19 là 27,5%, đột biến L858R exon 21 là 12,5%, còn các đột biến kháng thuốc như T790M exon 20, S768I exon 20, đột biến thêm đoạn exon 20 ...chiếm 8,3%. Do sử dụng kỹ thuật Scorpion ARMS nên nghiên cứu Pioneer không phát hiện ra đột biến mới [116].

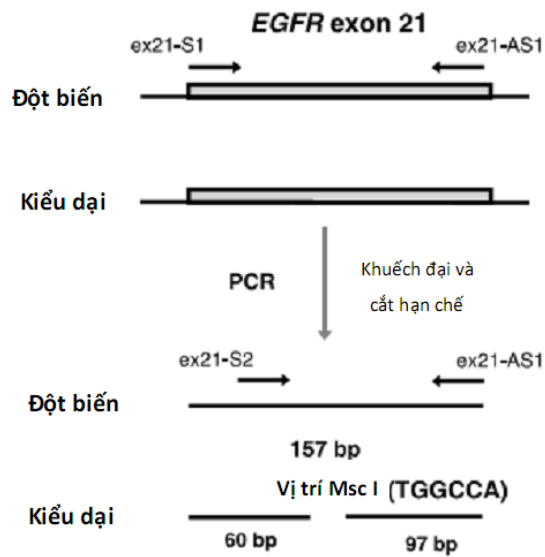
Tóm lại, các nghiên cứu về đột biến gen EGFR và KRAS cũng như hiệu quả điều trị đích trên bệnh nhân UTPKTBN ở nước ta còn hạn chế, chỉ bắt đầu từ năm 2009 đến nay và cũng mới chỉ có 10 nghiên cứu. Chưa có nghiên cứu nào kết hợp nhiều kỹ thuật với các ưu điểm khác nhau để tăng độ nhạy khi xác định đột biến. Chỉ mới có một nghiên cứu của Hoàng Anh Vũ và cộng sự (năm 2011) khảo sát đồng thời cả hai gen EGFR và KRAS. Chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1, dựa trên nền tảng kết quả xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS.

1.3. PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ KRAS

1.3.1. Kỹ thuật PCR-RFLP

Kỹ thuật PCR-RFLP dựa trên cơ sở kỹ thuật PCR cổ điển. Nguyên tắc của phản ứng PCR dựa vào hoạt tính của các DNA polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch DNA khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotid. Phản ứng này đòi hỏi sự có mặt của những môi xuôi và môi

ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn. Sau mỗi chu kỳ các chuỗi đôi DNA mới tạo thành sẽ tiếp tục được dùng để làm các phân tử DNA nền để tổng hợp các DNA mới trong chu kỳ tiếp theo. Sản phẩm cuối của phản ứng PCR là đoạn DNA chuỗi đôi có chiều dài là khoảng cách giữa hai đoạn gen môi, và hai đầu tận cùng của sản phẩm được xác định bởi đầu tận cùng 5' của hai đoạn gen môi.



Hình 1.7. Phát hiện đột biến exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật RFLP [117]

Sau khi kết thúc phản ứng, sản phẩm PCR đặc hiệu sẽ được tinh sạch và xử lý với enzym cắt giới hạn đã được lựa chọn nhằm tạo ra những phân đoạn DNA nhỏ hơn. Sau khi được điện di trên gel agarose, số lượng và chiều dài các đoạn DNA này sẽ giúp phát hiện các trường hợp đột biến. Phương pháp phát hiện đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật PCR-RFLP dựa trên nguyên lý : exon 21 của gen EGFR kiểu đại có vùng trình tự đặc hiệu cho enzym *MscI*, đột biến tại exon 21 gen EGFR làm mất vị trí cắt của enzym do đó sản phẩm PCR không bị cắt bởi enzym *MscI* [117]. Với thiết kế kỹ thuật tương tự như khi tìm đột biến gen EGFR, sản phẩm khuếch đại codon 12 gen KRAS sẽ

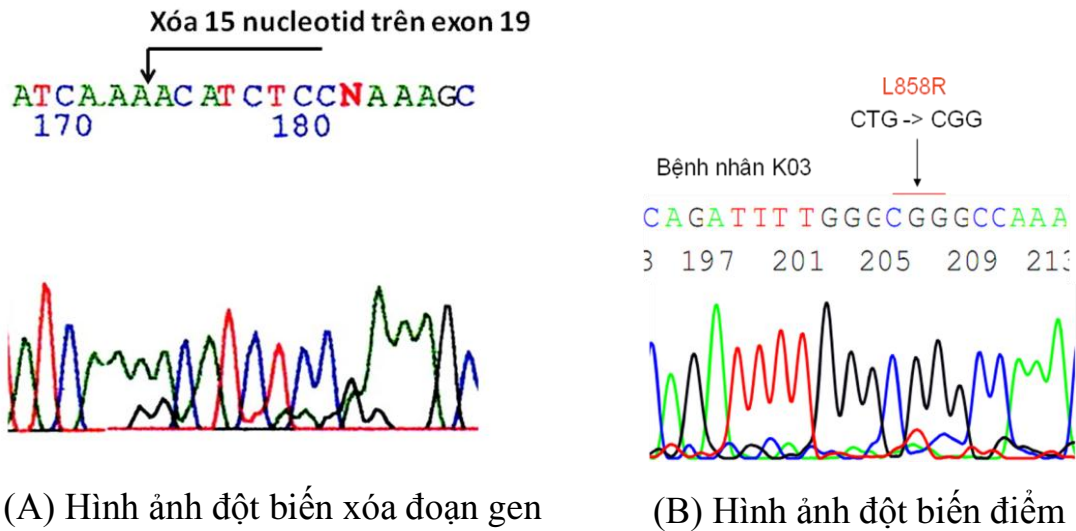
được xử lý với enzym *NlaI* và codon 13 với *HaeIII* [118]. Sau khi phân cắt, các sản phẩm sẽ được phân tích kết quả trên thạch agarose. Đây là phương pháp truyền thống, kinh tế nhưng rất hiệu quả và cho độ tin cậy cao.

1.3.2. Kỹ thuật giải trình tự gen

Đoạn DNA cần được giải trình tự được sử dụng như trình tự mẫu cho phản ứng giải trình tự bắt đầu từ vị trí gắn môi. Hỗn hợp của deoxy- và dideoxynucleotid được sử dụng trong phản ứng với nồng độ sao cho các dideoxynucleotid sẽ gắn vào mỗi vị trí mà các deoxynucleotid thường gắn trên đoạn DNA đang được tổng hợp. Sự gắn của các dideoxynucleotid sẽ làm gián đoạn quá trình kéo dài các đoạn DNA được tổng hợp, kết quả sẽ tạo ra hỗn hợp các sợi DNA có kích thước khác nhau. Nucleotid tận cùng trên mỗi sợi DNA được xác định bằng cách chạy một phản ứng hỗn hợp nhưng từng loại dideoxynucleotid được đánh dấu bằng các chất phát huỳnh quang đặc hiệu khác nhau.

Sản phẩm sau phản ứng giải trình tự sẽ được đọc trình tự bằng máy giải trình tự tự động sử dụng bảng gel polyacrylamide. Máy gồm 2 phần: phần dùng điện di gel, phần phát hiện các vạch điện di. Các vạch điện di được các con mắt cảm quang phát hiện khi đi qua chùm tia laser và phát sáng lên. Tín hiệu được mắt cảm quang truyền về máy tính để hiển thị thành các đỉnh cường độ sáng. Sau đó, trình tự gen của mẫu nghiên cứu sẽ được đối chiếu với trình tự gen tham chiếu trên ngân hàng gen thế giới (GenBank) và được phân tích để xác định vùng hoặc điểm đột biến.

Do các đột biến gen EGFR trên exon 18 ÷ 21 và đột biến gen KRAS rất đa dạng, kỹ thuật giải trình tự gen được xem là tốt nhất để khảo sát các đột biến này.

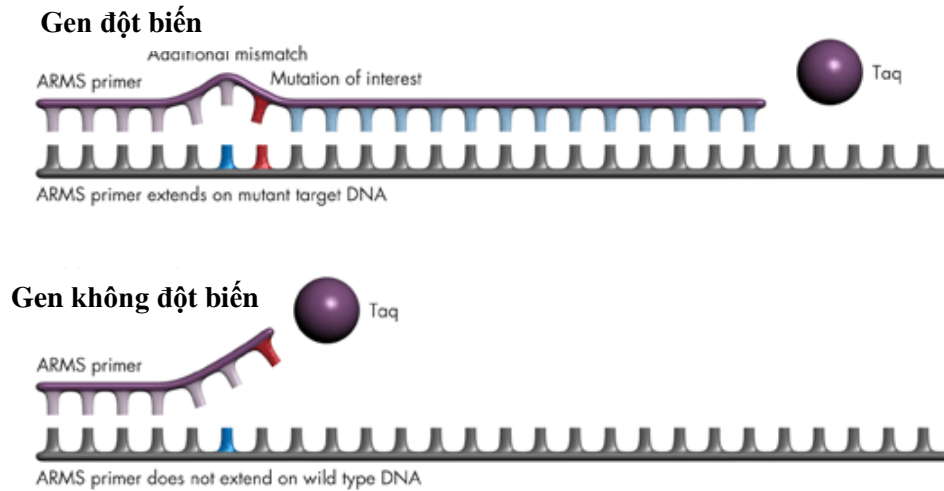


Hình 1.8. Phát hiện đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen
(kết quả xét nghiệm gen của các bệnh nhân trong nghiên cứu – thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein Trường Đại Học Y Hà Nội)

1.3.3. Kỹ thuật Scorpion ARMS

Kỹ thuật Scorpion ARMS (Scorpions-Amplification Refractory Mutation System) là một trong số ít những kỹ thuật được các cơ quan quản lý Y Dược của Châu Âu và Hoa Kỳ cấp giấy phép công nhận đạt tiêu chuẩn ứng dụng trong chẩn đoán lâm sàng (*European Union in vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC*).

Scorpion ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpion trong phản ứng real-time PCR để phát hiện các đột biến. Trong đó, nguyên lý của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến là dựa vào đặc tính của Taq DNA polymerase chỉ khuếch đại hoàn chỉnh một phân tử DNA một khi đầu 3' của môi và sợi khuôn bổ sung hoàn toàn với nhau. Khi đầu 3' của môi không bổ sung với sợi khuôn phản ứng PCR bị ức chế hoàn toàn. Dựa trên nguyên lý này, kỹ thuật cho phép khuếch đại đặc hiệu một trình tự đột biến ngay cả trong trường hợp alen đột biến đó chiếm một tỉ lệ rất nhỏ (1%) trong tổng số sợi khuôn DNA.

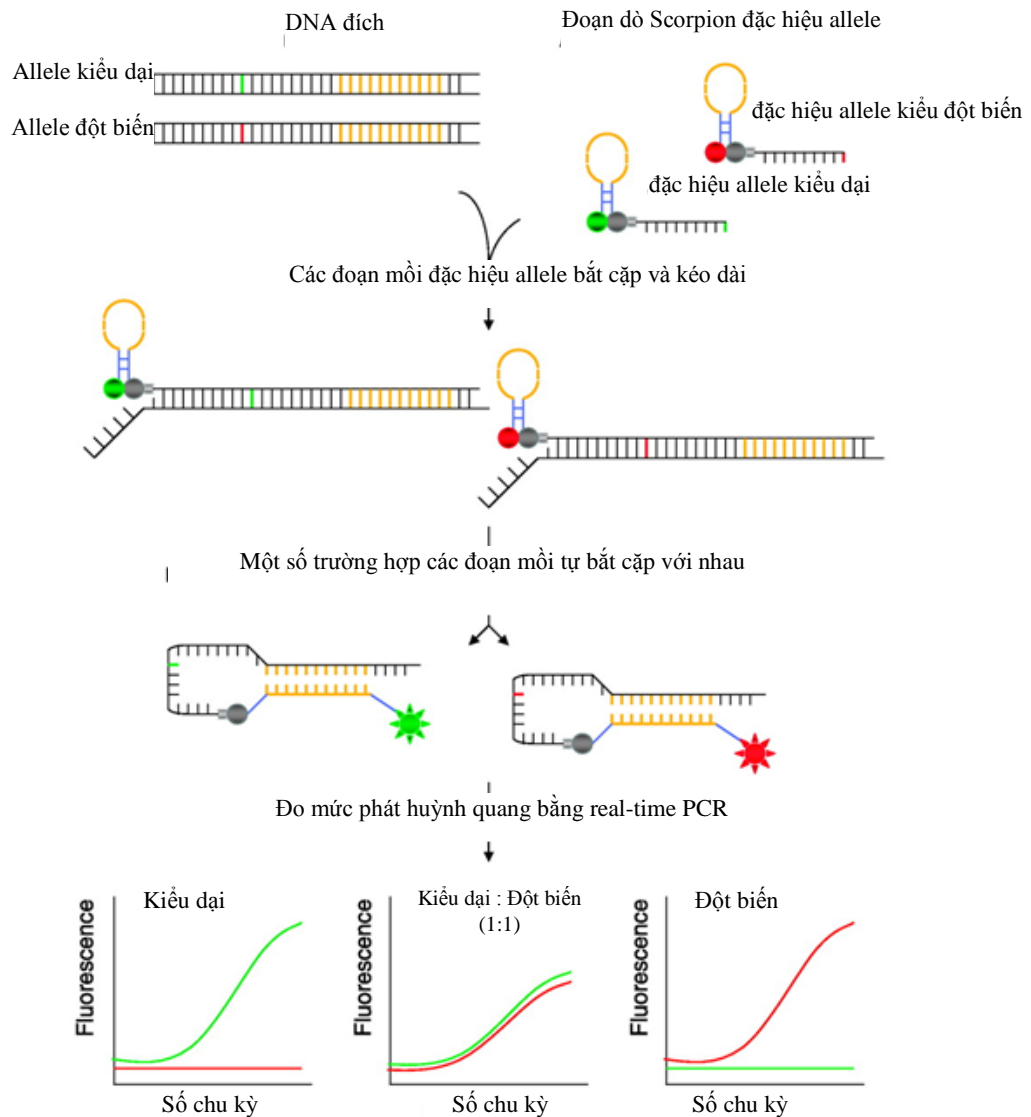


Hình 1.9. Nguyên lý của kỹ thuật ARMS

(http://www.sabiosciences.com/qbiomarker_product/HTML/SMH-014A.html)

Scorpion là phân tử có cấu tạo một đầu mang trình tự của đoạn môi đặc hiệu với alen đột biến cần khuếch đại, đầu trình tự này được nối với một đầu dò. Phần kích thích phát tín hiệu huỳnh quang (fluorophore) của đầu dò được gắn với phần ức chế (quencher) có nhiệm vụ dập tắt tín hiệu huỳnh quang của phần kích thích. Trong phản ứng PCR khi đầu dò bám với đoạn trình tự khuếch đại, phần kích thích phát tín hiệu huỳnh quang được giải phóng khỏi phần ức chế, phát tín hiệu đến bộ phận cảm biến của máy real-time PCR.

Kỹ thuật Scorpion ARMS cho phép phát hiện được gần như toàn bộ các đột biến có liên quan đến mức độ đáp ứng thuốc của gen EGFR: G719A, G719C và G719S (Exon 18); 19 dạng đột biến xóa đoạn thường gặp ở exon 19; T790M và S768I (Exon 20), 3 dạng đột biến thêm đoạn thường gặp ở exon 20; L858R và L861Q (Exon 21); và đột biến codon 12, 13 gen KRAS (G12A, G12D, G12V, G12S, G13D).



Hình 1.10. Nguyên tắc của kỹ thuật Scorpion ARMS [119]

1.3.4. Kỹ thuật Smart Amplification Process (SMAP)

Kỹ thuật SMAP là một công nghệ mới nhất được phát triển bởi các nhà khoa học tại viện công nghệ Riken-Nhật Bản nhằm phát hiện các đột biến trên gen EGFR và KRAS. Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật SMAP là : **Khuếch đại DNA = Phát hiện đột biến**. Để thực hiện được nguyên lý này kỹ thuật SMAP sử dụng (I) các cặp mồi phát hiện đột biến được thiết kế bất đối xứng

nhằm giảm thiểu các khả năng môi ghép cặp sai với sợi khuôn (II) một loại protein mới với khả năng nhận biết và bám đặc hiệu tại vị trí có sự ghép cặp không tương đồng giữa môi và khuôn (Taq MutS) ngăn không cho phức hợp môi-khuôn được khuếch đại trong phản ứng kéo dài chuỗi. Chỉ những phức hợp môi-khuôn DNA ghép cặp hoàn mới được khếch đại nhờ DNA polymerase, tín hiệu của sản phẩm khuếch đại đặc hiệu đột biến được phát hiện trong hệ thống máy real-time PCR [120].

Thực tế cho thấy một trong những khó khăn của việc áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử như giải trình tự gen, Scorpion ARMS trong thực tế lâm sàng thường đòi hỏi qua nhiều bước, đội ngũ kỹ thuật viên có kiến thức chuyên sâu về sinh học phân tử, giá thành cao, thời gian phân tích kết quả lâu. Các công trình nghiên cứu áp dụng kỹ thuật SMAP cho thấy kỹ thuật vận hành qua một bước duy nhất “Khuếch đại DNA = Phát hiện đột biến”, có độ chính xác cao, thời gian từ khâu tách mẫu đến cho kết quả phân tích đột biến gen rất ngắn : khoảng 30 phút. Đây là một ưu thế nổi bật của kỹ thuật SMAP so với các kỹ thuật khác như giải trình tự gen (1-2 ngày), PCR-RFLP (1-2 ngày), Scorpion ARMS (3-4 giờ). Một khi kỹ thuật SMAP được áp dụng thành công, kỹ thuật mới này sẽ là một công cụ đắc lực giúp các nhà nghiên cứu và lâm sàng Việt Nam hiện thực hóa mục tiêu y học cá thể - khám và chữa bệnh dựa trên tình trạng gen của bệnh nhân.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

181 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối (IIIB-IV) điều trị tại các Bệnh viện Hữu Nghị, Bệnh viện K Trung Ương, Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Phổi Trung Ương, Bệnh viện Ung Bướu Hà Nội, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, từ 01/01/2012 đến 30/03/2013, thỏa các tiêu chuẩn chọn mẫu và tiêu chuẩn loại trừ sau:

2.1.1. Xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS

Tiêu chuẩn chọn mẫu:

- Được chẩn đoán xác định UTPKTBN giai đoạn IIIB-IV (theo tiêu chuẩn của AJCC VII [121]) bằng kết quả giải phẫu bệnh thuộc một trong các loại sau: ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô vảy, ung thư biểu mô tuyến-vảy và ung thư biểu mô tế bào lớn (được mô tả và phân loại theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới [21]).

- Có đầy đủ thông tin về hành chính, tiền căn, giai đoạn bệnh UTP, kết quả giải phẫu bệnh.

- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Không xác định được đột biến gen EGFR hoặc KRAS do chất lượng mẫu kém.

2.1.2. Đánh giá hiệu quả điều trị

61 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối (IIIB-IV) từ 181 bệnh nhân đã được xét nghiệm gen nêu trên (thời điểm kết thúc nhận mẫu vào nhánh theo dõi điều trị là 30/12/2013), thỏa các tiêu chuẩn chọn mẫu và tiêu chuẩn loại trừ sau:

Tiêu chuẩn chọn mẫu:

- Từ 18 tuổi trở lên.
- Chẩn đoán mô bệnh học là ung thư phổi thể biểu mô tuyến
- Đánh giá toàn trạng trước điều trị $\geq 70\%$ theo chỉ số Karnofsky [122]; các chỉ số cận lâm sàng cần có: số lượng bạch cầu đa nhân trung tính $\geq 1500/\text{mL}$, số lượng tiểu cầu $\geq 100\ 000/\text{mL}$, nồng độ hemoglobin $\geq 9,0\text{g/dL}$, nồng độ creatinine $\leq 1,5\text{mg/dL}$, hoạt độ AST và ALT $\leq 2,5$ lần giới hạn trên bình thường.
- Chưa được điều trị kháng ung thư trước đó.
- Không có tiền căn dị ứng.
- Có đầy đủ thông tin (về hành chánh, tiền căn, bệnh sử, khám lâm sàng, các thông số cận lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh) cho đến khi kết thúc nghiên cứu qua hồ sơ bệnh án, thư từ, gọi điện thoại cho bệnh nhân hoặc gia đình bệnh nhân.
- Được điều trị erlotinib ít nhất 1 tháng, tính đến thời điểm kết thúc nghiên cứu.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Suy gan, suy thận nặng, suy hô hấp tiến triển, nhiễm trùng chưa kiểm soát, có thai, di căn não chưa kiểm soát, có bệnh ung thư khác, loạn nhịp nặng đang phải dùng thuốc, bệnh tiểu đường hoặc mắt nghiêm trọng.

- Kết quả xác định đột biến gen:
 - o Có đột biến ở vùng kháng với thuốc điều trị đích dạng phân tử nhỏ của gen EGFR (đột biến D761Y exon 19; T790M, N771T, V769L, S768I exon 20; các đột biến thêm đoạn exon 20, trừ đột biến A763_Y764insFQEA), những đột biến mới của gen EGFR chưa công bố trên y văn [123].
 - o Có đột biến tại codon 12 và 13 của exon 2 gen KRAS.
- Những bệnh nhân ngưng dùng thuốc (khi bệnh chưa có dấu hiệu tiến triển) vì tác dụng phụ của thuốc hoặc lý do chủ quan của bệnh nhân và người nhà.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:

- Nghiên cứu cắt ngang, mô tả loạt ca (xác định đột biến gen EGFR và KRAS) và nghiên cứu tiền cứu, có theo dõi dọc thời gian sống thêm (đánh giá hiệu quả điều trị)
- Thời gian nghiên cứu: từ 01/01/2012 đến hết 30/03/2014

2.2.2. Phương pháp tiến hành nghiên cứu

2.2.2.1. Xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS

- Thu thập mẫu mô UTP sau khi bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định dựa vào kết quả giải phẫu bệnh. Mẫu mô được sử dụng là mẫu mô sinh thiết đúc trong khối nén.
- Các mẫu mô sau khi được ký hiệu mã số của bệnh nhân sẽ được xác định mô bệnh học và được chọn lựa vùng tập trung tế bào ung thư (tại khoa Giải phẫu bệnh) theo các bước như sau: vùng mô ung thư được đánh dấu trên lam giải phẫu bệnh để phân biệt với vùng mô lành xung quanh (từ 5 – 10 tiêu bản), rồi được cạo vào ống ly tâm 1,5 ml bằng các lưỡi dao phẫu thuật riêng biệt. Những trường hợp bệnh phẩm sinh thiết quá nhỏ không thể đánh dấu

phân biệt vùng mô ung thư và mô lành nên được thu toàn bộ vào tube ly tâm. Sử dụng vùng mô này để tách chiết, tinh sạch DNA bộ gen.

- Tách chiết DNA từ mẫu mô UTP bằng xylene và tinh sạch bằng phương pháp phenol/chloroform (Phụ lục 2). Kiểm tra chất lượng DNA mới tách chiết bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi gen nội chuẩn GAPDH (Phụ lục 3).

- Xác định đột biến gen EGFR và KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự gen

- DNA của bệnh nhân tách chiết từ mẫu mô UT được sử dụng để khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho các exon 18 ÷ 21 của gen EGFR (Phụ lục 4) và KRAS (Phụ lục 5)

- Sản phẩm sau PCR sẽ được điện di trên gel agarose 1,5%. (Cách chuẩn bị gel agarose và tiến hành kỹ thuật điện di: phụ lục 6)

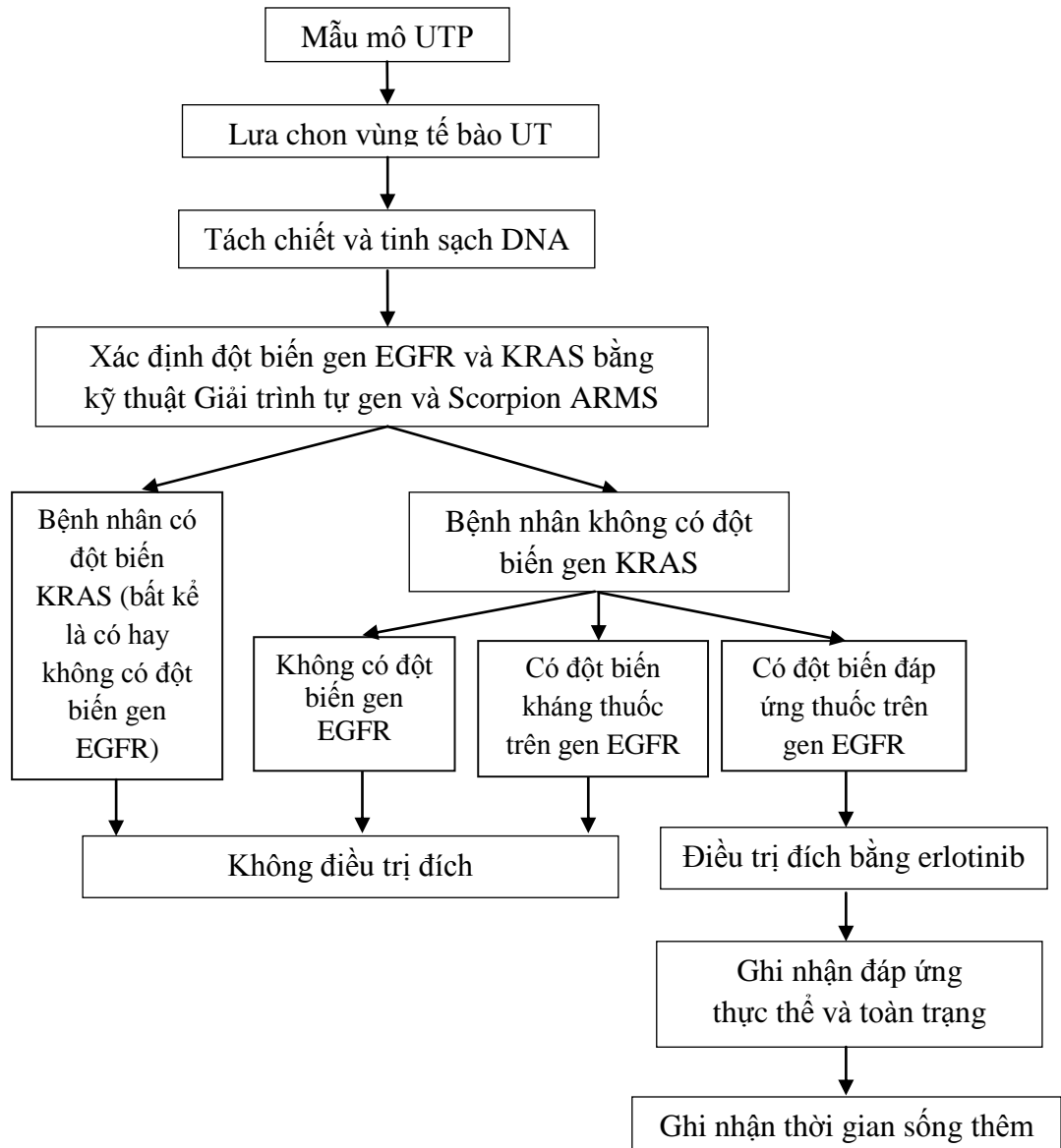
- Sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose được tinh sạch bằng hệ thống *Promega Wizard SV gel clean-up system* (Promega) (Phụ lục 7).

- Đoạn DNA sau khi tinh sạch sẽ được chạy phản ứng giải trình tự gen sử dụng *BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), sau đó được điện di trên máy giải trình tự gen tự động ABI3700 (phụ lục 8). Trình tự gen EGFR và KRAS của bệnh nhân sẽ được đối chiếu và so sánh với trình tự GenBank (gen EGFR: NG_007726, gen KRAS: NG_007524, National Center for Biotechnology Information) và phân tích theo phần mềm Seqscape (Applied Biosystems). Những quy ước về ký hiệu nucleotid trên kết quả giải trình tự được liệt kê trong phụ lục 8.

- Xác định đột biến gen EGFR và KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

- Sử dụng EGFR PCR kit và KRAS PCR kit (Qiagen) tích hợp kỹ thuật ARMS và công nghệ Scorpion, phát hiện 29 dạng đột biến gen EGFR và 7 dạng đột biến gen KRAS bằng phản ứng real-time PCR (Bảng 2.1. và 2.2).

▪ Các đoạn môi Scorpion giúp phát hiện kiểu gen EGFR và KRAS đột biến, được thiết kế dựa trên trình tự gen EGFR và KRAS tham chiếu của người trên ngân hàng gen thế giới. Mỗi mẫu bệnh nhân được chạy hai lần trong cùng một phản ứng cùng với mẫu chứng dương, chứng âm và mẫu nội chuẩn (Phụ lục 9).



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu xác định đột biến gen và theo dõi điều trị

Bảng 2.1. Các dạng đột biến exon 18-21 gen EGFR được phát hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

Đột biến	Exon	Biến đổi nucleotid	Cosmic ID [123]
L858R	21	2537T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
T790M	18	2369C>T	6240
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Thêm đoạn	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Xóa đoạn	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC	12422
		2238_2252>GCA	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2258>CA	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
2240_2254del15	12369		
2239_2251>C	12383		

Bảng 2.2. Các dạng đột biến exon 2 gen KRAS được phát hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

Codon	Dạng đột biến	Biến đổi nucleotid	COSMID ID [123]
12	G12A	GGT>GCT	522
12	G12D	GGT>GAT	521
12	G12R	GGT>CGT	518
12	G12C	GGT>TGT	516
12	G12S	GGT>AGT	517
12	G12V	GGT>GTT	520
13	G12D	GGC>GAC	532

- Các quy trình xác định đột biến gen EGFR và KRAS được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại Học Y Hà Nội.

2.2.2.2. Đánh giá hiệu quả điều trị

- Tất cả bệnh nhân được trực tiếp phỏng vấn, ghi nhận bệnh sử, diễn tiến bệnh, các thông số lâm sàng và cận lâm sàng theo mẫu nghiên cứu thống nhất (Phụ lục 1).

- Mỗi bệnh nhân sẽ được điều trị bằng erlotinib 150mg 1v/ngày, dùng đường uống, cho đến khi bệnh có dấu hiệu tiến triển, bệnh nhân tử vong, xuất hiện tác dụng phụ không chấp nhận được của thuốc hoặc khi người bệnh từ chối tiếp tục dùng thuốc. Việc giảm liều thuốc hoặc ngưng điều trị (nếu có) tuân theo quyết định của bác sỹ điều trị.

- Trong quá trình theo dõi điều trị, bệnh nhân sẽ được đánh giá mức độ đáp ứng điều trị mỗi 03 tháng:

▪ **Đánh giá đáp ứng toàn trạng** theo chỉ số Karnofsky [122] (Bảng 2.3). Đáp ứng toàn trạng được đánh giá thành 2 mức: *ổn định/tăng* và *giảm* (chỉ số Karnofsky giữ nguyên, tăng lên hoặc giảm đi so với thời điểm đánh giá trước).

▪ **Đánh giá đáp ứng thực thể** theo tiêu chuẩn RECIST v1.1 [75] (Bảng 2.4 và 2.5). *Tổn thương đo lường* là những tổn thương đo được kích thước trên hình ảnh chụp cắt lớp vi tính hoặc chụp cộng hưởng từ, được xác định theo bảng 2.4. Trong trường hợp không xác định được khối u nguyên phát (bệnh nhân chỉ có tràn dịch màng phổi tái lập nhiều lần hoặc nhu mô phổi tổn thương dạng đông đặc không xác định được giới hạn kích thước u...), đánh giá thực thể sẽ dựa trên *tổn thương không đo lường* (Bảng 2.5). Đây là những tổn thương không đo được kích thước trên hình ảnh chụp cắt lớp vi tính hoặc chụp cộng hưởng từ (như dịch màng phổi, nồng độ các chất chỉ thị u...). *Tổn thương thứ phát* là những tổn thương xuất hiện trong quá trình điều trị mà trước khi bắt đầu điều trị chưa có (hạch, di căn...). *Tỷ lệ đáp ứng (ORR)* được tính bằng *tổng tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn (%CR)* và *tỷ lệ đáp ứng một phần (%PR)*. Khi bệnh có dấu hiệu tiến triển, bệnh nhân sẽ được hội chẩn và thay đổi phác đồ điều trị.

▪ **Ghi nhận thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS):** bắt đầu từ lúc tiếp nhận điều trị đặc hiệu (erlotinib) cho đến khi bệnh có dấu hiệu tiến triển (hoặc tử vong khi bệnh chưa tiến triển), có thông tin cuối cùng trong trường hợp mất theo dõi hoặc kết thúc nghiên cứu (tháng)

▪ **Ghi nhận thời gian sống thêm toàn thể (OS):** bắt đầu từ lúc tiếp nhận điều trị đặc hiệu (erlotinib) cho đến khi bệnh nhân tử vong (vì bất kỳ nguyên nhân gì), có thông tin cuối cùng trong trường hợp mất theo dõi hoặc kết thúc nghiên cứu (tháng).

- **Theo dõi và phân độ nặng các tác dụng phụ của thuốc** theo tiêu chuẩn *Đánh giá độc tính và tác dụng phụ của hóa chất* của Viện Ung thư quốc gia Hoa Kỳ, phiên bản 3.0 (CTCAEv3.0) [124] (Phụ lục 10). Việc xử lý tác dụng phụ của erlotinib (như tiêu chảy, phát ban thể nổi mụn...), nếu có, tuân theo chỉ định của bác sỹ điều trị.

Bảng 2.3.Đánh giá toàn trạng theo chỉ số Karnofsky [122]

Điểm	Mức hoạt động
100%	Không có triệu chứng rõ ràng của bệnh, khả năng hoạt động mạnh
90%	Khả năng hoạt động bình thường, triệu chứng bệnh tối thiểu
80%	Khả năng hoạt động bình thường nhưng phải cố gắng. Có triệu chứng bệnh
70%	Không thể hoạt động bình thường hoặc làm việc. Tự phục vụ tối thiểu được
60%	Cần có sự giúp đỡ cần thiết và được chăm sóc y tế
50%	Cần có sự trợ giúp rất lớn và được chăm sóc y tế thường xuyên
40%	Không tự phục vụ tối thiểu, cần có sự trợ giúp liên tục và được chăm sóc đặc biệt
30%	Liệt giường, nằm viện nhưng chưa có nguy cơ tử vong
20%	Bệnh nặng chăm sóc đặc biệt ở bệnh viện
10%	Hấp hối
0%	Tử vong

Bảng 2.4. Đánh giá đáp ứng thực thể theo tiêu chuẩn RECIST v1.1 đối với các tổn thương đo lường [75]

Tổn thương đo lường	Tổn thương không đo lường	Tổn thương Thứ phát	Đáp ứng tổng thể
Đáp ứng hoàn toàn	Đáp ứng hoàn toàn	Không	Đáp ứng hoàn toàn
Đáp ứng hoàn toàn	Không đạt Đáp ứng hoàn toàn và không đạt Bệnh tiến triển	Không	Đáp ứng một phần
Đáp ứng hoàn toàn	Không xác định được	Không	Đáp ứng một phần
Đáp ứng một phần	Không đạt Bệnh tiến triển và không phải không xác định được	Không	Đáp ứng một phần
Bệnh giữ nguyên	Không đạt Bệnh tiến triển và không phải không xác định được	Không	Bệnh giữ nguyên
Không xác định được	Không đạt Bệnh tiến triển	Không	Không xác định được
Bệnh tiến triển	Bất kỳ	Có hoặc không	Bệnh tiến triển
Bất kỳ	Bệnh tiến triển	Có hoặc không	Bệnh tiến triển
Bất kỳ	Bất kỳ	Có	Bệnh tiến triển

Bảng 2.5. Đánh giá đáp ứng thực thể theo tiêu chuẩn RECIST v1.1 đối với các tổn thương không đo lường được [75]

Tổn thương không đo lường	Tổn thương thứ phát	Đáp ứng
Đáp ứng hoàn toàn	Không	Đáp ứng hoàn toàn
Bệnh giữ nguyên	Không	Bệnh giữ nguyên
Không xác định được	Không	Không xác định được
Bệnh tiến triển	Có hoặc không	Bệnh tiến triển
Bất kỳ	Có	Bệnh tiến triển

Đáp ứng hoàn toàn (CR = Complete Response): các tổn thương biến mất, các dấu ấn ung thư trở về giới hạn bình thường.

Đáp ứng một phần (PR = Partial Response): tổn thương giảm ít nhất 30% tổng đường kính đo lường

Bệnh giữ nguyên (SD = Stable Disease): duy trì tổn thương không đủ điều kiện CR và PD, các dấu ấn ung thư duy trì trên mức giới hạn bình thường.

Bệnh tiến triển (PD = Progressive Disease): tổn thương tiến triển rõ ràng, tăng ít nhất 20% tổng đường kính đo lường (ít nhất 5mm), các dấu ấn ung thư tiếp tục tăng trên mức giới hạn bình thường.

2.3.PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ THỐNG KÊ

- Quản lý, phân tích thông tin và xử lý số liệu trên máy vi tính bằng phần mềm SPSS 21.0. So sánh sự khác biệt giữa các nhóm bằng test Chi bình phương hoặc test Fisher nếu cỡ mẫu nhỏ hơn 5.

- Sử dụng phương pháp Kaplan-Meier để phân tích thời gian sống thêm. Sử dụng test Logrank để so sánh thời gian sống thêm trung bình giữa các nhóm (với $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê).

2.4. DỤNG CỤ, TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT NGHIÊN CỨU

2.4.1. Dụng cụ: vô trùng tuyệt đối (hấp ưót 120°C trong 20 phút)

- Máy hấp vô trùng dụng cụ
- Tủ lạnh sâu (-30°C, -80°C)
- Lò vi sóng
- Máy ly tâm để bàn, máy ly tâm lạnh
- Hệ thống điện di Mupid (Nhật Bản), máng đổ gel, lược tạo giếng.
- Máy soi và chụp ảnh tự động gel agarose đã điện di: Dolphin Chemic Wealtec (USA)
- Máy đo quang phổ (định nồng độ DNA, RNA): Thermo Electron Corporation (Biomate)
- Bồn ủ nhiệt
- Buồng hút
- Máy luân nhiệt Gene Amp PCR System 9700 (USA)
- Máy luân nhiệt định lượng Stratagen MX 3000P
- Máy đọc trình tự gen 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI PRISM)
- Pipettor, pipette tip, polypropylene tube (200µL, 500 µL)

2.4.2. Hóa chất

- *Hóa chất tách chiết DNA từ mô ung thư phổi:*
 - Dung dịch xylene, dung dịch SDS 10%, ethanol 100%,
 - Lysis buffer (50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0,5% Tween20),
 - Dung dịch Proteinase K (nồng độ 1 mg/mL).

- *Hóa chất tách chiết và tinh sạch DNA:*

- Lysis buffer (50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0,5% Tween20),
- Dung dịch SDS 10%,
- Dung dịch Proteinase K (nồng độ 1 mg/mL).
- Dung dịch phenol:chloroform:isoamyl tỷ lệ 25:24:1
- Dung dịch chloroform:isoamyl tỷ lệ 24:1
- Ethanol 100%, ethanol 70%, sodium acetate 3M, pH 5,2

- *Hóa chất chạy PCR (Invitrogen):*

- Dung dịch đệm 10X, hỗn hợp dNTP, Taq polymerase, Mg²⁺, nước cất.
- Các cặp mồi đặc hiệu (xuôi và ngược)

- *Hóa chất điện di sản phẩm PCR:*

- Bột agarose, dung dịch TBE (boric acid EDTA),
- Ethidium bromide, loading dye, thước đo DNA.

- *Hóa chất tinh sạch sản phẩm PCR: Promega Wizard SV gel clean-up system (Promega Inc.)* gồm dung dịch gắn kết màng, dung dịch rửa màng, nước cất không có nuclease.

- *Hóa chất giải trình tự gen: BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* gồm:

- BigDye Terminator v3.0 (dATP, dCTP, dGTP và dUTP), BigDye buffer,
- Cặp mồi đặc hiệu,
- Dung dịch formamide.

- Hóa chất chạy real-time PCR theo công nghệ Scorpion ARMS: EGFR PCR kit và KRAS PCR kit (Qiagen) gồm:

- Dung dịch đệm (có chứa hỗn hợp dNTP), Mg²⁺, nước cất
- Các hỗn hợp đoạn môi Scorpions,
- Taq DNA polymerase.
- Dung dịch chứng

2.5. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự tự nguyện tham gia của các bệnh nhân được chẩn đoán UTPKTBN trên lâm sàng. Xét nghiệm phân tích đột biến gen EGFR chỉ được thực hiện khi có sự đồng ý của bệnh nhân và gia đình bệnh nhân. Nghiên cứu tiến hành theo nguyên tắc đạo đức trong Tuyên bố Helsinki. Các số liệu sử dụng trong luận án đã được thông qua bởi Hội đồng Đạo Đức của Trường Đại học Y Hà Nội.

Xét nghiệm trên mẫu mô đã sử dụng trong chẩn đoán ban đầu UTPKTBN. Trong trường hợp mẫu mô có chất lượng kém không thể xác định đột biến gen, không yêu cầu lặp lại sinh thiết để phục vụ cho nghiên cứu. Trong quá trình thực hiện nghiên cứu, hoàn toàn không can thiệp vào quyết định chẩn đoán và điều trị. Các bệnh nhân sẽ chỉ được ghi nhận các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng của quá trình bệnh diễn tiến. Các thông tin của bệnh nhân cung cấp cho nghiên cứu sẽ được giữ bí mật. Bệnh nhân có thể tự rút lui khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào.

Rủi ro và nguy cơ của nghiên cứu: nguy cơ lớn nhất có thể gặp phải là phản ứng quá mẫn với hóa chất, để đảm bảo tính an toàn, những bệnh nhân có cơ địa dị ứng sẽ không đưa vào nghiên cứu.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ ĐỘ BIẾN GEN EGFR VÀ GEN KRAS

Từ 01/01/2012 đến 30/12/2013 đã có tổng cộng 181 bệnh nhân từ các bệnh viện Hữu Nghị, bệnh viện K Trung Ương, bệnh viện Bạch Mai và bệnh viện Phổi Trung Ương đáp ứng tiêu chuẩn chọn mẫu, được làm xét nghiệm tìm đột biến exon 18-21 gen EGFR và đột biến codon 12-13 exon 2 gen KRAS. Các kết quả thu được như sau:

3.1.1. Kết quả tách chiết DNA từ mẫu mô ung thư

Do chỉ tuyến mộ bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn IIIB/IV mới chẩn đoán, không còn chỉ định phẫu thuật nên tất cả các mẫu mô ung thư trong nghiên cứu đều là những mẫu mô sinh thiết được đúc trong khối nén. Các mẫu DNA sau tách chiết được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang.

Bảng 3.1. Nồng độ và độ tinh sạch của các mẫu DNA

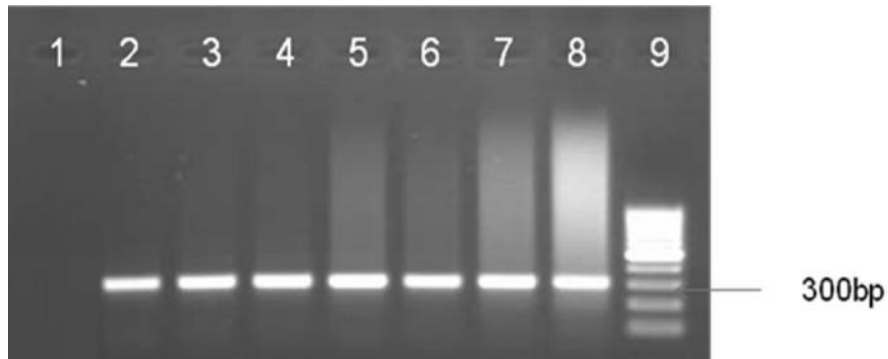
Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/μL)	Độ tinh sạch (A _{260/280})	Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/μL)	Độ tinh sạch (A _{260/280})	Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/μL)	Độ tinh sạch (A _{260/280})
1	2393	1.72	62	3093	1.71	123	4005	1.83
2	3178	1.78	63	2644	1.87	124	3802	1.86
3	2991	1.74	64	1213	1.90	125	1879	1.75
4	1584	1.70	65	1614	1.90	126	2590	1.85
5	3591	1.71	66	1619	1.80	127	2463	1.83
6	1257	1.73	67	2644	1.87	128	2109	1.88
7	4125	1.88	68	1213	1.90	129	2980	1.74
8	1821	1.85	69	1816	1.88	130	3211	1.76
9	4365	1.88	70	1949	1.90	131	3501	1.89

Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/μL)	Độ tinh sạch (A _{260/280})	Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/μL)	Độ tinh sạch (A _{260/280})	Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/μL)	Độ tinh sạch (A _{260/280})
10	2538	1.79	71	4164	1.72	132	1899	1.87
11	2739	1.80	72	2322	1.79	133	3122	1.79
12	4521	1.78	73	1270	1.86	134	2965	1.84
13	4343	1.85	74	2978	1.85	135	1822	1.88
14	3512	1.74	75	1130	1.81	136	1287	1.92
15	4278	1.77	76	1512	1.80	137	3091	1.76
16	2393	1.72	77	2834	1.81	138	2073	1.84
17	3178	1.78	78	4309	1.81	139	1780	1.78
18	2991	1.74	79	4325	1.84	140	4083	1.83
19	1584	1.70	80	2724	1.70	141	2930	1.71
20	3591	1.71	81	3112	1.72	142	2893	1.70
21	1257	1.73	82	1802	1.73	143	3188	1.78
22	4125	1.88	83	4380	1.86	144	2961	1.84
23	1821	1.85	84	2594	1.73	145	2584	1.79
24	4365	1.88	85	1996	1.86	146	3591	1.73
25	2538	1.79	86	4164	1.72	147	1257	1.73
26	2739	1.80	87	2322	1.79	148	2549	1.80
27	4823	1.78	88	1270	1.86	149	4623	1.78
28	4343	1.85	89	3978	1.85	150	2347	1.82
29	3552	1.74	90	1130	1.81	151	3582	1.71
30	4278	1.77	91	1512	1.80	152	4387	1.76
31	3218	1.75	92	2834	1.81	153	3978	1.85
32	4343	1.85	93	4309	1.81	154	2131	1.81
33	3512	1.74	94	4325	1.84	155	2512	1.83
34	4278	1.77	95	2724	1.70	156	2732	1.81
35	2235	1.86	96	3112	1.72	157	4199	1.87
36	2695	1.76	97	1802	1.73	158	1852	1.83
37	4329	1.77	98	4380	1.86	159	2287	1.92
38	2843	1.78	99	2594	1.73	160	3319	1.79
39	4355	1.79	100	1996	1.86	161	2073	1.84
40	3990	1.84	101	2280	1.72	162	2180	1.78
41	3106	1.82	102	2376	1.83	163	1742	1.70
42	3187	1.73	103	1989	1.88	164	3012	1.78
43	3477	1.94	104	3524	1.91	165	1802	1.73

Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/ μ L)	Độ tinh sạch ($A_{260/280}$)	Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/ μ L)	Độ tinh sạch ($A_{260/280}$)	Mã số mẫu	Nồng độ DNA (ng/ μ L)	Độ tinh sạch ($A_{260/280}$)
44	4228	1.93	105	2867	1.70	166	4408	1.86
45	1219	1.72	106	2679	1.75	167	2719	1.73
46	3936	1.81	107	2490	1.86	168	3135	1.85
47	3093	1.71	108	1987	1.80	169	2675	1.71
48	2644	1.87	109	3588	1.77	170	4128	1.70
49	1213	1.90	110	4120	1.82	171	2843	1.77
50	1694	1.90	111	4289	1.89	172	4375	1.79
51	2695	1.76	112	3478	1.74	173	3580	1.84
52	4329	1.77	113	3120	1.77	174	3288	1.73
53	2843	1.78	114	2987	1.71	175	2477	1.94
54	4355	1.79	115	2531	1.85	176	3828	1.93
55	3990	1.84	116	1899	1.90	177	2219	1.72
56	3106	1.82	117	2230	1.76	178	3139	1.81
57	3187	1.73	118	2198	1.80	179	4169	1.89
58	3477	1.94	119	1790	1.79	180	2478	1.74
59	4228	1.93	120	2260	1.82	181	1920	1.77
60	1219	1.72	121	3166	1.78			
61	3936	1.81	122	3578	1.79			

Nhận xét: Kết quả bảng 3.1 cho thấy các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm nằm trong khoảng 1,7÷2,0 khi đo trên máy đo quang phổ ở bước sóng 260/280 nm. Như vậy, những mẫu DNA sau tách chiết đều đảm bảo chất lượng, đủ điều kiện cho các thí nghiệm tiếp theo.

Kiểm tra chất lượng DNA bằng gen nội chuẩn GAPDH: DNA sau tách chiết được tiến hành kiểm tra chất lượng DNA bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu GAPDH và điện di sản phẩm thu được trên gel agarose 1,5%.



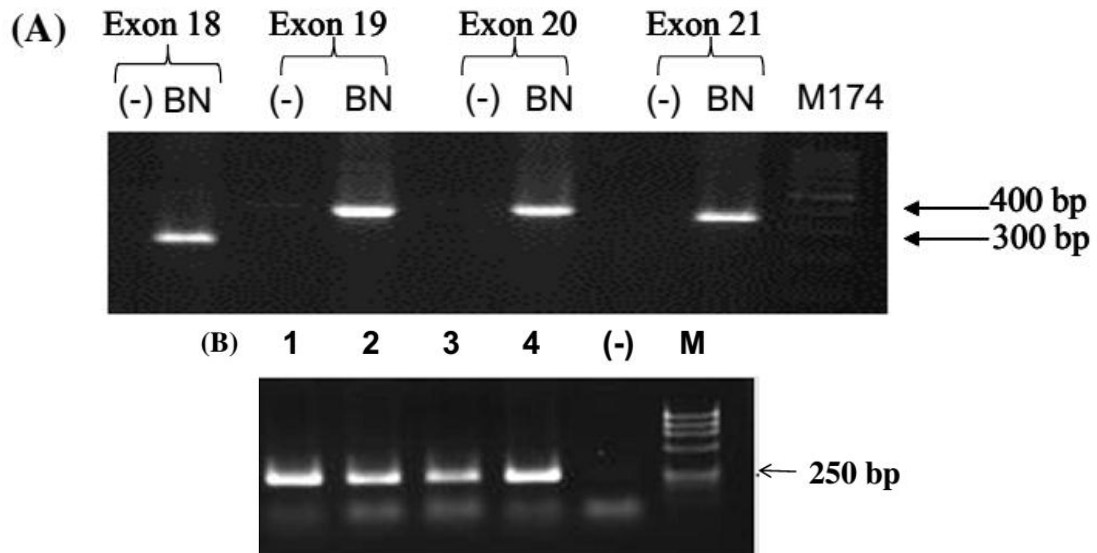
Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sử dụng mồi GAPDH

(Giếng 1: chứng âm, giếng 2-8: sản phẩm PCR của các mẫu DNA khác nhau, giếng 9: marker 100bp)

Nhận xét: Sản phẩm PCR khuếch đại gen GAPDH chỉ một băng 300 bp đặc hiệu, chứng tỏ rằng chất lượng DNA tách chiết từ các mẫu mô ung thư tốt, không bị đứt gãy, đảm bảo đủ tiêu chuẩn cho kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS tiếp theo để xác định đột biến gen.

3.1.2. Kết quả khuếch đại exon 18-21 gen EGFR và exon 2 gen KRAS

Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại các exon 18, 19, 20, 21 của gen EGFR và exon 2 của gen KRAS trên gel agarose 1,5% được trình bày trong hình 3.2.



Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các exon 18, 19, 20 và 21 gen EGFR (A) và exon 2 gen KRAS (B) trên gel agarose

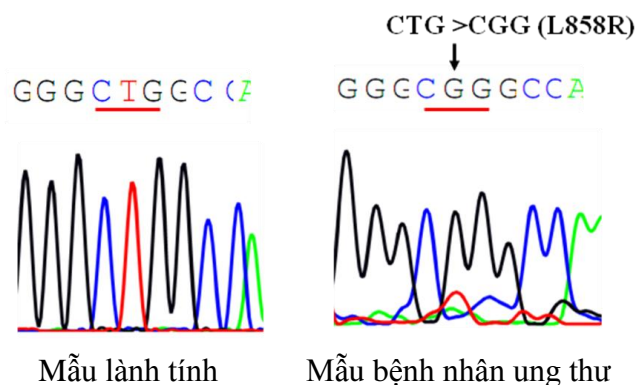
(BN: bệnh nhân; (-): mẫu đối chứng âm; giếng 1-4 (hình B): mẫu bệnh nhân)

Nhận xét: Sản phẩm PCR của quá trình khuếch đại mỗi exon 18-21 gen EGFR và exon 2 gen KRAS cho gồm một băng đặc hiệu (chiều dài sản phẩm khuếch đại của exon 18, 19, 20 và 21 gen EGFR lần lượt là 349 bp, 397 bp, 408 bp và 374 bp; của exon 2 gen KRAS là 250 bp) có độ sáng đồng nhất bờ đều, sắc gọn, không có sản phẩm phụ, đảm bảo đủ tiêu chuẩn cho kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến. Cả hai gen EGFR và KRAS đều sử dụng mẫu đối chứng âm là mẫu nước cất cho kết quả âm tính chứng tỏ không có hiện tượng nhiễm DNA trong phản ứng PCR.

3.1.3. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen

3.1.3.1. Kết quả xác định đột biến gen EGFR

Sử dụng mẫu mô lành tính để đối chiếu so sánh. Kết quả cho thấy đã phát hiện các dạng đột biến khác nhau trên exon 18, 19, 20 và 21 của gen EGFR. Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu phát hiện được 25 trường hợp mang đột biến L858R trong 181 bệnh nhân. Đây là đột biến thay thế một nucleotid xảy ra ở codon 858 thuộc exon 21 gen EGFR. Hình ảnh đột biến này được minh họa trong hình 3.3.

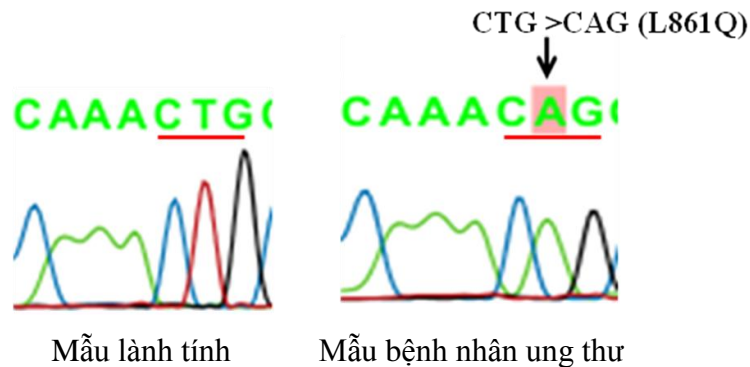


Hình 3.3. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L858R trên exon 21 của gen EGFR (mã số mẫu 110)

Nhận xét: Hình 3.3 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến L858R tại exon 21 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 110) bằng kỹ thuật giải

trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 2537 trên exon 21, xuất hiện thêm một đỉnh T bị biến đổi thành G, làm cho acid amin Leucine (L) tại codon 858 biến đổi thành Arginine (R), gây nên đột biến L858R.

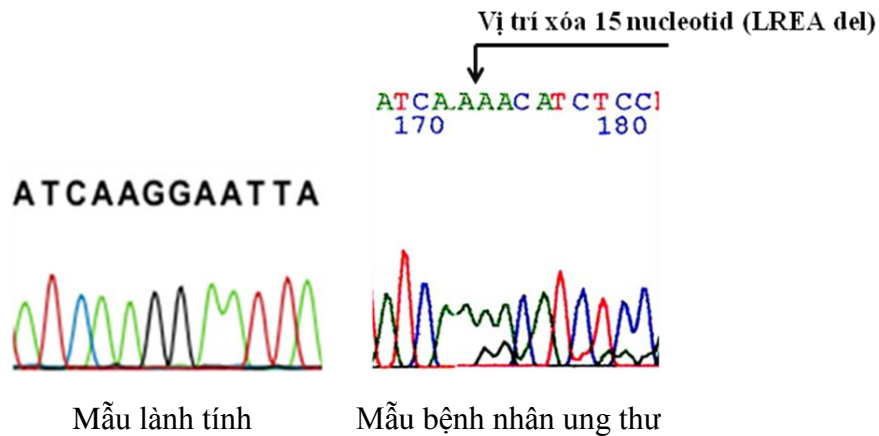
Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu phát hiện được 2 trường hợp mang đột biến L861Q trong 181 bệnh nhân. Đây là đột biến thay thế một nucleotid xảy ra ở codon 861 thuộc exon 21 gen EGFR. Hình ảnh đột biến này được minh họa trong hình 3.4.



Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L861Q trên exon 21 của gen EGFR (mã số mẫu 23)

Nhận xét: Hình 3.4 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến L861Q tại exon 21 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 23) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 2582 trên exon 21, xuất hiện thêm một đỉnh T bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Leucine (L) tại codon 861 biến đổi thành Glutamine (Q), gây nên đột biến L861Q.

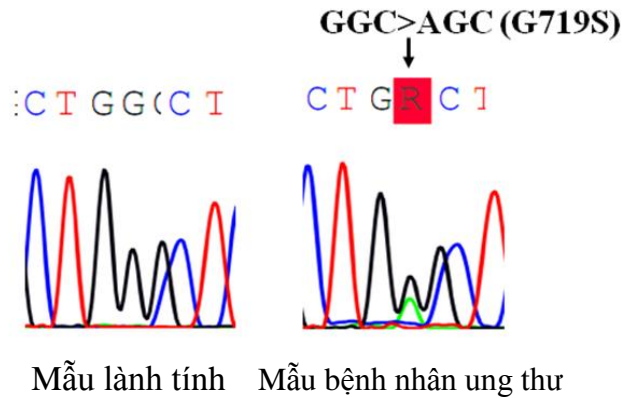
Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu phát hiện được 45 trường hợp mang đột biến LREA trong 181 bệnh nhân. Đây là đột biến xóa đoạn điển hình xảy ra ở exon 19 gen EGFR. Hình ảnh đột biến này được minh họa trong hình 3.5.



Hình 3.5. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 của gen EGFR (mã số mẫu 179)

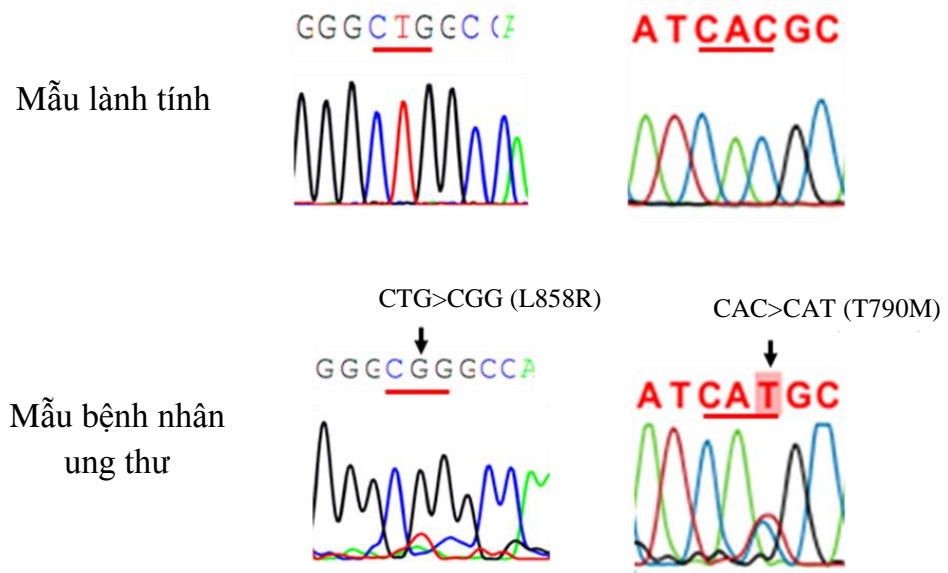
Nhận xét: Hình 3.5 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến xóa đoạn LREA tại exon 19 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 179) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, xuất hiện hiện tượng xóa đoạn 15 nucleotid trên exon 19 (mũi tên chỉ vị trí bắt đầu có đột biến xóa đoạn), làm cho các acid amin acid glutamic(E)-leucine(L)-arginine(R)-acid glutamic(E)-alanine(A) tại các codon 746 đến 750 bị mất, do đó đột biến này có tên là đột biến $\Delta E746-A750$ hay LREA.

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, nghiên cứu phát hiện được các đột biến G719S (exon 18), đột biến T790M đơn độc (exon 20), đột biến đôi T70M (exon 20 + L858R (exon 21) và đột biến đôi S768I + V769L (exon 20). Mỗi loại đột biến trên chỉ có 1 trường hợp trong 181 bệnh nhân. Đây là các đột biến thay thế một nucleotid xảy ra trên gen EGFR. Hình ảnh các đột biến này được minh họa trong hình 3.6, 3.7 và 3.8.



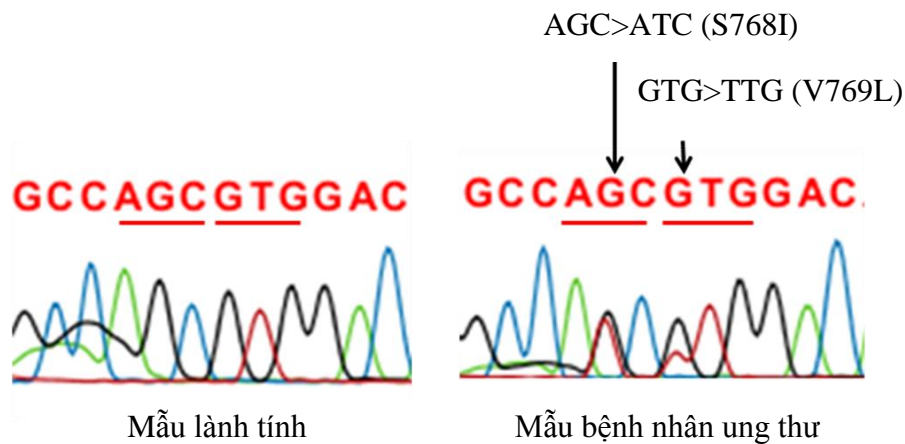
Hình 3.6. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G719S trên exon 18 của gen EGFR (mã số mẫu 102)

Nhận xét: Hình 3.6 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G719S tại exon 18 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 102) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 2155 trên exon 21, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 718 biến đổi thành Serine (S), gây nên đột biến G719S.



Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến T790M trên exon 20 và đột biến L858R trên exon 21 gen EGFR của cùng một bệnh nhân (mã số mẫu 48)

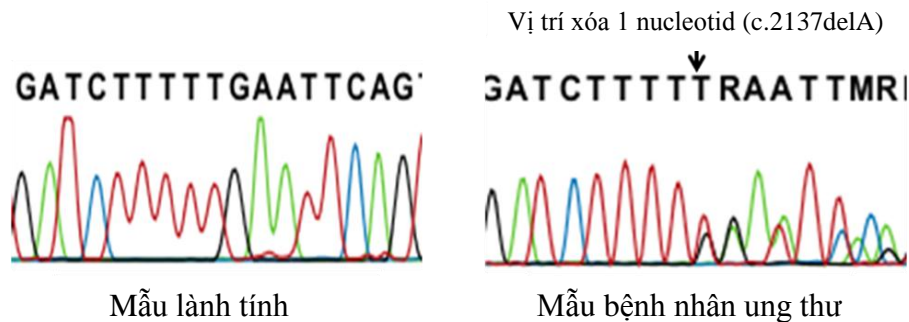
Nhận xét: Hình 3.7 là hình ảnh đại diện cho kết quả phát hiện đồng thời 2 đột biến trên cùng một bệnh nhân (có mã số mẫu 48): đột biến T790M trên exon 20 và đột biến L858R trên exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 2369 trên exon 20, xuất hiện thêm một đỉnh C bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Threonine (T) tại bị biến đổi thành Methionine (M), gây nên đột biến T790M. Đồng thời, tại vị trí nucleotid 2537 trên exon 21, xuất hiện thêm một đỉnh T bị biến đổi thành G, làm cho acid amin Leucine (L) tại codon 858 biến đổi thành Arginine (R), gây nên đột biến L858R.



Hình 3.8. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến S768I và V769L trên exon 20 gen EGFR của cùng một bệnh nhân (mã số mẫu 114)

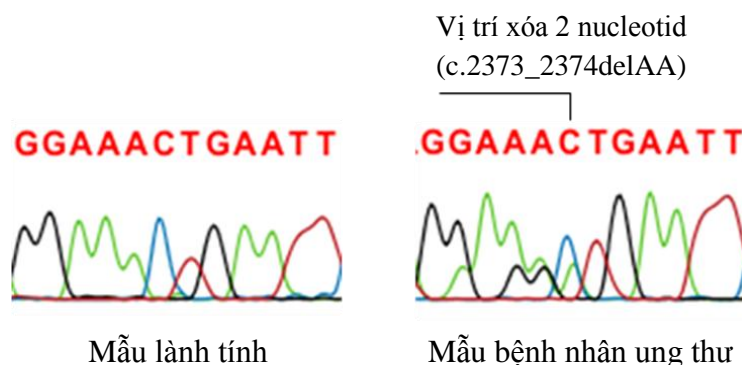
Nhận xét: Hình 3.8 là hình ảnh đại diện cho kết quả phát hiện đồng thời 2 đột biến trên cùng một bệnh nhân (có mã số mẫu 114): đột biến S768I và đột biến V769L exon 20 trên gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 2303 trên exon 20 xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Serine (S) tại codon 768, bị biến đổi thành Isoleucine (I), gây nên đột biến S768I. Đồng thời, tại vị trí nucleotid 2305, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Valine (V) tại codon 769 bị biến thành Leucine (L) gây nên đột biến V769L.

Bên cạnh các đột biến đã biết, kỹ thuật giải trình tự gen đã xác định được 4 đột biến mới, mỗi đột biến chỉ có 1 trường hợp, gồm: đột biến c.2173delA ở exon 18, c.2373_2374delAA ở exon 20, c.2499_2521del23 ở exon 21 và c.2554/2555insACA ở exon 21. Hình ảnh giải trình tự xác định các đột biến này được minh họa ở các hình 3.9 – 3.12.



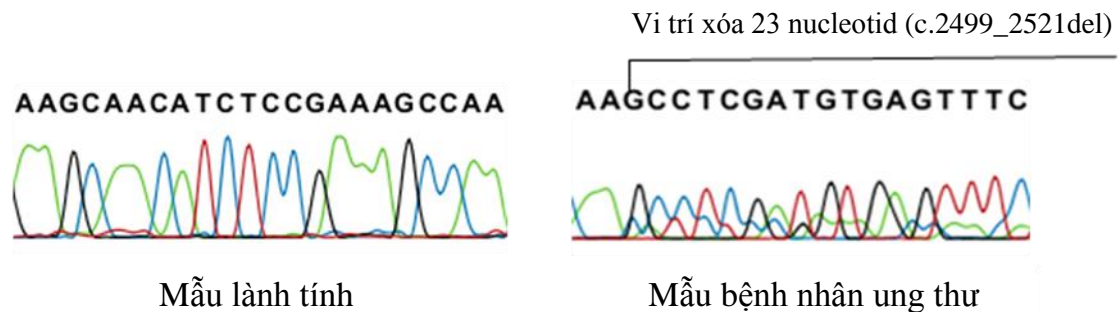
Hình 3.9. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến xóa 1 nucleotid A tại vị trí 2137 (c.2137delA) trên exon 18 của gen EGFR (mã số mẫu 55)

Nhận xét: Hình 3.9 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến xóa 1 nucleotid A trên exon 18 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 55) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, xuất hiện hiện tượng xóa 1 nucleotid A tại vị trí 2137 trên exon 18 của gen EGFR gây nên đột biến c.2137delA.



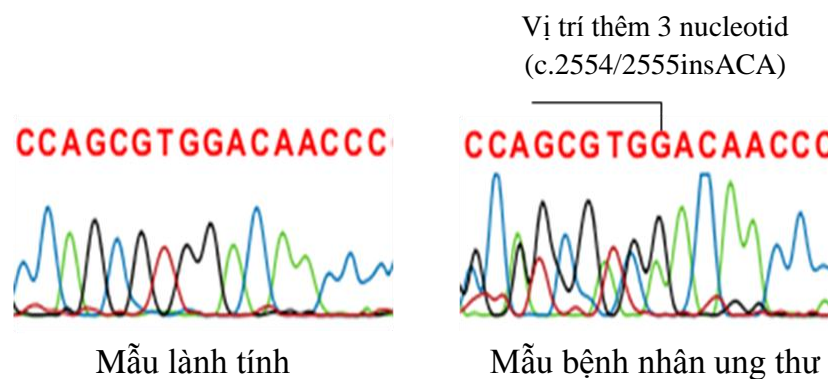
Hình 3.10. Kết quả xác định đột biến xóa 2 nucleotid c.2373_2374delAA exon 20 gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen (mã số mẫu 157)

Nhận xét: Đây là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến xóa hai nucleotid tại exon 20 gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh trình tự DNA lành tính, trên exon 20 DNA bệnh nhân ung thư (có mã số mẫu 157), 2 adenine đã bị xóa tại vị trí nucleotid 2374 và 2374 gây nên đột biến c.2373_2374 delAA.



Hình 3.11. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện biến xóa đoạn c.2499_2521del23 trên exon 21 của gen EGFR (mã số mẫu 79)

Nhận xét: Hình 3.11 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến xóa đoạn 23 nucleotid tại exon 21 của bệnh nhân UTP (có mã số mẫu 79) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, xuất hiện hiện tượng xóa đoạn 23 nucleotid từ vị trí 2499 đến 2521 trên exon 21 (mũi tên chỉ vị trí bắt đầu có đột biến xóa đoạn), gây nên đột biến c.2499_2521del23.

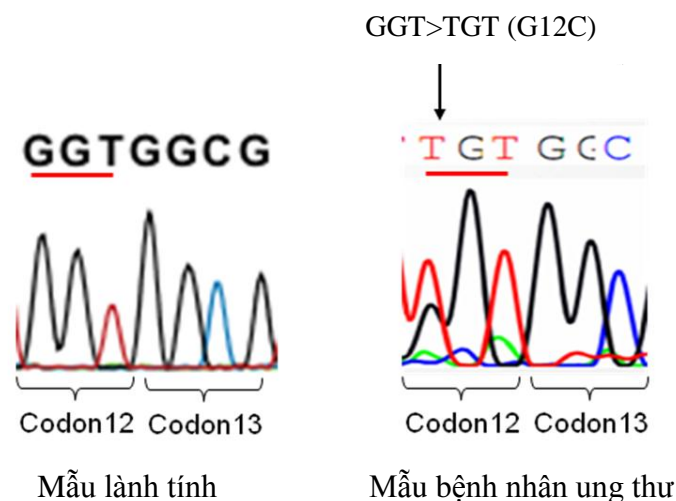


Hình 3.12. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến thêm 3 nucleotid ACA tại vị trí 2554-2555 (c.2554/2555insACA) trên exon 21 của gen EGFR (mã số mẫu 36)

Nhận xét: Hình 3.12 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến thêm 3 nucleotid ACA trên exon 21 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 36) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, xuất hiện hiện tượng thêm 3 nucleotid ACA tại vị trí giữa nucleotid 2554 và 2555 gây nên đột biến c.2554/2555insACA.

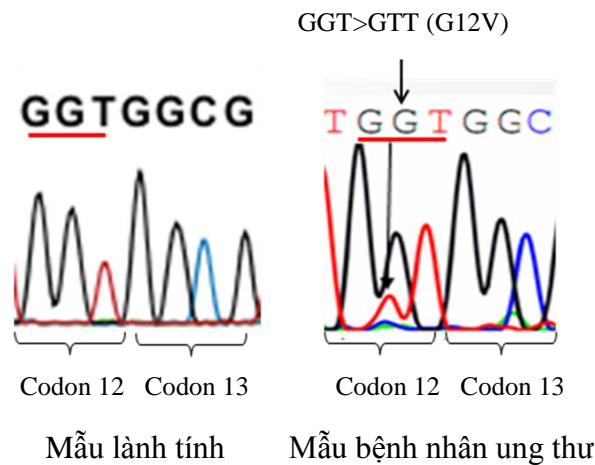
3.1.3.2. Kết quả xác định đột biến gen KRAS

Kết quả giải trình tự gen của của bệnh nhân ung thư luôn được đối chiếu với trình tự của gen KRAS lành tính để giúp phát hiện đột biến. Tỷ lệ chi tiết các loại đột biến gen KRAS được liệt kê trong bảng 3.8. Hình 3.13-3.18 là hình ảnh đại diện các loại đột biến của exon 2 trên gen KRAS trong nghiên cứu được phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự gen:



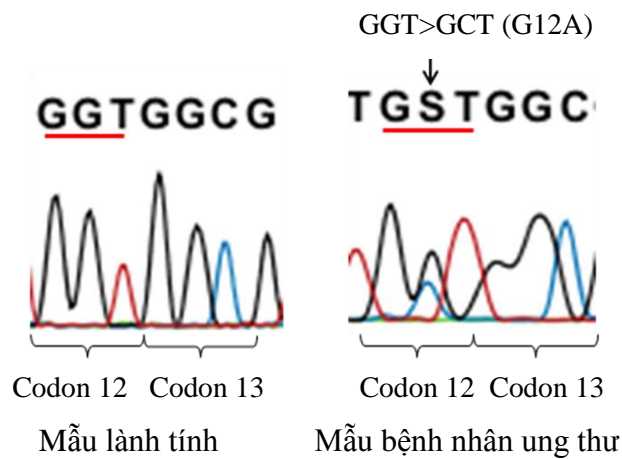
Hình 3.13. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12C trên exon 2 của gen KRAS (mã số mẫu 168)

Nhận xét: Hình 3.13 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12C tại exon 2 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu 168) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 34 trên exon 2, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 12 biến đổi thành Cystein (C), gây nên đột biến G12C.



Hình 3.14. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12V trên exon 2 của gen KRAS (mã số mẫu 16)

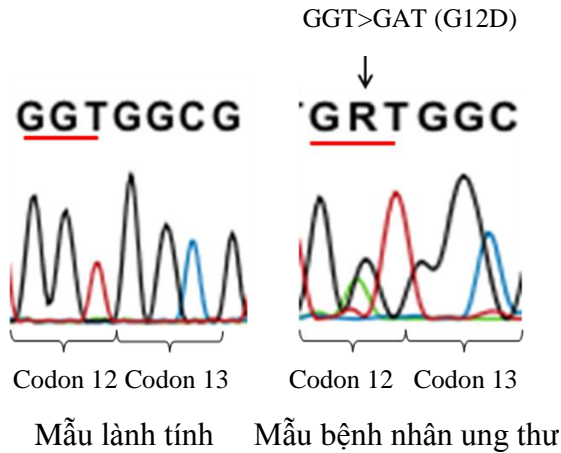
Nhận xét: Hình 3.14 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12V tại exon 2 của bệnh nhân UTP (có mã số mẫu 16) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 35 trên exon 2, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 12 biến đổi thành Valine (V), gây nên đột biến G12V.



Hình 3.15. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12A trên exon 2 của gen KRAS (mã số mẫu 85)

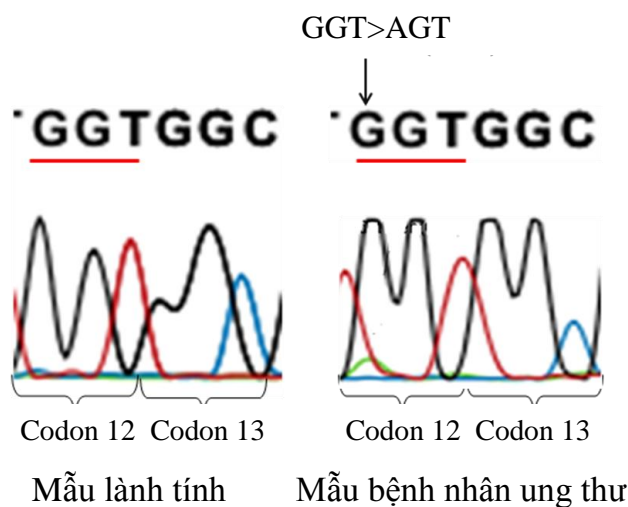
Nhận xét: Hình 3.15 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12A tại exon 2 của bệnh nhân UTP (có mã số mẫu 85) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 35 trên exon 2, xuất

hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành C, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 12 biến đổi thành alanine (A), gây nên đột biến G12A.



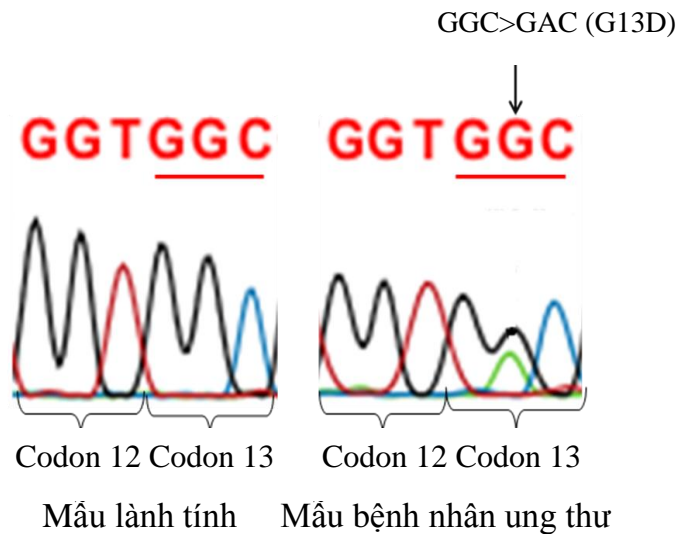
Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12D trên exon 2 của gen KRAS (mã số mẫu 147)

Nhận xét: Hình 3.16 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12D tại exon 2 của bệnh nhân UTP (có mã số mẫu 147) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 35 trên exon 2, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 12 biến đổi thành acid aspartic (D), gây nên đột biến G12D.



Hình 3.17. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12S trên exon 2 của gen KRAS (mã số mẫu 93)

Nhận xét: Hình 3.17 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G12S tại exon 2 của bệnh nhân UTP (có mã số mẫu 93) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 34 trên exon 2, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 12 biến đổi Serine (S), gây nên đột biến G12S.



Hình 3.18. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G13D trên exon 2 của gen KRAS (mã số mẫu 79)

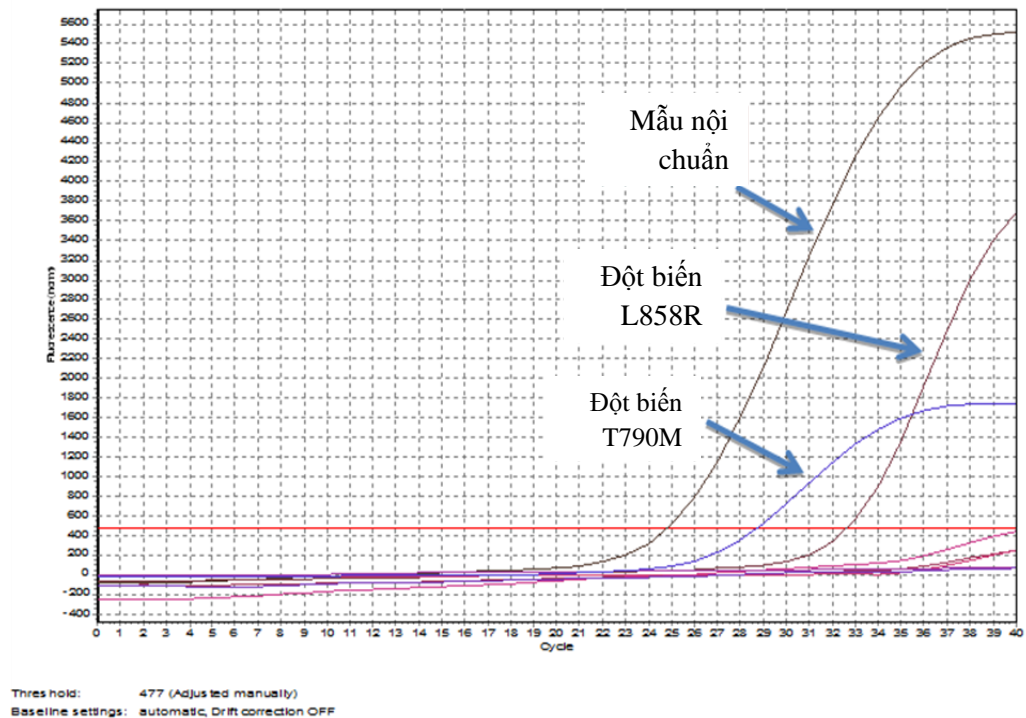
Nhận xét: Hình 3.18 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến G13D tại exon 2 của bệnh nhân UTP (có mã số mẫu 79) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự DNA lành tính, tại vị trí nucleotid 38 trên exon 2, xuất hiện thêm một đỉnh G bị biến đổi thành A, làm cho acid amin Glycine (G) tại codon 12 biến đổi thành acid aspartatic (D), gây nên đột biến G13D.

Hình ảnh trình tự ở các hình từ 3.3 đến 3.18 cho thấy các đỉnh tín hiệu không bị nhiễu, chứng tỏ các quy trình kỹ thuật đạt yêu cầu (khuếch đại các exon gen EGFR và gen KRAS, tinh sạch sản phẩm PCR từ gel...), sản phẩm thu được từ mỗi giai đoạn đều tinh khiết, không lẫn sản phẩm phụ.

3.1.4. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

3.1.4.1. Kết quả xác định đột biến gen EGFR

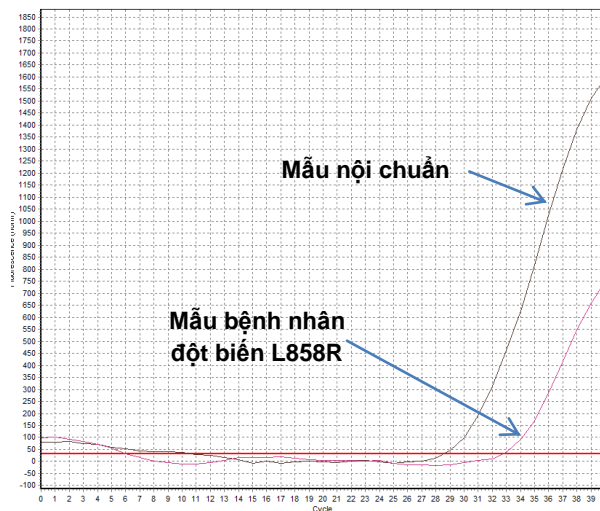
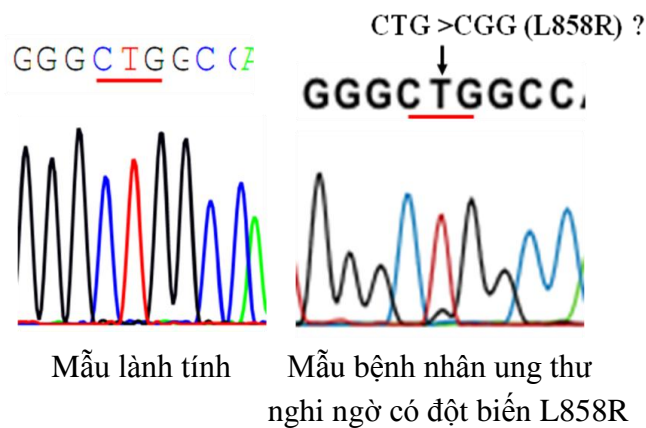
Bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, nghiên cứu đã xác định được 51 trường hợp đột biến LREA (exon 19), 43 trường hợp đột biến L858R (exon 21), 4 trường hợp đột biến L861Q (exon 21), còn lại là các đột biến khác. Tỷ lệ chi tiết các loại đột biến gen EGFR được trình bày trong bảng 3.2.



Hình 3.19. Hình ảnh phát hiện đột biến L858R (exon 21) + T790M (exon 20) gen EGFR của cùng một bệnh nhân (mã số mẫu 48) bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

Nhận xét: Kết quả hình 3.19 cho thấy xuất hiện đường cong tín hiệu tương ứng với đột biến L858R và T790M chứng tỏ mẫu DNA ung thư của bệnh nhân này (có mã số mẫu 48) mang cả hai loại đột biến trên.

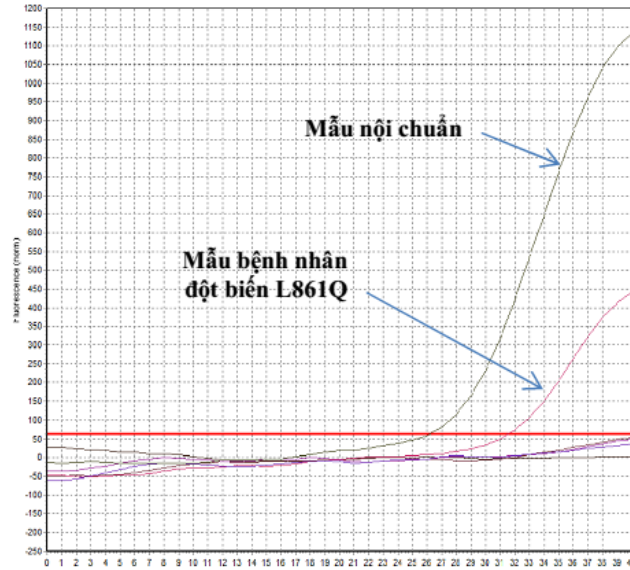
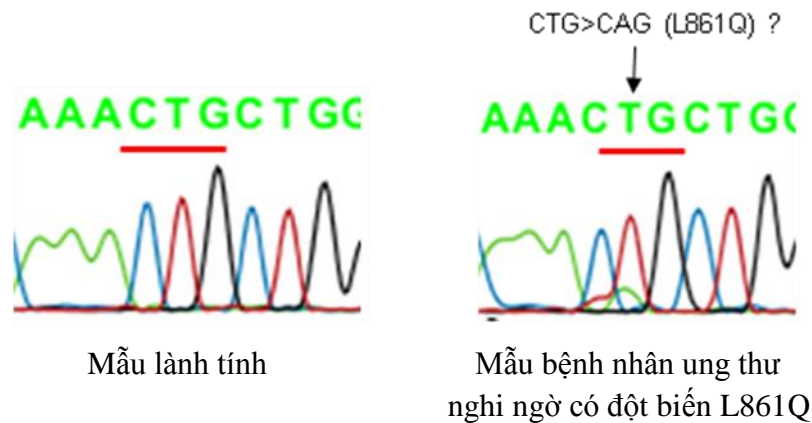
Với một số mẫu DNA mà kỹ thuật giải trình tự gen cho kết quả còn nghi ngờ, kỹ thuật Scorpion ARMS giúp khẳng định đột biến, ví dụ như trong trường hợp các mẫu có mã số 33, 141 và 08, được thể hiện qua hình 3.20 - 3.22. Tuy nhiên, cũng có trường hợp kỹ thuật Scorpion ARMS không xác định đủ đột biến như kỹ thuật giải trình tự gen (trường hợp mẫu có mã số 114, được thể hiện qua hình 3.23).



Hình 3.20. Hình ảnh kết quả đột biến L858R exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu 33)

Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 33), khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, trên exon 21 của gen EGFR, tại vị trí nucleotid T ở codon 858, xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương ứng với nucleotid G. Tuy

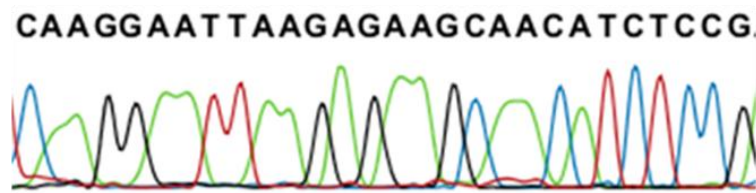
nhiên, đỉnh tín hiệu này thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến L858R ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu của hình ảnh giải trình tự gen. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của đột biến L858R bên cạnh đường cong tín hiệu của mẫu nội chuẩn. Như vậy, có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến L858R exon 21 gen EGFR.



Hình 3.21. Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến L861Q trên exon 21 của gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu 141)

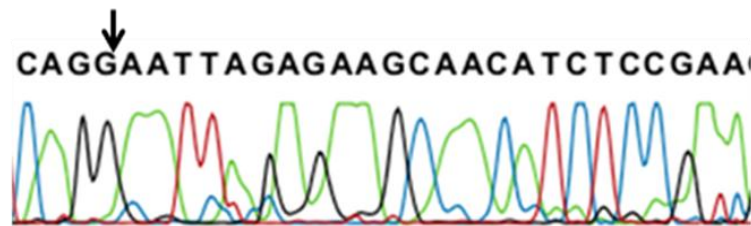
Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 141), khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, trên exon 21 gen EGFR, tại vị trí nucleotid T ở codon 861, xuất

hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương ứng với nucleotid C. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến L861Q ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu của hình ảnh giải trình tự gen. Khi phân tích bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của đột biến L861R bên cạnh đường cong tín hiệu của mẫu nội chuẩn. Như vậy có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến L861Q exon 21 gen EGFR.

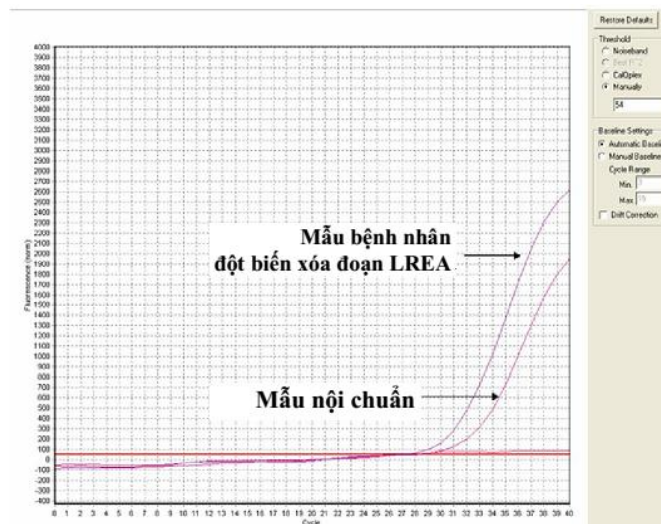


Mẫu lành tính

Vị trí nghi ngờ bắt đầu có đột biến xóa đoạn

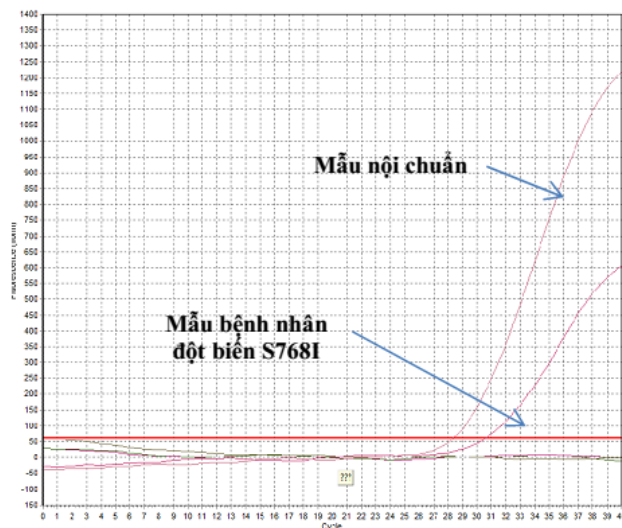
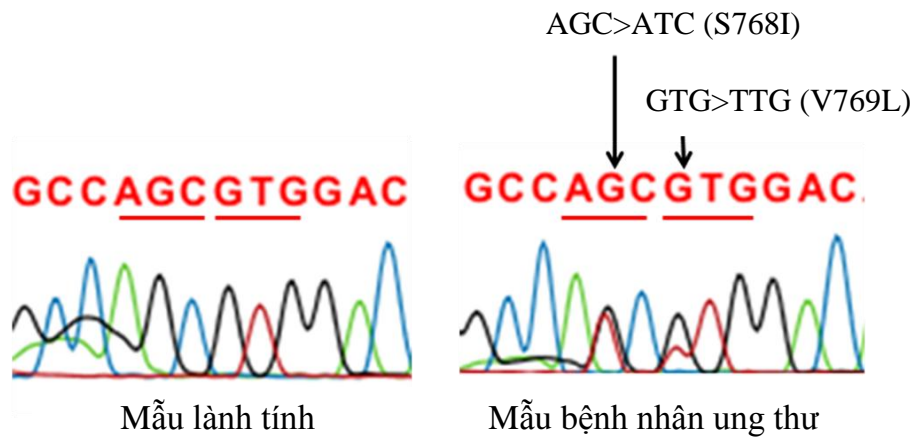


Mẫu bệnh nhân ung thư nghi ngờ có đột biến xóa đoạn LREA



Hình 3.22. Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến LREA trên exon 19 của gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu 08)

Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 08), khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, trên exon 19 của gen EGFR, từ vị trí codon 746 bắt đầu xuất hiện hiện tượng các đỉnh tín hiệu bị nhiễu dạng chồng lấp, với chiều cao các đỉnh tín hiệu thấp, dẫn đến nghi ngờ xuất hiện đột biến xóa đoạn hoặc là hiện tượng nhiễu của tín hiệu nền. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của đột biến LREA bên cạnh đường cong tín hiệu của mẫu nội chuẩn. Như vậy có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến xóa đoạn LREA exon 19 gen EGFR.



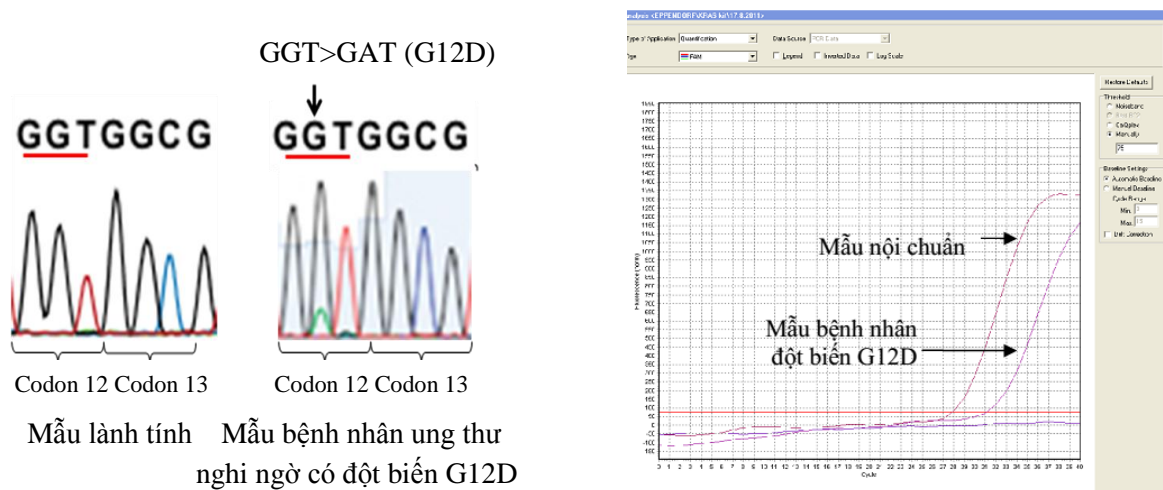
Hình 3.23. Hình ảnh xác định đột biến S768I và V769L exon 20 trên cùng bệnh nhân bằng kỹ thuật giải trình tự gen (trên) và Scorpion ARMS (dưới) (mã số mẫu 114)

Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 114), kỹ thuật giải trình tự gen đã xác định bệnh nhân mang đồng thời 2 đột biến điểm trên exon 20 là đột biến S768I và V769L. Khi xác định đột biến bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, do thiết kế mồi của kit EGFR chỉ có cặp mồi phát hiện đột biến S768I mà không có cặp mồi phát hiện đột biến V769L nên phản ứng real-time PCR chỉ có thể phát hiện được một đột biến S768I trên DNA bệnh nhân.

3.1.4.2. Kết quả xác định đột biến gen KRAS

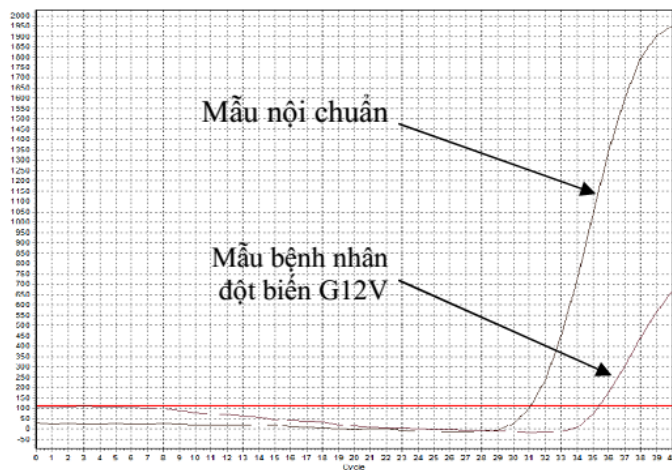
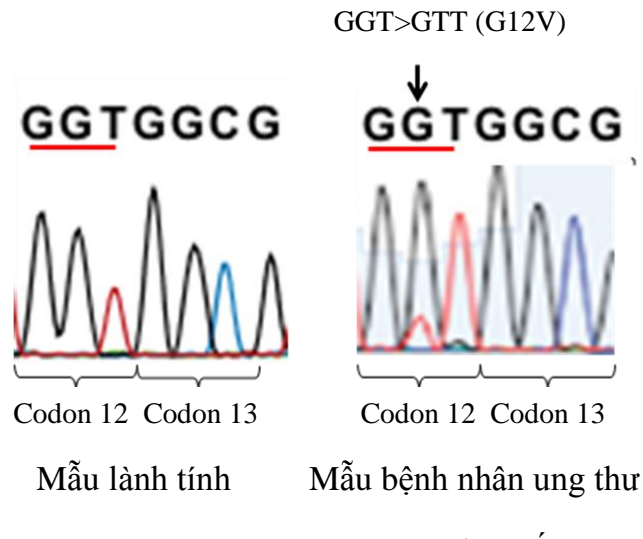
Tương tự như đột biến gen EGFR, bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, nghiên cứu cũng xác định được các đột biến tại exon 2 gen KRAS với số lượng nhiều hơn khi làm bằng kỹ thuật giải trình tự. Tỷ lệ chi tiết các loại đột biến gen KRAS được liệt kê trong bảng 3.6.

Với một số mẫu DNA mà kỹ thuật giải trình tự gen cho kết quả còn nghi ngờ, kỹ thuật Scorpion ARMS cũng giúp khẳng định đột biến, ví dụ như trong trường hợp các mẫu có mã số 15, 132 và 181, được thể hiện qua hình 3.24 - 3.26.



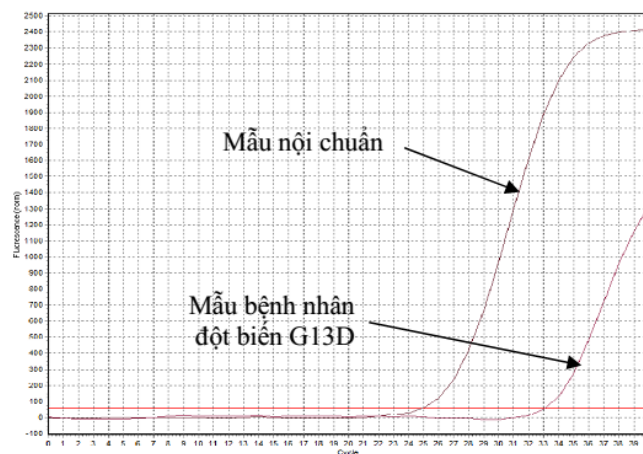
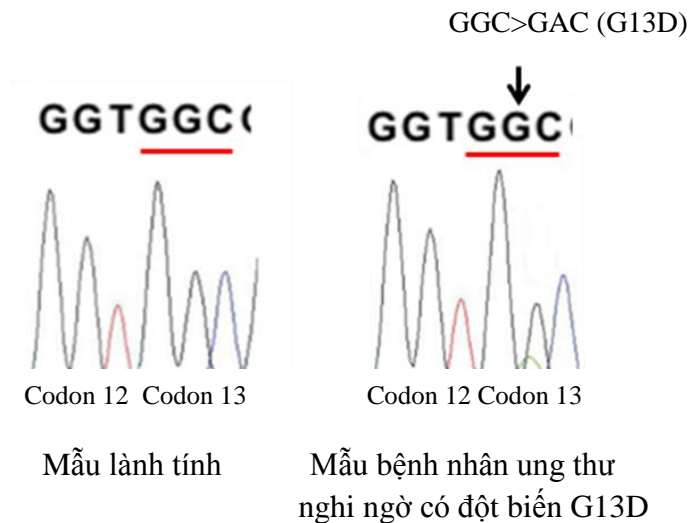
Hình 3.24. Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến G12D (codon 12) của gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu 15)

Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 15), khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, tại vị trí nucleotid 35 tương ứng nucleotid G, codon 12 của gen KRAS xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương ứng với nucleotid A. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này rất thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến G12D ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu của hình ảnh giải trình tự gen. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của đột biến G12D bên cạnh đường cong tín hiệu của mẫu nội chuẩn. Như vậy có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến G12D exon 2 gen KRAS



Hình 3.25. Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến G12V (codon 12) gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu 132)

Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 132), khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, tại vị trí nucleotid 35 tương ứng với nucleotid G, codon 12 của gen KRAS, xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương ứng với nucleotid T. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này rất thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến G12V ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu của hình ảnh giải trình tự gen. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của đột biến G12V bên cạnh đường cong tín hiệu của mẫu nội chuẩn. Như vậy, có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến G12V exon 2 gen KRAS.



Hình 3.26. Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến G13D (codon 13) của gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu 181)

Nhận xét: Ở mẫu DNA này (mã số 181), khi xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen, tại codon 13 gen KRAS, tại vị trí nucleotid 38 là vị trí nucleotid G xuất hiện thêm một đỉnh tín hiệu tương ứng với nucleotid A. Tuy nhiên, đỉnh tín hiệu này rất thấp, dẫn đến nghi ngờ đây là đột biến G13D ở mẫu mô có nồng độ DNA ung thư thấp hoặc chỉ là tín hiệu nhiễu khi thực hiện kỹ thuật. Khi phân tích mẫu DNA này bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, xuất hiện đường cong tín hiệu của cặp mồi đột biến G13D bên cạnh đường cong tín hiệu của cặp mồi trong mẫu chứng. Như vậy, có thể khẳng định đây là một mẫu DNA mang đột biến G13D exon 2 gen KRAS.

3.1.5. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen

3.1.5.1. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR

Khi thực hiện hai kỹ thuật giải trình tự gen và kỹ thuật Scorpion ARMS để xác định đột biến exon 18, 19, 20 và 21 gen EGFR trên 181 mẫu mô UTPKTBN, đã xác định được các dạng và tỷ lệ đột biến khác nhau. Các dạng đột biến phát hiện được cũng có sự khác biệt khi làm bằng các kỹ thuật khác nhau (Bảng 3.2). Nghiên cứu phát hiện được 4 loại đột biến mới chưa công bố gồm đột biến c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) và c.2554/2555insACA (exon 21); 3 loại đột biến kháng thuốc EGFR TKIs, gồm: đột biến T790M (exon 20), đột biến S768I + V769L (exon 20) và đột biến T790M (exon 20) + L858R (exon 21). Các đột biến còn lại đã được công bố là đột biến nhạy cảm với thuốc điều trị đích. Hầu hết các bệnh nhân đều mang 1 loại đột biến, chỉ có 2 bệnh nhân mang đột biến đôi. Phân bố các loại đột biến theo exon của gen EGFR được trình bày trên bảng 3.3.

Bảng 3.2. Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR

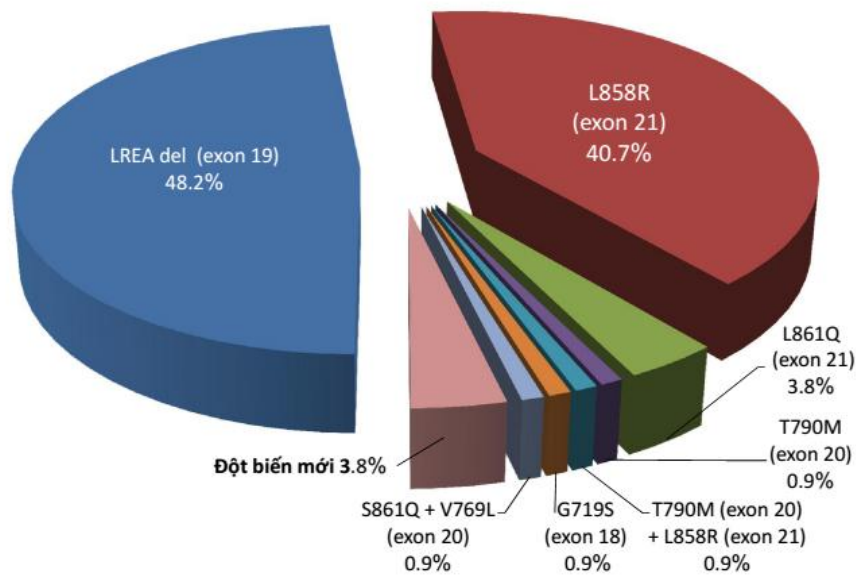
Loại đột biến	Kỹ thuật giải trình tự	Kỹ thuật Scorpion ARMS	Tổng hợp 2 kỹ thuật
G719S (exon 18)	1	1	1 (0,9%)
c.2137 delA (exon 18)	1	0	1 (0,9%)
LREA (exon 19)	45	51	51 (48,2%)
T790M (exon 20)	1	1	1 (0,9%)
S768I + V769L (exon 20)	1	0	1 (0,9%)
c.2373_2374 delAA (exon 20)	1	0	1 (0,9%)
L858R (exon 21)	25	43	43 (40,7%)
L861Q (exon 21)	2	4	4 (3,8%)
c.2499_2521del23 (exon 21)	1	0	1 (0,9%)
c.2554/2555insACA (exon 21)	1	0	1 (0,9%)
T790M (exon 20)+L858R (exon 21)	1	1	1 (0,9%)
Tổng số đột biến	80	101	106 (100%)
Tỷ lệ đột biến	80/181=44,2%	101/181=55,8%	106/181=58,6%

Nhận xét:

- Sử dụng kỹ thuật Scorpion ARMS đã giúp phát hiện được 101/181(55,8%) bệnh nhân mang đột biến, trong khi chỉ phát hiện được 80/181 (44,2%) bệnh nhân mang đột biến khi làm bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Tuy nhiên, bằng kỹ thuật giải trình tự gen đã phát hiện được 4 bệnh nhân mang đột biến mới mà kỹ thuật Scorpion ARMS không phát hiện được. Như vậy, sử dụng cả hai kỹ thuật này giúp phát hiện tổng cộng 106 bệnh nhân đột biến gen EGFR trên 181 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 58,6%.

- Trong số những trường hợp mang đột biến, loại đột biến LREA exon 19 chiếm tỷ lệ cao nhất (48,2%), sau đó đến đột biến L858R (40,7%). Tỷ lệ phát hiện đột biến LREA, L858R và L861Q bằng kỹ thuật giải trình tự gen thấp hơn kỹ thuật Scorpion ARMS (số trường hợp bị bỏ sót lần lượt là 6, 18

và 2 trường hợp). Tuy nhiên, kỹ thuật Scorpion ARMS không phát hiện được 4 loại đột biến mới là c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) và c.2554/2555insACA (exon 21). Bên cạnh đó, trường hợp mang đột biến đôi S768I + V769L (exon 20) chỉ được phát hiện đầy đủ bằng kỹ thuật giải trình tự, kỹ thuật Scorpion ARMS chỉ phát hiện được đột biến S768I, không phát hiện được đột biến V769L.



Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR trong nghiên cứu

Bảng 3.3. Tỷ lệ phân bố đột biến theo exon trên gen EGFR

Exon bị đột biến	Tỷ lệ
Exon 18	2 (1,9%)
Exon 19	51 (48,2%)
Exon 20	3 (2,8%)
Exon 21	49 (46,2%)
Exon 20 + exon 21	1 (0,9%)
Tổng số đột biến	106 (100%)

Nhận xét: Đột biến tại exon 19 và 21 chiếm đa số với tỷ lệ lần lượt là 48,2% và 46,2%. Đột biến tại exon 18 hiếm nhất với chỉ 2 đột biến, chiếm tỷ lệ 1,9%. Có 3 trường hợp mang đột biến tại exon 20, chiếm tỷ lệ 2,8%. Đột biến đôi trên exon 20 và exon 21 có 1 trường hợp (0,9%).

Bảng 3.4. Tỷ lệ bệnh nhân theo số lượng đột biến/bệnh nhân

Bệnh nhân	Số lượng (Tỷ lệ)
Mang 1 đột biến gen EGFR	104 (98,1%)
Mang 2 đột biến gen EGFR	2 (1,9%)
Tổng số	106 (100%)

Nhận xét: Chiếm đa số trường hợp là các đột biến đơn độc (98,1%), chỉ có 2 trường hợp mang đột biến đôi (1,9%).

Bảng 3.5. Tỷ lệ đột biến theo tính đáp ứng thuốc EGFR TKIs

Đột biến đã biết	Số lượng (Tỷ lệ)
Tăng tính nhạy cảm thuốc	99 (97,0%)
Kháng thuốc	3 (3,0%)
Tổng số	102 (100%)

Nhận xét: Trong 106 đột biến được phát hiện trong nghiên cứu có 4 đột biến mới chưa được công bố là có đáp ứng với thuốc EGFR TKIs dạng phân tử nhỏ như erlotinib, gefitinib hay không. Trong 102 đột biến còn lại, đột biến gây kháng thuốc chỉ chiếm 3 trường hợp (3,0%) gồm đột biến T790M, T790M+L858R, S768I+V769L, so với đột biến tăng tính nhạy cảm với thuốc là 97,0%.

3.1.6.2. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen KRAS

Thực hiện hai kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS để phát hiện đột biến exon 2 gen KRAS trên 181 mẫu mô UTPKTBN, đã xác định được các dạng và các tỷ lệ đột biến khác nhau. Các loại đột biến tìm được được liệt kê trong bảng 3.6. Tất cả các dạng đột biến tại codon 12 và codon 13 trên exon 2 của gen KRAS đều là đột biến gây kháng thuốc EGFR TKIs. Tất cả các trường hợp chỉ mang 1 đột biến. Phân bố đột biến theo codon ở exon 2 trên gen KRAS được trình bày tại bảng 3.7.

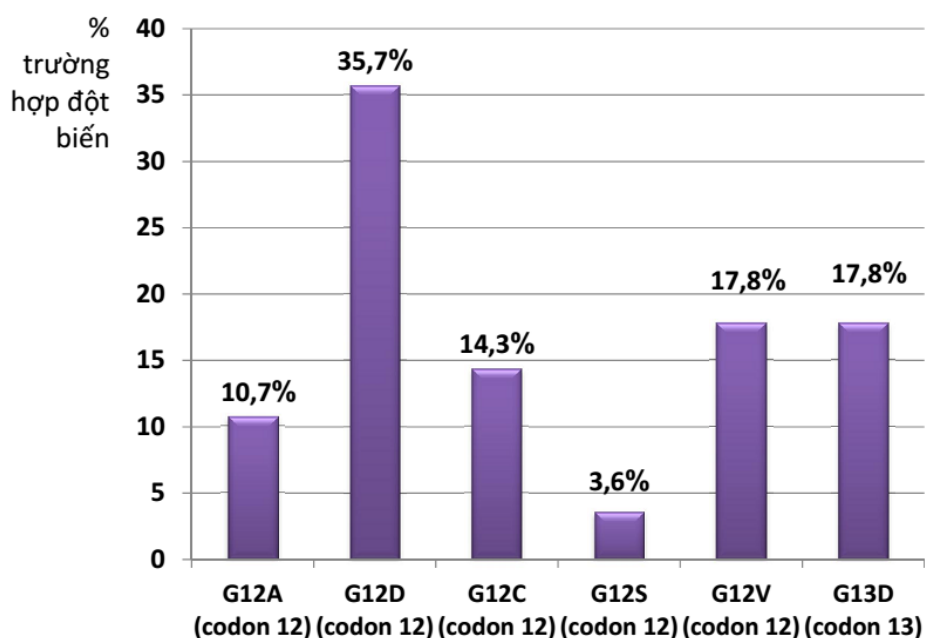
Bảng 3.6. Tỷ lệ các loại đột biến gen KRAS

Loại đột biến	Kỹ thuật giải trình tự gen	Kỹ thuật Scorpion ARMS	Tổng hợp 2 kỹ thuật
G12A (codon 12)	2	3	3 (10,7%)
G12D (codon 12)	9	10	10 (35,7%)
G12C (codon 12)	2	4	4 (14,3%)
G12S (codon 12)	1	1	1 (3,6%)
G12V (codon 12)	5	5	5 (17,8%)
G13D (codon 13)	4	5	5 (17,8%)
Tổng số đột biến	23	28	28 (100%)
Tỷ lệ đột biến	23/181 = 12,7%	28/181 = 15,5%	28/181 = 15,5%

Nhận xét:

- Sử dụng kỹ thuật Scorpion ARMS giúp phát hiện được 28/181 bệnh nhân mang đột biến (15,5%) trong khi số lượng này là 23/181 bệnh nhân khi làm bằng kỹ thuật giải trình tự gen (12,7%). Không phát hiện được trường hợp nào mang đột biến mới. Như vậy, sử dụng hai kỹ thuật này giúp phát hiện tổng cộng 28 bệnh nhân đột biến gen KRAS trên 181 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 15,5%.

- Trong số những trường hợp mang đột biến, loại đột biến G12D (codon 12) chiếm tỷ lệ cao nhất (35,7%), tiếp đó đến đột biến G13D và G12V (17,8%). Đột biến G12S (codon 12) chiếm tỷ lệ thấp nhất (3,6%). Tỷ lệ phát hiện các đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự thấp hơn kỹ thuật Scorpion ARMS. Không có trường hợp nào bị bỏ sót khi làm bằng kỹ thuật Scorpion ARMS. Không phát hiện đột biến nào mới chưa công bố hoặc đột biến ngoài codon 12, codon 13. Không có trường hợp nào mang cùng lúc 2 đột biến gen KRAS.



Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ các loại đột biến gen KRAS trong nghiên cứu

Bảng 3.7. Tỷ lệ phân bố đột biến gen KRAS theo codon tại exon 2

Codon bị đột biến	Tỷ lệ
Codon 12	23 (82,2%)
Codon 13	5 (17,8%)
Tổng số đột biến	28 (100%)

Nhận xét: Đột biến tại codon 12 chiếm đa số với tỷ lệ 82,2%, cao gấp 4,6 lần đột biến tại codon 13 (17,8%).

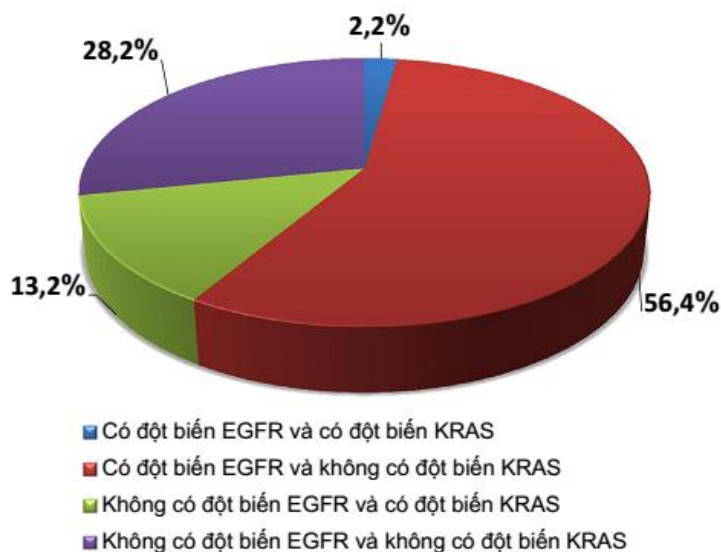
3.1.6.3. Kết quả đột biến cả hai gen EGFR và KRAS

Kết hợp kết quả xác định đột biến của gen EGFR và KRAS giúp xác định tình trạng đột biến các gen ảnh hưởng đến tính nhạy cảm với EGFR TKIs chiếm tỷ lệ cao trong UTPKTBN như sau:

Bảng 3.8. Phân bố tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS

Tình trạng đột biến	Có đột biến gen EGFR	Không có đột biến gen EGFR	Tổng
Có đột biến gen KRAS	4 (2,2%)	24 (13,2%)	28 (15,5%)
Không có đột biến gen KRAS	102 (56,4%)	51 (28,2%)	153 (84,5%)
Tổng	106 (58,6%)	75 (41,4%)	181 (100%)

Nhận xét: Trong 181 bệnh nhân, chiếm đa số (56,4%) là trường hợp có đột biến gen EGFR nhưng không có đột biến gen KRAS. 4/181 trường hợp vừa mang đột biến gen EGFR, vừa mang đột biến gen KRAS (2,2%). Tình trạng đột biến chi tiết của 4 bệnh nhân này liệt kê trong bảng 3.9.

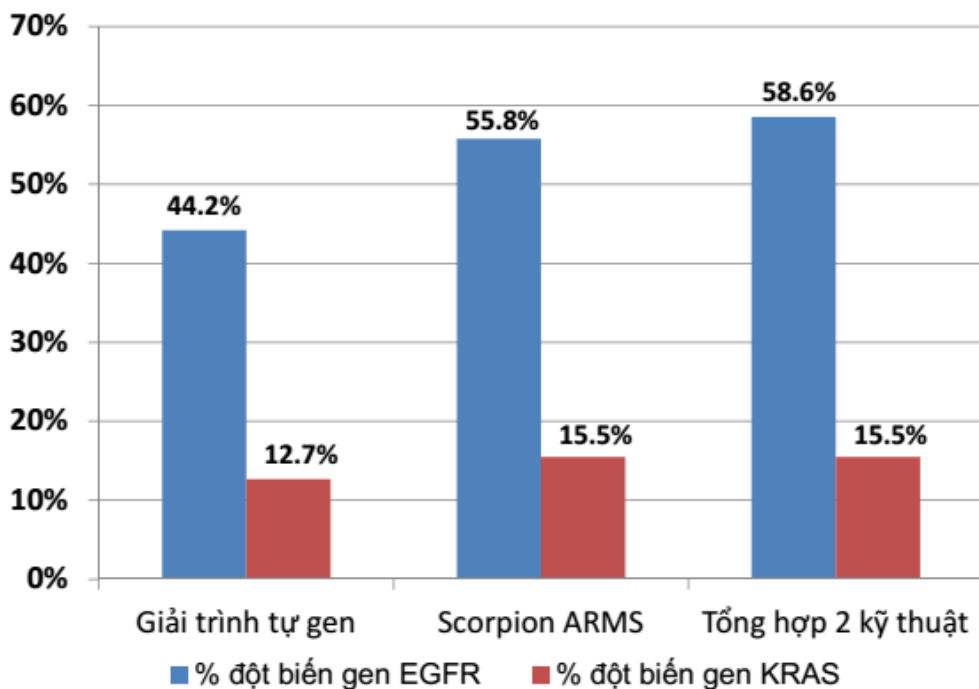


Biểu đồ 3.3. Phân bố tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS

Bảng 3.9. Tình trạng đột biến gen của các bệnh nhân mang đột biến cả 2 gen

Bệnh nhân (mã số mẫu)	Đột biến gen EGFR	Đột biến gen KRAS
16	L858R (exon 21)	G12V
79	c.2499_2521del23 (exon 21)	G13D
147	L861Q (exon 21)	G12D
168	LREA (exon 19)	G12C

Nhận xét: Trong 4 bệnh nhân trên, chỉ có 3 bệnh nhân (mã số mẫu 16, 147 và 168) mang các đột biến gen EGFR đã được công bố làm tăng tính nhạy cảm EGFR TKIs. Riêng bệnh nhân mã số 79 mang một đột biến xóa đoạn không điển hình exon 19 chưa được báo cáo trong cơ sở dữ liệu COSMIC, nên ý nghĩa lâm sàng vẫn chưa rõ.

**Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS trong nghiên cứu**

3.2. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ

Sau khi được xét nghiệm xác định đột biến gen, trong tổng số 181 bệnh nhân, có 28 bệnh nhân có đột biến exon 2 gen KRAS; 75 bệnh nhân không có đột biến gen EGFR; 3 bệnh nhân có đột biến gen EGFR gây kháng thuốc điều trị đích; 3 bệnh nhân có đột biến gen EGFR mới, chưa rõ đáp ứng với thuốc điều trị đích (1 bệnh nhân mang đột biến gen EGFR mới cũng đồng thời có đột biến trên gen KRAS, bảng 3.9.). Như vậy, theo sơ đồ 2.1. và tiêu chuẩn chọn mẫu cũng như tiêu chuẩn loại trừ mẫu nghiên cứu, còn lại 72 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn tham gia vào quá trình đánh giá hiệu quả điều trị erlotinib bước 1. Tuy nhiên, do một số yếu tố khách quan như lý do kinh tế, thể mô bệnh học không phải là ung thư biểu mô tuyến, lựa chọn một phương pháp điều trị khác do ước muốn của người bệnh, người bệnh không đồng ý tiếp tục nghiên cứu... nên chỉ còn 61 bệnh nhân thực sự được theo dõi điều trị erlotinib.

3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân

Từ 01/01/2012 đến 30/12/2013 đã có tổng cộng 61 bệnh nhân từ bệnh viện K Trung Ương và bệnh viện Bạch Mai thỏa các tiêu chuẩn chọn mẫu được nhận vào nghiên cứu theo dõi hiệu quả điều trị của erlotinib. Tuổi trung bình của quần thể là $66,16 \pm 18,24$. Đặc điểm của các bệnh nhân được trình bày trong bảng 3.10.

Bảng 3.10. Đặc điểm của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib

Đặc điểm	Giới tính		Độ tuổi		Tiền căn hút thuốc*		Tổng cộng
	Nam	Nữ	<65 tuổi	≥65 tuổi	Hút	Không hút	
n	36	25	18	43	24	37	61
%	59,0	41,0	29,5	70,5	39,3	60,7	100%

*: *Hút thuốc* bao gồm hút thuốc lá hoặc hút thuốc lào. *Không hút thuốc* được xác định khi bệnh nhân chưa hề hút thuốc hoặc đã hút ≤ 100 điếu trong suốt cuộc đời.

61 bệnh nhân đều mang đột biến exon 18-21 trên gen EGFR gây tăng tính nhạy cảm với erlotinib và không có đột biến codon 12-13 trên gen KRAS. Đột biến phát hiện trên gen EGFR gồm: các loại đột biến xóa đoạn điển hình exon 19 (đột biến LREA), đột biến L858R exon 21, đột biến L861Q exon 21, đột biến G719S exon 18, trong đó đột biến LREA và L858R chiếm tỷ lệ cao nhất.

Bảng 3.11. Kết quả xác định đột biến gen EGFR trong nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib

Tình trạng đột biến	Exon đột biến	Số lượng: người (%)
Đột biến G719S	18	1 (1,6%)
Đột biến LREA	19	32 (52,4%)
Đột biến L858R	21	25 (41,0%)
Đột biến L861Q	21	3 (5,0%)
Tổng		61 (100%)

3.2.2. Hiệu quả điều trị

3.2.2.1. Đáp ứng điều trị

Ghi nhận được 1 trường hợp đáp ứng hoàn toàn ở tháng điều trị thứ 9. Tỷ lệ các đáp ứng thực thể được trình bày trong bảng 3.12. Tỷ lệ đáp ứng toàn trạng được trình bày trong bảng 3.13.

Bảng 3.12. Đáp ứng thực thể của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib (n=61)

Loại đáp ứng	3 tháng		6 tháng		9 tháng		12 tháng	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hoàn toàn	0	0	0	0	1	1,6	1	1,6
Một phần	22	36,1	39	63,9	28	45,9	18	29,5
Giữ nguyên	37	60,6	16	26,2	16	26,2	14	22,9
Tiến triển	2	3,3	6	9,9	16	26,2	28	45,9
ORR	22	36,1	39	63,9	20	47,5	19	31,1

Nhận xét: Chỉ có 1 trường hợp đáp ứng hoàn toàn trong suốt quá trình nghiên cứu. Tỷ lệ đáp ứng (ORR) của quần thể nghiên cứu đạt cao nhất ở tháng thứ 6 (63,9%), sau đó giảm dần còn 47,5% và 31,1% tương ứng thời điểm tháng thứ 9 và tháng thứ 12.

Bảng 3.13. Đáp ứng toàn trạng của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib (n=61)

Chỉ số Karnofski	3 tháng		6 tháng		9 tháng		12 tháng	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ổn định/Tăng	59	96,7	54	88,5	47	77,0	33	54,1
Giảm	2	3,3	7	11,5	14	23,0	28	45,9

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân có chỉ số ổn định/tăng cao nhất ở thời điểm tháng thứ 3 sau điều trị, chứng tỏ chất lượng sống của bệnh nhân được cải thiện rõ. Tỷ lệ này giảm dần theo thời gian, tương ứng với tỷ lệ bệnh nhân tiến triển bệnh.

3.2.2.2. Thời gian sống thêm

Thời gian điều trị trung bình là 9,8 tháng. Các thời gian sống thêm chung của quần thể nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.14, tương quan của các thời gian sống thêm với các đặc điểm quần thể nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.15.

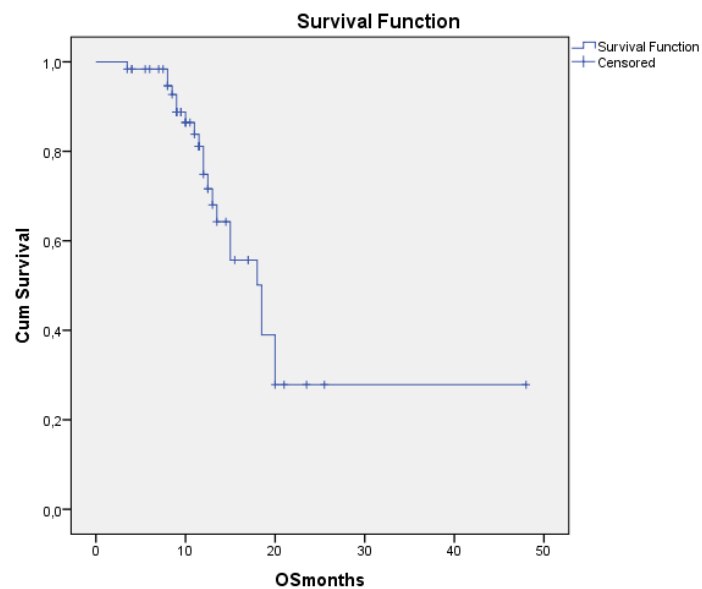
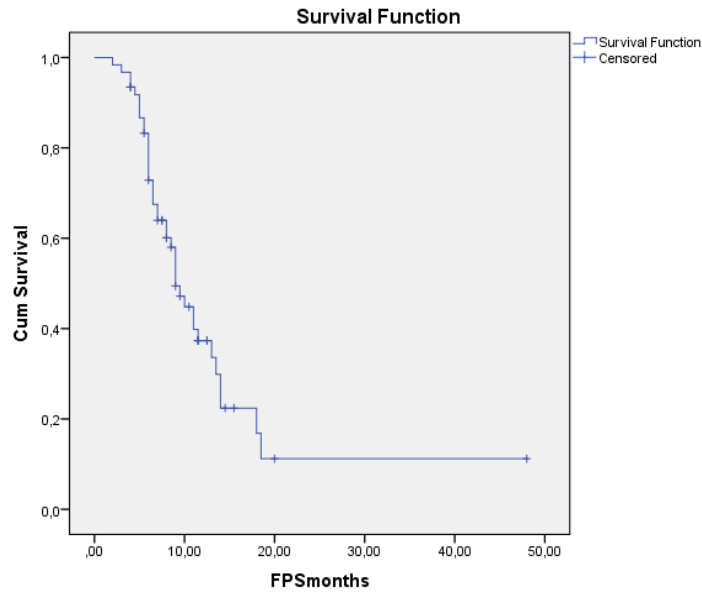
Bảng 3.14. Thời gian sống thêm của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib

Thời gian sống thêm (tháng)	Trung vị	Ngắn nhất	Dài nhất
PFS (n=61)	9,4	3,2	48
OS (n=61)	15,5	5,7	48

Bảng 3.15. Tương quan giữa đặc điểm bệnh nhân và thời gian sống thêm

Đặc điểm bệnh nhân		n	PFS trung bình (tháng)	OS trung bình (tháng)
Giới	Nam	36	9,18	12,72
	Nữ	25	9,58	11,92
P			<i>0,811</i>	<i>0,648</i>
Tuổi	<65	20	11,73	14,53
	≥65	41	8,18	11,35
P			<i>0,04</i>	<i>0,08</i>
Tiền căn hút thuốc	Không hút thuốc	37	9,81	13,15
	Hút thuốc	24	9,04	11,91
P			<i>0,647</i>	<i>0,482</i>

Nhận xét: Do các nhóm đặc điểm phân bố tương đối đồng đều nên nghiên cứu không phát hiện được những khác biệt nhỏ có hưởng lợi từ erlotinib giữa hầu hết các phân nhóm. Có sự khác biệt có ý nghĩa giữa PFS trung bình ở nhóm bệnh nhân <65 tuổi là 11,73 tháng và ở nhóm ≥65 tuổi là 8,18 tháng ($p < 0,05$) nhưng lợi ích này không ghi nhận được ở OS trung bình.



Biểu đồ 3.5. Biểu đồ Kaplan-Meier thể hiện thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS) và thời gian sống thêm tổng cộng (OS) của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib

Nhận xét: Biểu đồ cho thấy tương quan giữa các thời gian sống thêm và tỷ lệ bệnh nhân theo thời gian. Biểu đồ PFS cho thấy tỷ lệ bệnh nhân sống thêm bệnh không tiến triển sau 12 tháng là 37,3% và biểu đồ OS cho thấy tỷ lệ bệnh nhân còn sống sau 12 tháng là 74,9%.

3.2.3. Tác dụng phụ của erlotinib

Bảng 3.16. Các tác dụng phụ của erlotinib trong nghiên cứu

Tác dụng phụ	Độ 1-2	Độ 3-4	Tổng cộng
Giảm bạch cầu hạt	9 (14,8%)	0	9 (14,8%)
Giảm Hb	7 (11,5%)	0	7 (11,5%)
Tiêu chảy	24 (39,3%)	0	24 (39,3%)
Tăng men gan	9 (14,8%)	1 (1,6%)	10 (16,4%)
Buồn nôn, nôn	5 (8,2%)	0	5 (8,2%)
Phát ban thể nổi mụn	28 (45,9%)	4 (6,6%)	32 (52,4%)
Viêm cạnh móng	13 (21,3%)	1 (1,6%)	14 (23,0%)
Đau cơ khớp	3 (4,9%)	0	3 (4,9%)
Rụng tóc	2 (3,3%)	0	2 (3,3%)

Nhận xét: Tác dụng phụ gặp nhiều nhất là phát ban thể nổi mụn (52,4%), tiêu chảy (39,3%) và viêm cạnh móng (23,0%). Độ nặng của tác dụng phụ này hầu hết là độ 1-2, có thể kiểm soát bằng thuốc bôi ngoài da có corticoid đối với viêm da và loperamide đối với tiêu chảy. Có 6 trường hợp phát ban thể nổi mụn độ 3 dẫn đến nhiễm trùng da buộc phải giảm liều erlotinib. Buồn nôn chủ yếu ở mức độ nhẹ, không ảnh hưởng đến sinh hoạt. Những trường hợp giảm huyết sắc tố đều ở mức trung bình-nhẹ. Ngoài ra, không có tác dụng phụ bất thường hoặc mới nào được ghi nhận.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ ĐỘT BIẾN GEN EGFR VÀ GEN KRAS

4.1.1. Kỹ thuật xác định đột biến gen EGFR và KRAS

4.1.1.1. Kỹ thuật tách chiết DNA từ mẫu mô ung thư

Việc phát hiện cấu trúc chuỗi xoắn kép của DNA bởi hai nhà bác học Watson và Crick vào năm 1953 chính thực đánh dấu sự ra đời của chuyên ngành Sinh học phân tử. Kể từ đó đến nay, sinh học phân tử phát triển không ngừng về cả lý thuyết và thực hành. Trong lĩnh vực y học, các kỹ thuật sinh học phân tử ngày càng hoàn thiện giúp chẩn đoán nhiều bệnh lý ung thư và di truyền liên quan đến các loại đột biến gen. Tách chiết và tinh sạch DNA, RNA từ mẫu mô là công đoạn đầu tiên và là một trong những bước quan trọng để có được nguồn DNA và RNA đảm bảo chất lượng, sử dụng cho việc thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện đột biến gen, chẩn đoán các bệnh lý liên quan đến đột biến gen nói chung và bệnh UTPKTBN nói riêng. Các phân tử nucleic acid phải được tách chiết tốt, không bị đứt gãy; phải được tinh sạch tốt và không bị tạp nhiễm nhằm đảm bảo cho các phản ứng tiếp theo có độ chính xác cao.

Cần có phương pháp tách chiết DNA phù hợp cùng với kỹ năng thao tác tốt nhằm đảm bảo chất lượng và số lượng DNA trong các mẫu xét nghiệm. Để xác định đột biến gen EGFR và KRAS ở bệnh nhân UTPKTBN, DNA từ mẫu mô sinh thiết đúc trong khối nên được tách chiết bằng xylen và tinh sạch bằng phương pháp phenol/chloroform. Trước hết nghiên cứu thực hiện bước lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư có mật độ cao trong hoặc mẫu mô đúc nên

qua kính hiển vi (Hình 4.1). Đây là khâu rất quan trọng, quyết định nồng độ DNA tế bào ung thư trong tổng số DNA tách chiết được từ mẫu mô đạt hiệu quả cao. Theo đánh giá của Bell, mẫu mô ung thư có <60% tế bào ung thư không đủ điều kiện để xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen [117]. Asano và cộng sự cũng lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư làm nguyên liệu tách chiết DNA để thu được số lượng cao DNA tế bào ung thư [116].



Hình 4.1. Hình ảnh vùng tập trung tế bào UT (vùng khoanh tròn) trên kính hiển vi (x100) (hình cắt lát từ mẫu mô UTP thể biểu mô tuyến)

Nghiên cứu đã thử nghiệm và lựa chọn được phương pháp hiệu quả, tách chiết được DNA có chất lượng tốt. Đó là phương pháp sử dụng xylen và ethanol được trình bày trong phụ lục 2. Đây là phương pháp truyền thống và được sử dụng rộng rãi để tách chiết DNA từ mẫu mô, đã được đưa vào y văn [125], [126], [127]. Sau khi tách chiết, dung dịch DNA được tinh sạch bằng phương pháp phenol/chloroform cho độ tinh khiết cao nhất. Trong nghiên cứu này, độ tinh sạch của phân tử DNA được xác định bằng các chỉ số hấp thụ quang phổ, dựa vào tỷ lệ A260/A280. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (A260) của các mẫu DNA cho phép xác định nồng độ DNA trong dung

dịch. Protein có độ hấp thụ cao nhất ở bước sóng 280 nm (A280) và độ hấp thụ thấp ở bước sóng 260 nm. Do vậy, tỷ lệ A260/A280 biểu thị mức độ protein còn lại trong dịch chiết. DNA được coi là tinh sạch khi giá trị $A260/A280 = 1,7 - 2,0$ [128].

DNA tách chiết từ mẫu mô đúc trong paraffin đôi khi sẽ bị đứt gãy và độ tinh sạch không cao. Vì vậy, trước khi tiến hành kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS để xác định đột biến, chất lượng DNA được kiểm tra bằng cách sử dụng gen nội chuẩn GADPH. Gen GADPH đã được khuếch đại nhằm mục đích đánh giá chất lượng của sản phẩm DNA tổng hợp được. Gen GADPH nằm trong nhóm các gen mà sự sao chép của chúng khá ổn định, không phụ thuộc vào dòng tế bào, chu kỳ phân chia và trạng thái biệt hóa (house keeping gene). Chính vì vậy, các gen này được sử dụng như gen nội chuẩn để đánh giá sự hoạt hóa hay ức chế của các gen khác trong cùng một mẫu nghiên cứu. Sau phản ứng khuếch đại, nếu chất lượng DNA không tốt, bị đứt gãy hay tạp nhiễm thì băng điện di sản phẩm PCR trên gel agarose sẽ mờ, nhòe, bờ không đều hoặc xuất hiện các băng phụ [128], [129]. Trong nghiên cứu này, sản phẩm PCR của gen GADPH cho hình ảnh điện di rõ, bờ sắc nét và không có băng phụ. Như vậy, có thể khẳng định rằng quy trình tách chiết và tinh sạch DNA từ mẫu mô phổi của nghiên cứu này là tối ưu và chất lượng DNA đáng tin cậy.

4.1.1.2. Giải trình tự xác định đột biến gen EGFR và KRAS

Phân tử DNA được cấu tạo bởi các nucleotid. Kỹ thuật giải trình tự gen (sequencing) giúp xác định trình tự các nucleotid trên phân tử DNA, từ đó có thể phát hiện những thay đổi có khả năng dẫn đến các bệnh lý. Những kỹ thuật giải trình tự gen chỉ mới được hoàn thiện trong những năm gần đây, như

phương pháp Sanger (1977), Maxam & Gilbert (1977). Từ đó đến nay, kỹ thuật này được cải tiến rất nhiều; nhờ sự tiến bộ của kỹ thuật huỳnh quang, PCR, điện di cùng với sự trợ giúp của tin y sinh, kỹ thuật giải trình tự gen trở nên đơn giản hơn khi thao tác và trở thành công cụ rất có giá trị, làm nền tảng cho việc phân tích bộ gen người cũng như của nhiều loài vi sinh vật.

Trước khi thực hiện khâu đọc trình tự gen trên máy, cần thông qua nhiều giai đoạn. Để đảm bảo trình tự gen được rõ đẹp nhằm xác định chính xác đột biến, các giai đoạn này đều phải đạt hiệu quả tốt nhất.

- Khuếch đại riêng biệt các exon 18 – 21 gen EGFR và exon 2 gen KRAS, điện di trên gel agarose để kiểm tra sản phẩm PCR: Sau phản ứng khuếch đại, nếu chất lượng DNA không tốt, bị đứt gãy hay tạp nhiễm thì băng điện di trên gel agarose sẽ bị mờ, bờ không đều hoặc xuất hiện các băng phụ [128], [129]. Trong nghiên cứu này, sau khi khuếch đại các exon 18-21 gen EGFR và exon 2 gen KRAS, kết quả điện di trên gel agarose luôn xuất hiện những băng sáng, bờ đều và sắc gọn, không có băng phụ. Kết quả này có thể chứng minh rằng những phân tử gen tổng hợp được từ quy trình khuếch đại exon 18-21 gen EGFR và exon 2 gen KRAS là đáng tin cậy để tiến hành các phản ứng tiếp theo trong quy trình giải trình tự xác định đột biến gen. Đồng thời, kết quả tốt của giai đoạn này đã góp phần khẳng định sự tối ưu của giai đoạn tách chiết và tinh sạch DNA trước đó.

- Tinh sạch sản phẩm PCR từ gel: tinh sạch gel để thu nhận sản phẩm PCR tinh khiết là một công đoạn không thể thiếu và vô cùng quan trọng trước khi tiến hành kỹ thuật giải trình tự gen. Chất lượng của sản phẩm PCR sau khi tinh sạch phản ánh chất lượng kỹ thuật giải trình tự để tìm đột biến gen EGFR và KRAS. Có nhiều phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR từ gel hoặc trực

tiếp từ dung dịch sau phản ứng PCR. Nghiên cứu đã sử dụng phương pháp dùng cột lọc được thiết kế trên nguyên tắc ứng dụng khả năng bám màng silica của DNA trong môi trường muối, nhờ đó có thể tách chiết và tinh sạch những đoạn DNA có kích thước từ 100 bp đến 10 kb từ gel agarose hoặc trực tiếp từ sản phẩm sau phản ứng PCR [130]. Phương pháp này cho DNA có độ tinh khiết cao, giữ được gần như toàn bộ DNA trong mảnh gel và thời gian thực hiện kỹ thuật nhanh chóng [131].

- Chạy phản ứng giải trình tự các exon gen EGFR và KRAS bằng BigDye kit và tinh sạch sản phẩm sau phản ứng: nghiên cứu sử dụng *BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (ABI)* để chạy phản ứng giải trình tự các exon gen với quy trình kỹ thuật được trình bày trong phụ lục 6. Sau khi được chạy phản ứng giải trình tự, sản phẩm mong muốn cần được tinh sạch khỏi những ddNTP dư thừa trước khi tiến hành phân tích kết quả trên máy đọc trình tự. Các ddNTP dư thừa có khả năng phát quang nên có thể che lấp tín hiệu trình tự ở giai đoạn đầu của quá trình đọc trình tự và có thể gây nhiễu tín hiệu nền. Do đó, tinh sạch sản phẩm sau sử dụng BigDye kit là một công đoạn không thể thiếu để tạo ra sản phẩm thuần nhất trước khi tiến hành kỹ thuật đọc trình tự gen. Chất lượng của sản phẩm sau khi tinh sạch phản ánh chất lượng kỹ thuật giải trình tự để tìm đột biến gen EGFR và gen KRAS. Nghiên cứu vẫn sử dụng phương pháp cột lọc để thu được sản phẩm tinh khiết.

- Giải trình tự gen: nghiên cứu sử dụng máy giải trình tự gen tự động. Trình tự gen của mẫu nghiên cứu sẽ được đối chiếu với trình tự GenBank trên ngân hàng gen thế giới và được phân tích để xác định vùng hoặc điểm đột biến. Nếu sản phẩm giải trình tự tinh khiết và có tỷ lệ DNA đột biến trên DNA lành tính cao, các đỉnh tín hiệu sẽ sắc nhọn, cao và phân tách nhau rõ

ràng, dù có lẫn DNA đột biến vẫn sẽ được nhận diện dễ dàng. Ngược lại, nếu dung dịch đem giải trình tự không được tinh sạch tốt, còn lẫn nhiều sản phẩm phụ, sẽ tạo ra các tín hiệu nền nhiều, gây khó khăn cho việc xác định vị trí đột biến và loại đột biến. Các kết quả giải trình tự xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS trong nghiên cứu cho thấy hình ảnh các đỉnh tín hiệu rõ ràng và hầu như không có tín hiệu nhiễu, là minh chứng cho sự tối ưu của các giai đoạn của quy trình kỹ thuật trước đó.

Được xem là đại diện cho nhóm *kỹ thuật tầm soát đột biến* (screening methods), kỹ thuật giải trình tự gen là phương pháp cổ điển để phát hiện các đột biến của bộ gen và đến nay vẫn được sử dụng rộng rãi để tìm các đột biến đã công bố và đột biến “mới” chưa được công bố. Trong số 80 đột biến gen EGFR được nghiên cứu phát hiện bằng kỹ thuật này, chỉ có 76 đột biến nằm trong danh sách những đột biến có ảnh hưởng đến tính đáp ứng với thuốc điều trị đích đã được y văn thế giới công bố [38], [123], [132], còn lại 04 đột biến là những đột biến chưa được công bố, gồm: đột biến xóa 1 nucleotid c.2137del A ở exon 18, đột biến xóa 2 nucleotid c.2373_2374 delAA ở exon 20, đột biến xóa 23 nucleotid c.2499_2521del23 exon 21 và đột biến thêm 3 nucleotid c.2554/2555insACA ở exon 21.

Tuy kỹ thuật giải trình tự gen cho phép phát hiện tất cả các loại đột biến (cả đột biến đã công bố và đột biến mới phát hiện), nhưng đây là một kỹ thuật có độ nhạy không cao, đặc biệt trong việc tầm soát các đột biến dị hợp tử (như đột biến gen EGFR và gen KRAS). Thông thường, kỹ thuật giải trình tự chỉ có thể phát hiện tương đối rõ ràng khi lượng tế bào mang đột biến chiếm ít nhất 60% trong hỗn hợp với tế bào lành, hoặc khi lượng alen đột biến hiện diện ít nhất 25% trong tổng số alen của quần thể tế bào, tương đương độ nhạy khoảng 25% [119], [133]. Do đó, xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR và KRAS bằng kỹ thuật này có giá trị hạn chế đối với những bệnh nhân được lấy

mẫu mô qua sinh thiết bằng kim nhỏ hoặc qua phẫu thuật nhưng chất lượng mô kém và có tỷ lệ tế bào ác tính thấp. Tỷ lệ tế bào ác tính thấp đồng nghĩa với tỷ lệ DNA đột biến còn thấp hơn vì không phải tế bào ung thư nào cũng mang gen đột biến. Điều này có nghĩa tỷ lệ alen đột biến/alen lành tính quá thấp, dẫn đến chiều cao các đỉnh tín hiệu trình tự nucleotid của hai quần thể alen này quá chênh lệch nhau, gây nhầm lẫn hoặc nghi ngờ không có đột biến mà chỉ là hiện tượng nhiễu của tín hiệu nền (nếu các giai đoạn kỹ thuật trước chưa được tối ưu hóa). Hạn chế này làm giảm độ nhạy của kỹ thuật và phát sinh nhiều trường hợp âm tính giả. Trong nghiên cứu, tình trạng này đã được khắc phục bằng hai cách: thứ nhất, DNA được tách chiết và tinh sạch từ vùng mô đã được lựa chọn là vùng tập trung nhiều tế bào ung thư dưới kính hiển vi, giúp tăng lượng DNA ung thư thu được; và thứ hai, thực hiện việc xác định đột biến song song bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, vốn được công bố có độ nhạy cao hơn [119], [133] để tránh bỏ sót những trường hợp có đột biến nhưng không phát hiện được bằng kỹ thuật giải trình tự do tín hiệu đột biến quá yếu.

Chính hạn chế do độ nhạy thấp đã khiến kỹ thuật này giảm bớt giá trị khi cần tìm đột biến gen EGFR và KRAS vì trong quần thể bệnh nhân ung thư phổi giai đoạn cuối, mô ung thư chủ yếu được lấy bằng phương pháp sinh thiết qua thành ngực nên lượng mô thu được ít. Bên cạnh đó, kỹ thuật giải trình tự gen còn có một số hạn chế như:

(1) Kỹ thuật tiến hành qua nhiều bước (tách chiết DNA, phản ứng PCR, phản ứng giải trình tự và phân tích trình tự), do đó, sau 3-4 ngày mới có kết quả (tính từ lúc có mẫu mô).

(2) Các đột biến điểm khó phát hiện hơn các đột biến xóa đoạn và thường phải được khẳng định bằng kỹ thuật giải trình tự cả hai chiều.

(3) Do gen EGFR và KRAS có nhiều đột biến phức tạp, cần phân biệt đỉnh của đột biến trên nền alen kiểu dại nên trường hợp xuất hiện tín hiệu nhiều sẽ khó phân biệt. Vì vậy, việc phân tích đột biến gen EGFR và KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự cần kinh nghiệm của người thực hiện xét nghiệm để đem lại kết quả chính xác nhất.

(4) Cần có máy giải trình tự

Tuy còn nhiều hạn chế nhưng do đặc điểm đột biến gen EGFR trên exon 18 ÷ 21 và đột biến codon 12, 13 gen KRAS rất đa dạng nên kỹ thuật giải trình tự gen vẫn được xem là “tiêu chuẩn vàng”, đã và đang được sử dụng rộng rãi để khảo sát các loại đột biến này [45], [92], [134], [135].

4.1.1.3. Kỹ thuật Scorpion ARMS xác định đột biến gen EGFR và KRAS

Scorpion ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpion trong phản ứng real-time PCR để phát hiện các đột biến. Dựa trên nguyên lý này, kỹ thuật cho phép khuếch đại đặc hiệu một trình tự đột biến ngay cả trong trường hợp alen đột biến đó chiếm một tỉ lệ rất nhỏ (1%) trong tổng số sợi khuôn DNA.

Kỹ thuật Scorpion ARMS dùng phát hiện đột biến gen EGFR và KRAS trong nghiên cứu đã được tối ưu hóa có độ nhạy rất cao với ngưỡng phát hiện là 1% tế bào ung thư trong hỗn hợp với tế bào lành. Đồng thời, công nghệ sử dụng các loại mồi đặc hiệu alen bình thường và alen đột biến giúp làm tăng độ đặc hiệu nhiều lần và làm giảm tỷ lệ âm tính giả. Kỹ thuật Scorpion ARMS, là một trong những kỹ thuật thuộc nhóm *phát hiện trúng đích* (targeted methods), đã được một số tác giả sử dụng trong nghiên cứu về đột biến gen EGFR và gen KRAS. Điển hình như Kimura và cộng sự đã sử dụng để tìm đột biến EGFR và đánh giá đáp ứng của bệnh nhân mang đột biến với

gefitinib [136]. Bando và cộng sự so sánh tỷ lệ phát hiện đột biến gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS với kỹ thuật giải trình tự [137]. Nhờ có độ nhạy cao, kỹ thuật Scorpion ARMS đã giúp khẳng định lại số trường hợp nghi ngờ có đột biến khi thực hiện bằng kỹ thuật giải trình tự gen (các hình 3.20 – 3.22 và 3.24 – 3.26). Nếu không được khảo sát lại bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, nghiên cứu sẽ bỏ sót 6 đột biến xóa đoạn LREA (exon 19), 18 đột biến điểm L858R (exon 21), 2 đột biến điểm L861Q (exon 21) trên gen EGFR và 1 đột biến G12A, 2 đột biến G12D, 1 đột biến G12C, 2 đột biến G12V và 3 đột biến G13D trên gen KRAS, làm cho tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS chung ở bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn Việt Nam bị sai lệch. Năm 2008, Zhu và cộng sự kiểm tra phát hiện thêm 11 mẫu đột biến EGFR đột biến trên 148 mẫu có đột biến EGFR đã được xác định không đột biến trước đó bằng kỹ thuật giải trình tự [138]. Năm 2011, Bando công bố tỷ lệ đột biến gen KRAS bằng kỹ thuật Scorpion ARMS là 44% so với kỹ thuật giải trình tự là 33% [137]. Đây là lần đầu tiên kỹ thuật Scorpion ARMS được thực hiện tại Việt Nam, cho phép phát hiện chính xác đột biến gen trong các mô phân tích có tỷ lệ tế bào ung thư thấp (<25%) và alen đột biến chiếm tỉ lệ rất nhỏ (khoảng 1%) trong tổng số sợi khuôn DNA. Ngoài ra, do thời gian thực hiện xét nghiệm ngắn và ít giai đoạn can thiệp nên kỹ thuật này rất phù hợp với các phòng xét nghiệm dịch vụ. Điều này có ý nghĩa đặc biệt đối với bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn, tạo điều kiện cho bệnh nhân có thể nhanh chóng được áp dụng một phác đồ điều trị hiệu quả.

Với ưu điểm độ nhạy cao, kỹ thuật Scorpion ARMS đã trở thành kỹ thuật lý tưởng để tìm đột biến EGFR hoặc gen KRAS ở những tế bào ác tính bong tróc trong dịch màng phổi hoặc lưu hành trong huyết tương [119], [136]. Những loại mẫu xét nghiệm trên không xâm lấn hoặc có độ xâm lấn ít hơn, do

đó, cung cấp lượng tế bào và DNA đột biến thấp hơn, cần kỹ thuật phát hiện có độ nhạy cao.

Tuy nhiên, kỹ thuật này được thiết kế dạng mỗi đặc hiệu bắt cặp với alen đột biến nên chỉ phát hiện được những đột biến đã được công bố, đồng thời những đột biến này phải có mỗi đặc hiệu trong hỗn hợp phản ứng. Do đó, đối với những đột biến mới, chưa được công bố thì không thể có mỗi đặc hiệu được thiết kế sẵn như 4 loại đột biến gen EGFR mới phát hiện trong nghiên cứu (đột biến xóa 1 nucleotid c.2137delA ở exon 18, đột biến xóa 2 nucleotid c.2373_2374 delAA ở exon 20, đột biến xóa 23 nucleotid c.2499_2521del23 ở exon 21, đột biến thêm 3 nucleotid c.2554/2555insACA ở exon 21) và đột biến điểm V769L (exon 20), thì kỹ thuật Scorpion ARMS không thể phát hiện ra, sẽ cho kết quả âm tính giả. Trong những đột biến mà kỹ thuật Scorpion ARMS không phát hiện ra trong nghiên cứu này, chỉ có đột biến V769L là đã có thông tin trên cơ sở dữ liệu COSMIC [123], bốn đột biến còn lại là đột biến mới chưa được công bố.

Ngoài ra, do đột biến gen EGFR rất đa dạng nên kỹ thuật Scorpion ARMS cũng không thể được thiết kế để phát hiện toàn bộ. Trong số các đột biến điểm gen EGFR, chỉ có đột biến L858R và L861Q (exon 21), đại diện cho đột biến làm tăng tính nhạy cảm với thuốc điều trị đích, đột biến T790M và S786I (exon 20), đại diện cho đột biến kháng thuốc điều trị đích, là được xác định chính xác. Hầu hết các đột biến còn lại khác đều được xác định dưới dạng nhóm. Đột biến điểm G719S, G719A và G719C ở exon 18 được xác định chung là đột biến G719X. Bệnh nhân PNT (mã số mẫu 102) có kết quả đột biến bằng kỹ thuật Scorpion ARMS là G719X, được xác định rõ là G719S bằng kỹ thuật giải trình tự gen (Hình 3.7). Đột biến thêm đoạn exon 20 được thiết kế mỗi đặc hiệu cho chung 3 loại đột biến thêm đoạn thường gặp nhất tại

exon 20. Đột biến xóa đoạn exon 19 được thiết kế mỗi đặc hiệu cho chung 19 loại đột biến xóa đoạn thường gặp nhất tại exon 19. Đối với đột biến gen KRAS, do số loại đột biến tại codon 12-13 của exon 2 là có giới hạn nên mỗi đặc hiệu được thiết kế nhận diện chính xác 7 loại đột biến điểm có tỷ lệ cao. Có thể nhận thấy, kỹ thuật Scorpion ARMS được thiết kế để xác định những đột biến exon 18-21 gen EGFR và đột biến codon 12-13 exon 2 gen KRAS có tần suất lưu hành cao và có ý nghĩa trong điều trị. Đây cũng là một ưu điểm của kỹ thuật khi đặt giá trị lâm sàng của đột biến EGFR lên hàng đầu. Tuy nhiên, hạn chế trên của kỹ thuật Scorpion ARMS có thể khắc phục nếu không sử dụng bộ kit thương phẩm mà tự thiết kế thêm mỗi đặc hiệu cho những đột biến quan tâm.

4.1.1.4. Sự kết hợp các kỹ thuật xác định đột biến gen EGFR và KRAS

Nhờ nỗ lực của các nhà nghiên cứu trong việc phát hiện các đột biến có ý nghĩa trên lâm sàng, xét nghiệm tình trạng gen của tế bào khối u đã trở nên ngày càng thường quy. Trong thời gian ngắn trở lại đây, việc xét nghiệm tình trạng đột biến gen EGFR và gen KRAS trong bệnh UTPKTBN đã giúp định hướng cho việc quyết định loại phác đồ điều trị và/hoặc giúp lựa chọn bệnh nhân vào những nhánh đặc hiệu của các thử nghiệm lâm sàng. Tuy nhiên, để trở thành một quy trình chuẩn, một phần bắt buộc trong công tác chăm sóc bệnh nhân UTPKTBN, thì xét nghiệm đột biến gen EGFR và KRAS cần hoàn thiện về độ tin cậy, chính xác, độ nhạy và thời gian trả kết quả cũng như giá thành chấp nhận được. Những tiêu chuẩn này sẽ được cân nhắc ở từng vùng địa lý và từng phòng xét nghiệm cụ thể, tùy theo nhu cầu sử dụng và nguồn lực, từ đó lựa chọn loại kỹ thuật phù hợp nhất.

Bảng 4.1. So sánh kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS

Đặc điểm	Kỹ thuật giải trình tự gen	Kỹ thuật Scorpion ARMS
Loại đột biến EGFR có thể phát hiện	Tất cả loại đột biến đã biết và đột biến mới	29 loại đột biến thường gặp
Độ nhạy (% tế bào đột biến)	>25%	<1%
Loại mẫu xét nghiệm	Mô tươi, mô đúc nén	Tất cả
Khả năng phát hiện đột biến	70-75%	>95%
Mức độ phức tạp	Cao, nhiều giai đoạn, đòi hỏi kinh nghiệm	Thấp
Thiết bị yêu cầu	Máy giải trình tự	Máy real-time PCR
Kít thương phẩm có sẵn	Không	Có
Giá thành xét nghiệm	Cạnh tranh hơn	Cao
Thời gian xét nghiệm (từ lúc có mẫu mô)	2-3 ngày	1 ngày

Có nhiều kỹ thuật phát hiện đột biến gen EGFR và KRAS và độ nhạy của mỗi kỹ thuật phụ thuộc vào mật độ tế bào ung thư trong mẫu mô. Việc phát hiện đột biến trên các gen EGFR và KRAS bằng kỹ thuật có độ nhạy phù hợp đã được chứng minh là rất hữu ích cho việc phát hiện sớm bệnh và theo dõi tình trạng bệnh tái phát. Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen, đại diện cho nhóm kỹ thuật tầm soát đột biến (screening methods), và Scorpion ARMS, đại diện cho nhóm kỹ thuật phát hiện trúng đích (targeted methods) với những ưu và khuyết điểm riêng (Bảng 4.1). Tỷ lệ phát hiện đột biến gen EGFR bằng hai kỹ thuật này lần lượt là 44,2% (80/181) và 55,8% (101/181); đột biến gen KRAS lần lượt là 12,7% (23/181) và 15,5% (28/181). Như vậy, tỷ lệ phát hiện đột biến gen EGFR và gen KRAS bằng kỹ thuật giải trình tự kém hơn kỹ thuật

Scorpion ARMS. Bên cạnh những yếu tố kỹ thuật, kỹ thuật giải trình tự gen có giá thành cạnh tranh hơn trong khi một rào cản của kỹ thuật Scorpion ARMS là giá thành cao nên khó áp dụng trên số lượng lớn bệnh nhân.

Đây là lần đầu tiên tại Việt Nam, đột biến EGFR và KRAS trên bệnh nhân UTPKTBN được khảo sát bằng hai kỹ thuật được xem là đại diện cho hai phân nhóm kỹ thuật xác định đột biến gen. Nghiên cứu đã kết hợp các kỹ thuật trên để bổ khuyết cho nhau nhằm cung cấp tỷ lệ đột biến gen EGFR và KRAS lưu hành trong quần thể bệnh nhân UTPKTBN một cách chính xác nhất và không bỏ sót đột biến mới. Tuy nhiên, cách làm này chỉ phù hợp trong nghiên cứu, khó có thể áp dụng cho bệnh nhân trên lâm sàng do rào cản về thời gian và kinh phí. Ellison và cộng sự đã kết hợp hai kỹ thuật này để xác định đột biến gen EGFR ở mẫu mô ung thư phổi cũng cho nhận định tương tự [139]. Việc thử nghiệm kết hợp các kỹ thuật tầm soát và kỹ thuật phát hiện trúng đích cũng đã được áp dụng nhiều trên thế giới như kết hợp giải trình tự và PCR-RFLP [117], [140], giải trình tự với Taqman PCR [151], giải trình tự với SMAP [120]...đều nhằm mục đích cải tiến các khuyết điểm của kỹ thuật cổ điển và gia tăng độ nhạy, tránh bỏ sót đột biến, làm lỡ cơ hội sử dụng thuốc điều trị đích cho bệnh nhân. Do đó, lựa chọn sử dụng kỹ thuật nào để xác định đột biến gen EGFR và KRAS phải phụ thuộc vào nhiều yếu tố như mục đích, bản chất mẫu xét nghiệm, trang thiết bị và tay nghề kỹ thuật viên.

4.1.2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR

4.1.2.1. Tỷ lệ đột biến gen EGFR

Nhiều nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam đã cho thấy đột biến exon 18-21 gen EGFR có liên quan đến tính đáp ứng thuốc EGFR TKIs dạng

phân tử nhỏ có tần suất cao ở các bệnh nhân UTPKTBN chủng tộc Đông Á, nữ giới, mô bệnh học thể biểu mô tuyến và không hút hoặc hút thuốc rất ít [45], [90]. Tỷ lệ đột biến gen EGFR dao động khoảng 5-15% ở người da trắng [45], [135], [142] và khoảng 30%-58% ở bệnh nhân Đông Á [45], [90], [111], [116], [134], [143], [144], [145].

Tổng hợp kết quả xác định đột biến gen bằng hai kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS, nghiên cứu đã xác định được 106/181 bệnh nhân có đột biến gen EGFR, chiếm tỷ lệ là 58,6%. Tỷ lệ này tương đồng với những báo cáo trước về tỷ lệ đột biến gen EGFR cao ở chủng tộc Đông Á [45], [90], [111], [116], [134], [143], [144], [145]. Tuy nhiên, tỷ lệ trong nghiên cứu này cao hơn nghiên cứu trên bệnh nhân ở Nhật là 39% [143], ở Triều Tiên là 34,6% [145], ở Đài Loan là 38,6% [134], ở Thái Lan là 57,4% [144], có thể vì hai lý do. Thứ nhất là khác biệt về chủng tộc. Bệnh nhân trong nghiên cứu toàn bộ đều là người Kinh tại Việt Nam, có thể mang tần suất lưu hành đột biến gen EGFR khác các dân tộc khác như Trung Quốc, Triều Tiên, Thái Lan. Cùng khảo sát đột biến gen EGFR trên dân tộc Kinh tại Việt Nam nhưng tỷ lệ của nghiên cứu cao hơn của Hoàng Anh Vũ [111] vì lý do thứ hai là khác biệt về kỹ thuật xác định đột biến. Hoàng Anh Vũ chỉ sử dụng duy nhất kỹ thuật pyrosequencing có độ nhạy tuy cao hơn kỹ thuật giải trình tự gen cổ điển nhưng vẫn phụ thuộc rất nhiều vào lượng tế bào ác tính trong mẫu mô [146], [147]. Kỹ thuật pyrosequencing là một kỹ thuật tầm soát đột biến gen ung thư, do đó có độ nhạy thấp hơn nhóm kỹ thuật phát hiện trúng đích. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật Scorpion ARMS bổ sung cho kỹ thuật giải trình tự nên đã tìm được nhiều mẫu đột biến hơn nên có tỷ lệ đột biến cao hơn. Tỷ lệ nghiên cứu tương đồng với tỷ lệ đột biến tại Việt Nam trong một nhánh của

ngiên cứu PIONEER. Do được thực hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS có độ nhạy tốt nên nghiên cứu PIONEER phát hiện được tỷ lệ đột biến cao nhưng lại không xác định được đột biến mới [116]. Các nghiên cứu khác ở chủng tộc da trắng và Đông Á chủ yếu làm bằng kỹ thuật giải trình tự nên cho tỷ lệ đột biến thấp hơn (Bảng 4.2). Năm 2010, Ellison và cộng sự sử dụng hai kỹ thuật Scorpion ARMS và giải trình tự gen khi xác định đột biến exon 18-21 gen EGFR cho thấy tỷ lệ đột biến là 12,6%, cao hơn so với khi dùng đơn lẻ kỹ thuật Scorpion ARMS (8,4%) hoặc kỹ thuật giải trình tự gen (7,9%) và đã tránh bỏ sót nhiều đột biến so với khi chỉ xác định đột biến bằng một trong hai kỹ thuật trên [139].

Bảng 4.2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR trong bệnh UTPKTBN ở một số nghiên cứu trên thế giới

Tác giả	Chủng tộc	Cỡ mẫu	Kỹ thuật	Tỷ lệ đột biến chung	Đột biến xóa đoạn exon 19	Đột biến L858R
Eberhard (2005) [148]	Da trắng	228	Giải trình tự	12,7%	51,7%	24,1%
Shigematsu (2005) [45]	Da trắng	158	Giải trình tự	8%	46%	39%
	Đông Á	361	Giải trình tự	30%	-	-
Boch (2013) [135]	Da trắng	552	Pyrosequencing	4,9%	56%	30%
Huang (2004) [134]	Đài Loan	101	Giải trình tự	38,6%	33,3%	48,7%
Sonobe (2005) [143]	Nhật Bản	154	Giải trình tự	39%	57%	37%
Sriuranpong (2006) [144]	Thái Lan	61	Giải trình tự	57,4%	82,8%	14,3%
Bae (2007) [145]	Triều Tiên	-	Giải trình tự	36,4%	-	-
Mok (2009) [90]	Trung Quốc, Đài Loan, Triều Tiên	437	Giải trình tự	59,7%	53,6%	42,5%
Hoàng Anh Vũ (2011) [111]	Việt Nam	71	Pyrosequencing	42%	25%	42,9%
Shi (2014) [116]	Việt Nam	121	Scorpion ARMS	64,2%	36,4%	16,0%
Nghiên cứu này (2014)	Việt Nam	181	Giải trình tự và Scorpion ARMS	58,6%	48,2%	40,7%

Các kết quả này gợi ý rằng trong thực hành lâm sàng, các trường hợp UTPKTBN có kế hoạch điều trị bằng thuốc ức chế EGFR như gefitinib và erlotinib đều nên được chẩn đoán đột biến EGFR, không xét tới các yếu tố lâm sàng và giải phẫu bệnh. Các kết quả nghiên cứu nhằm tìm ra những chỉ điểm sinh học cho đáp ứng với thuốc ức chế đặc hiệu EGFR cho thấy tình trạng đột biến gen EGFR chính là yếu tố tiên đoán chính xác nhất [24], [42], [148]. Hiệp hội Ung thư Châu Âu hướng dẫn nên khảo sát đột biến gen EGFR để chọn lựa bệnh nhân UTPKTBN phù hợp với điều trị đích [149].

Ngoài các yếu tố về dịch tễ đã được xác định như chủng tộc, giới tính, thói quen hút thuốc và loại mô bệnh học, tỷ lệ đột biến gen EGFR còn chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố kỹ thuật, bao gồm loại mẫu mô xét nghiệm và chất lượng mẫu, quy trình tách chiết và tinh sạch DNA từ mẫu mô và loại kỹ thuật dùng để xác định đột biến.

(1) Loại mẫu mô sử dụng để làm xét nghiệm sẽ ảnh hưởng đến số lượng tế bào ác tính thu thập được, từ đó gián tiếp ảnh hưởng đến nồng độ DNA tổng số và DNA ung thư tách chiết được. *Mẫu mô tươi* được lấy từ khối u sau phẫu thuật là tốt nhất, cung cấp lượng DNA từ tế bào ung thư dồi dào và chất lượng tốt. Loại mô này có thể dùng để xác định đột biến gen bằng hầu hết mọi kỹ thuật. Tuy nhiên, loại mẫu này chỉ có ở những bệnh nhân ung thư còn khả năng phẫu thuật. *Mẫu mô phẫu thuật đúc nén* có chất lượng không bằng vì DNA trong tế bào đã qua giai đoạn nhuộm và đúc nén, có khả năng bị hủy hoại. Loại mô này có thể xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự nhưng vẫn có nguy cơ bỏ sót đột biến. Một nghiên cứu so sánh việc xác định đột biến gen EGFR giữa 15 phòng xét nghiệm y khoa ở Pháp (nghiên cứu ERMETIC) đã kết luận độ chính xác của tỷ lệ đột biến gen EGFR phụ thuộc nhiều vào chất lượng mẫu hơn là kỹ thuật xác định, do đó cần chú ý đảm bảo

quy trình lấy, bảo quản và xử lý mẫu [150]. *Mẫu mô sinh thiết đúc nén* cung cấp lượng tế bào ác tính ít hơn hai loại mẫu mô trên nên khả năng phát hiện bằng kỹ thuật giải trình tự là thấp hơn. Tuy nhiên, đây là loại mô chiếm phần lớn ở đối tượng bệnh nhân ung thư phổi giai đoạn cuối vì đã không còn khả năng phẫu thuật. *Tế bào ác tính lưu hành trong dịch màng phổi hoặc huyết tương* cũng cung cấp lượng tế bào ác tính rất ít, nồng độ DNA tách chiết được từ tế bào ung thư ở các loại mẫu này là rất thấp. Do đó, đối với những loại mẫu này nên sử dụng xác định đột biến có độ nhạy cao hơn, thuộc nhóm phát hiện trúng đích như Scorpion ARMS, Taqman real-time PCR, PCR-RFLP hoặc SMAP [151]. Nghiên cứu này xác định đột biến từ những mẫu mô sinh thiết đúc nén nhưng đã áp dụng nhiều biện pháp hạn chế những khuyết điểm nêu trên bằng cách lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư của mẫu mô dưới kính hiển vi và sử dụng kết hợp hai kỹ thuật giải trình tự và Scorpion ARMS.

(2) Quy trình tách chiết và tinh sạch DNA quyết định nồng độ và chất lượng DNA tổng số, trong đó có DNA ung thư. Nếu quy trình chưa được tối ưu hóa, làm thất thoát DNA hoặc dịch chiết DNA không tinh khiết hoặc DNA không còn toàn vẹn sẽ làm giảm độ nhạy xét nghiệm, ức chế các phản ứng sinh học phân tử tiếp sau và gây âm tính giả. Nghiên cứu này áp dụng quy trình tách chiết và tinh sạch DNA đã tối ưu hóa, thông qua hai bằng chứng là đo quang xác định nồng độ, độ tinh khiết của dịch chiết DNA và kết quả chạy PCR các mẫu DNA vừa tách chiết với cặp mồi gen nội chuẩn GAPDH chứng tỏ DNA còn nguyên vẹn.

(3) Kỹ thuật xác định đột biến gen EGFR: như đã trình bày ở trên, kỹ thuật xác định đột biến gen trong bệnh ung thư gồm nhóm kỹ thuật tầm soát và kỹ thuật phát hiện trúng đích. Mỗi kỹ thuật trong các nhóm kỹ thuật này đều có thế mạnh và hạn chế riêng, do đó, nếu kết hợp sẽ bổ khuyết cho nhau,

không bỏ sót đột biến (cả đột biến mới và đột biến đã biết). Nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật giải trình tự để không bỏ sót đột biến mới và những đột biến có tần suất lưu hành thấp, kết hợp với kỹ thuật Scorpion ARMS có độ nhạy rất cao để phát hiện những trường hợp âm tính giả do giải trình tự và thiết kế môi phát hiện khá nhiều đột biến đã biết (29 loại). Phương pháp này đã giúp xác định chính xác tỷ lệ đột biến gen EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn cuối tại Việt Nam.

4.1.2.2. Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR

Các nghiên cứu trước đây đều cho thấy đột biến EGFR liên quan đến tính đáp ứng thuốc EGFR TKIs trong UTP tập trung tại 4 exon 18 – 21, vùng mã hóa tyrosine kinase [152]. Khoảng 90% là các đột biến xóa đoạn nhỏ liên quan đến 5 acid amin từ codon 746-750 exon 19 (đột biến ELREA hay Δ E746-A750) và các đột biến điểm gây thay đổi acid amin leucine (L) thành arginine (R) tại codon 858 exon 21 (đột biến L858R). Có hơn 20 loại biến thể của đột biến xóa đoạn exon 19 gồm xóa đoạn dài hơn, ngắn hơn, xóa đoạn kèm đột biến điểm và xóa đoạn kèm thêm đoạn. Khoảng 3% là đột biến điểm tại codon 719 exon 18, thay thế Glycine (G) thành Cysteine (C), Alanine (A) hoặc Serine (S) (đột biến G719X). Ngoài ra, khoảng 3% là các đột biến thêm đoạn không làm lệch khung dịch mã ở exon 20. Còn lại là các đột biến hiếm gặp khác [38], [152], [153].

Kết quả nghiên cứu cho thấy đột biến gen EGFR rất đa dạng, phân bố cả 4 exon, gồm tất cả các dạng đột biến điểm, xóa đoạn và thêm đoạn (Biểu đồ 3.1). Trong 106 đột biến được xác định, exon 19 tập trung nhiều đột biến nhất (48,2%) gồm các đột biến xóa đoạn; kế đến là exon 21 (46,2%) gồm chủ yếu các đột biến điểm bên cạnh 1 trường hợp xóa đoạn và 1 trường hợp thêm đoạn; exon 20 tập trung 2,8% đột biến gồm đột biến điểm và đột biến xóa đoạn; exon

18 tập trung ít đột biến nhất (1,9%) gồm đột biến xóa đoạn và đột biến điểm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Mitsudomi và cộng sự năm 2006 [154] trên bệnh nhân Đông Á nhưng khác biệt với nghiên cứu của Ellison do tiến hành trên bệnh nhân da trắng [139]. Nghiên cứu của Huang tại Đài Loan [134] và Hoàng Anh Vũ tại Việt Nam [111], tuy là chủng tộc Đông Á nhưng có khác biệt lớn với đột biến exon 21 chiếm tỷ lệ cao hơn hẳn exon 19 có lẽ do số lượng đột biến nhỏ, các số liệu chưa có sức thuyết phục cao (Bảng 4.3).

Bảng 4.3. Phân bố đột biến gen EGFR trên exon 18-21 theo một số nghiên cứu

Nghiên cứu	Số đột biến	Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21
Huang (2004) [134]	46	8,7%	28,3%	10,9%	50,0%
Mitsudomi (2006) [154]	569	3,2%	48,2%	3,7%	42,7%
Ellison (2010) [139]	27	7,4%	51,9%	0	40,7%
Hoàng Anh Vũ (2011) [111]	28	14,3%	25,0%	3,6%	57,1%
Nghiên cứu này (2014)	106	1,9%	48,2%	2,8%	46,2%

Trong những đột biến gen EGFR đơn độc đã phát hiện trong nghiên cứu, đột biến xóa đoạn LREA exon 19 chiếm tỷ lệ cao nhất (51/106 trường hợp, 48,2%), kế đến là đột biến L858R exon 21 (43/106 trường hợp, 40,7%). Đột biến L861Q exon 21 và T790M exon 20 ít hơn (lần lượt là 4/106 trường hợp, 3,8% và 1/106 trường hợp, 0,9%) (Biểu đồ 3.1.). Ngoài ra, còn một số đột biến hiếm gặp khác, mỗi đột biến chỉ gặp một trường hợp, chiếm tỷ lệ 0,9%. Tỷ lệ đột biến đôi cũng rất thấp, mỗi loại chỉ có một trường hợp. Kết quả này tương đối phù hợp với đa số nghiên cứu trên thế giới (Bảng 4.2) với đột biến

LREA chiếm tỷ lệ cao hơn đột biến L858R. Sự khác biệt, nếu có, có thể do chủng tộc và kỹ thuật xác định đột biến. Nghiên cứu của Hoàng Anh Vũ cũng trên người Kinh cho tỷ lệ đột biến LREA và biến thể xóa đoạn exon 19 thấp hơn đột biến L858R exon 21 (lần lượt là 25% và 42,9%). Sự khác biệt này có thể do kỹ thuật xác định đột biến, tác giả sử dụng kỹ thuật pyrosequencing có độ nhạy kém hơn Scorpion ARMS.

Nghiên cứu phát hiện 4 đột biến mới, chưa công bố trên y văn, gồm đột biến xóa đoạn nhỏ exon 18 và 20, xóa đoạn dài exon 21 và thêm đoạn exon 21. Không loại trừ đây là những đột biến đặc biệt ở người Kinh. Bốn đột biến này xuất hiện với tỷ lệ rất thấp (mỗi đột biến chỉ có 1 trường hợp) và hiện tại chưa rõ có ảnh hưởng ra sao đối với thuốc điều trị đích hoặc có thể chỉ là những đột biến vô nghĩa. Chính vì vậy, bốn bệnh nhân mang bốn đột biến này không được đưa vào nhóm được điều trị erlotinib. Việc xác định một đột biến mới có ảnh hưởng đến tính đáp ứng với thuốc điều trị đích hay không là một công việc lâu dài và tốn kém ở mức độ RNA, protein và thử nghiệm trên cả mô hình tế bào, động vật và người bệnh. Mặt khác, với tần suất quá thấp, việc theo dõi, đánh giá ảnh hưởng của bốn đột biến này trên một quần thể để có ý nghĩa thống kê là rất khó khăn. Trong khuôn khổ của nghiên cứu, vì nguồn bệnh mang những đột biến trên quá ít nên chưa thể làm rõ được vấn đề này.

Trong khi các đột biến mới trên exon gen EGFR được phát hiện trong nghiên cứu chiếm tỷ lệ 3,8% và đều là các đột biến xóa đoạn exon 18, 20, 21 và thêm đoạn exon 21, thì trong nghiên cứu của Hoàng Anh Vũ, đột biến mới chiếm tỷ lệ 10,7% và đều là các đột biến điểm ở exon 20 và 21. Hoàng Anh Vũ còn phát hiện được 2 đột biến trong vùng cắt nối của intron 18 (IVS18-3T>C và IVS18-1G>T) [111]. Đây là những đột biến có thể ảnh hưởng đến quá trình nối ghép RNA của gen EGFR, nhưng tác giả không thể khẳng định

được chính xác kiểu nối ghép sai vì không có mẫu mô phù hợp cho khảo sát ở mức RNA. Tuy nhiên, do đây không phải là vùng tập trung các đột biến ảnh hưởng đến tính đáp ứng với EGFR TKIs nên không nằm trong mục tiêu của nghiên cứu.

Sau khi đã loại trừ 4 trường hợp đột biến mới, tỷ lệ các đột biến gen EGFR làm tăng tính nhạy cảm với thuốc EGFR TKIs chiếm đa số trong nghiên cứu (99/102 trường hợp, 97,0%), trong khi các đột biến kháng thuốc chỉ có 3/102 trường hợp (3,0%). Đột biến T790M đơn độc ở exon 20 có 1 trường hợp, chiếm 1/3 trong số đột biến kháng thuốc. Các tỷ lệ tương đồng với các thống kê trước đây trên thế giới [38], [152], [153]. Hoàng Anh Vũ xác định đột biến EGFR trên 71 bệnh nhân UTPKTBN người Kinh nhưng không phát hiện trường hợp đột biến kháng thuốc nào đã được công bố [111]. Đặc biệt, 2/3 đột biến kháng thuốc trong nghiên cứu rơi vào hai bệnh nhân mang đột biến đôi. Bệnh nhân thứ nhất mang đồng thời 2 đột biến S768I + V769L (exon 20) gây kháng thuốc EGFR TKIs đã được công bố [123]. Bệnh nhân thứ hai mang đồng thời 2 đột biến T790M (exon 20) + L858R (exon 21). Tuy trên thế giới đã có một số báo cáo nhưng đây là lần đầu tiên tại Việt Nam xác định được về những trường hợp đột biến đôi như trên [116], [146], [147]. Đột biến T790M+L858R là một trường hợp đột biến đôi phức tạp khi mang đồng thời đột biến gây kháng và tăng nhạy cảm EGFR TKIs. Tỷ lệ đột biến đôi gen EGFR ở bệnh nhân UTPKTBN thể biểu mô tuyến được báo cáo từ 13% [155] đến 17,9% [134]. Nghiên cứu khả năng đáp ứng với gefitinib ở cấp độ *in vitro* của trường hợp đột biến T790M + L858R cho thấy tình trạng kháng thuốc rất mạnh dù đột biến L858R nếu đứng riêng rẽ sẽ làm tăng tính nhạy cảm thuốc rất cao do bộ đôi làm tăng ái lực gắn kết ATP của EGFR gấp 5 lần đột biến L858R [155], [156]. Phát hiện đột biến đôi cho thấy tế bào ác tính trong khối u đã tích lũy khá nhiều các biến đổi ở cấp độ phân tử.

Tỷ lệ đột biến exon 18-21 gen EGFR liên quan đến tính đáp ứng thuốc EGFR TKIs trong quần thể bệnh nhân UTPKTBN tại Việt Nam là khá cao 58,6%. Trong đó, đột biến xóa đoạn exon 19 và đột biến điểm exon 21 làm tăng tính nhạy cảm với EGFR TKIs chiếm đa số. Do đó, việc xét nghiệm đột biến gen EGFR trong UTPKTBN có ý nghĩa hết sức quan trọng, giúp đưa ra những bằng chứng chính xác về tình trạng gen để từ đó các bác sĩ lâm sàng có thể chỉ định những phác đồ điều trị thực sự có hiệu quả đối với bệnh nhân.

4.1.3. Tỷ lệ đột biến gen KRAS

Khoảng 15-25% các bệnh nhân UTPKTBN có mang đột biến gen KRAS. Trong các nghiên cứu lâm sàng, đột biến codon 12 và 13 của KRAS đã được chứng minh là yếu tố gây kháng nguyên phát với các thuốc ức chế EGFR [49], [157], [158]. Hơn 95% trường hợp đột biến KRAS xảy ra ở codon 12 và 13 của exon 2; các đột biến KRAS tại codon 61 và 146 rất hiếm gặp và ý nghĩa lâm sàng cũng chưa rõ ràng [159]. Trong nghiên cứu này, exon 2 của gen KRAS, là vùng chứa codon 12 và 13 được xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS. Trên 181 bệnh nhân được khảo sát đột biến gen KRAS, có 28 trường hợp mang đột biến ở codon 12 hoặc codon 13, chiếm 15,5%. Tỷ lệ này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây (Bảng 4.4). Tỷ lệ đột biến codon 12 và 13 của exon 2 gen KRAS trong bệnh UTPKTBN tại châu Á đã được báo cáo là thấp hơn các quốc gia Âu Mỹ [52], [160]. Tỷ lệ này trên người Việt Nam trong nghiên cứu cao hơn tỷ lệ trên người Trung Quốc và Triều Tiên [161], [162] có lẽ do nghiên cứu kết hợp 2 kỹ thuật giải trình tự và Scorpion ARMS giúp tìm ra nhiều đột biến hơn, không loại trừ đột biến gen KRAS có thể phổ biến hơn ở người Kinh. Ngoài các yếu tố về dịch tễ đã được xác định như chủng tộc, giới tính, thói quen hút thuốc và loại mô bệnh học, tỷ lệ đột biến gen KRAS còn chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố kỹ thuật tương tự như đột biến gen EGFR.

Bảng 4.4. Tỷ lệ đột biến gen KRAS trong bệnh UTPKTBN ở một số nghiên cứu trên thế giới

Tác giả	Chủng tộc	Cỡ mẫu	Kỹ thuật	Tỷ lệ đột biến chung	Đột biến codon 12	Đột biến codon 13
Miller VA (2008) [158]	Âu Mỹ	80	Giải trình tự	22,5%	-	-
Sun L (2011) [162]	Trung Quốc	160	Giải trình tự	5%	62,5%	37,5%
Boch C (2013) [135]	Âu Mỹ	552	Real-time PCR	15,4%	86%	14%
Sun J-M (2013) [161]	Triều Tiên	484	Giải trình tự	8%	95%	5%
Nghiên cứu này (2014)	Việt Nam	181	Giải trình tự và Scorpion ARMS	15,5%	82,2%	17,8%

Trong những đột biến codon 12-13 exon 2 gen KRAS đã phát hiện trong nghiên cứu, đột biến codon 12 chiếm ưu thế 82,2% với đột biến G12D chiếm tỷ lệ cao nhất 35,7%, kế đến là đột biến G12V với 17,8%. Đột biến G12C và G12A ít gặp hơn, tỷ lệ lần lượt là 14,3% và 10,7%. Đột biến G12S ít gặp nhất (3,6%). Đột biến codon 13 chỉ chiếm 17,8% và chỉ gồm 1 loại đột biến G13D. Các đột biến KRAS phát hiện trong nghiên cứu đều đã được báo cáo và có tỷ lệ tương đồng trên cơ sở dữ liệu COSMIC [123]. Nghiên cứu không phát hiện được trường hợp đột biến KRAS mới do chỉ tập trung vào codon 12-13, là vị trí có tỷ lệ đột biến cao nhất và có ý nghĩa trong điều trị đích. Chiều dài của đoạn gen được khảo sát không dài nên hầu như tất cả các đột biến tại đây đều đã được công bố.

Một điểm đáng quan tâm là nghiên cứu phát hiện đột biến KRAS trong nhóm có mang đột biến EGFR và nhóm không có đột biến EGFR (Bảng 3.10). Các nghiên cứu trước đây thường ghi nhận rằng đột biến gen KRAS

hiện diện trong những khối u có gen EGFR và ALK bình thường, nói một cách khác là đột biến KRAS và các đột biến gen khác trong UTPKTBN loại trừ lẫn nhau [157], [163]. Tuy nhiên, khi ứng dụng kỹ thuật có độ nhạy cao để phát hiện đột biến KRAS, như kỹ thuật giải trình tự alen đột biến (mutant-allele sequencing), cũng có những nghiên cứu ghi nhận đột biến KRAS gặp trong những trường hợp có đột biến EGFR và là nguyên nhân kháng erlotinib và gefitinib nguyên phát [164], [165]. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong UTPKTBN cần khảo sát đồng thời cả hai đột biến gen EGFR và KRAS để giúp chọn lựa bệnh nhân phù hợp cho điều trị đích bằng erlotinib và gefitinib.

4.2. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ ĐÍCH BƯỚC 1 BẰNG ERLOTINIB TRÊN BỆNH NHÂN UTPKTBN CÓ ĐỘT BIẾN GEN EGFR

Trên 70% trường hợp UTPKTBN khi được phát hiện đã ở giai đoạn tiến xa (IIIB/IV), người bệnh không còn khả năng phẫu thuật. Liệu pháp hóa trị kết hợp hai thuốc có chứa platinum (như carboplatin và paclitaxel), vốn được xem là liệu pháp hóa trị bước 1 chuẩn cho nhóm bệnh này [166], [167], đã đạt đến “trần” của hiệu quả điều trị với tỷ lệ OS 1 năm là khoảng 33% và 2 năm là khoảng 11% [166]. Trong bối cảnh đó, erlotinib và gefitinib đã cho thấy hiệu quả vượt trội so với hóa chất truyền thống đặc biệt trên nhóm bệnh nhân có đột biến gen EGFR [90], [91]. Nhiều nghiên cứu lâm sàng sử dụng đơn trị EGFR TKIs bước 1 trên các bệnh nhân có đột biến EGFR đều cho ORR cao, khoảng 50-70%, với sự cải thiện ấn tượng về cả PFS (khoảng 6-14 tháng) và OS (20-24 tháng) [85], [86], [87], [88], [89].

Ngoài ra, trong những con đường truyền tín hiệu nội bào của thụ thể EGFR, có sự tham gia của trục RAS/RAF/MAPK [33]. Nếu KRAS ở trạng thái bình thường (KRAS lành tính), hoạt động của nó phụ thuộc vào hoạt tính của thụ thể

EGFR. Trái lại, KRAS đột biến sẽ tự hoạt hóa không phụ thuộc EGFR. Các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng trong UTPKTBN đã chứng minh rằng điều trị bằng thuốc ức chế đặc hiệu EGFR chỉ có hiệu quả trong những trường hợp không kèm đột biến tại KRAS [46], [47], [48], [49]. Do đó, các bệnh nhân được điều trị erlotinib trong nghiên cứu này đều không có đột biến gen KRAS.

Quần thể nghiên cứu gồm các bệnh nhân thuộc dân tộc Kinh (Đông Á), có tỷ lệ không hút thuốc cao, chỉ gồm ung thư thể biểu mô tuyến và tất cả đều mang đột biến gen EGFR tăng tính nhạy cảm với erlotinib. Đây là những yếu tố tiên lượng lâm sàng và cận lâm sàng cho đáp ứng tốt với erlotinib [44], [45].

4.2.1. Đáp ứng điều trị

Ở giai đoạn muộn, việc cải thiện chất lượng sống được đặt lên hàng đầu, vì vậy hóa trị toàn thân (cả hóa chất truyền thống và thuốc điều trị đích) có vai trò chủ yếu là giảm nhẹ triệu chứng (cả cơ năng và thực thể) và kéo dài OS cho người bệnh. Các thuốc ức chế hoạt tính tyrosine kinase của EGFR thế hệ đầu, gồm gefitinib và erlotinib, cho hiệu quả đáp ứng lâm sàng tốt với ORR cao từ 43-73% và OS trung bình là 19-31 tháng [90], [92]. Trong nghiên cứu này, hiệu quả điều trị bệnh được đánh giá dựa trên đáp ứng thực thể (theo tiêu chuẩn RECIST) và đáp ứng toàn trạng (theo chỉ số Karnofski).

4.2.1.1. Đáp ứng thực thể

Nghiên cứu chỉ ghi nhận duy nhất một trường hợp đáp ứng hoàn toàn trong tổng số 61 bệnh nhân được điều trị đích bước 1 bằng erlotinib. Đáp ứng hoàn toàn hiếm khi đạt được ở bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối vì kích thước u lớn, xâm lấn và có thể đã cho di căn xa. Do đó, ghi nhận được đáp ứng hoàn toàn ở tháng thứ 9 điều trị cho thấy hiệu quả tốt của điều trị đích nói chung và erlotinib nói riêng trên những bệnh nhân có đột biến gen EGFR. Tỷ lệ đáp

ứng ORR của bệnh nhân trong nghiên cứu đạt cao nhất là 63,9% tại thời điểm tháng thứ 6 sau điều trị. Đây là ORR khá cao nếu so với ORR trong các nghiên cứu đã thực hiện về hiệu quả điều trị của erlotinib trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn tại Việt Nam. Nghiên cứu của Lê Thượng Vũ và cộng sự có ORR là 35,5%, thấp hơn trong nghiên cứu này do nhóm tác giả không xác định tình trạng đột biến gen EGFR và cũng không phân biệt điều trị bước 1 hoặc bước 2 [115]. Nghiên cứu của Nguyễn Tuyết Mai báo cáo ORR chỉ có 15% do tiến hành điều trị erlotinib bước 2 trên bệnh nhân đã thất bại nhiều hơn một phác đồ hóa trị có platinum [114].

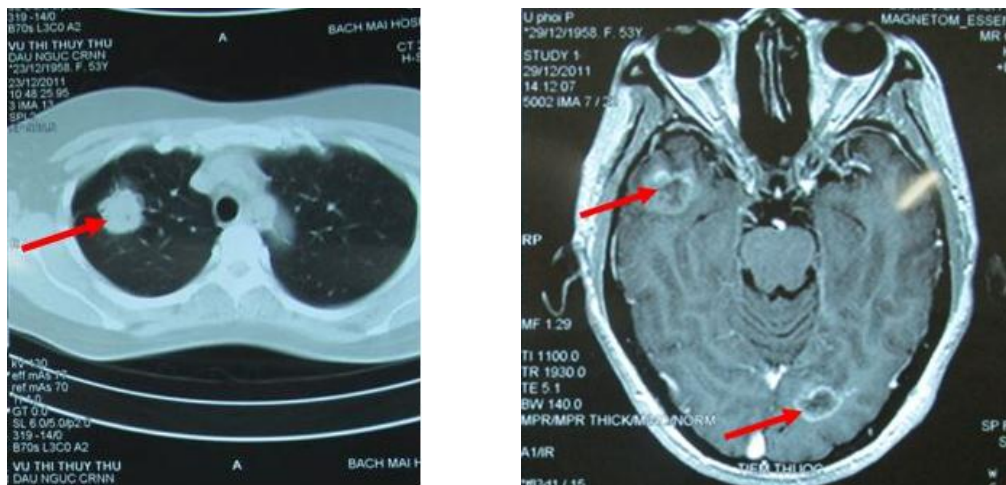
Bảng 4.5. So sánh ORR ở bệnh nhân có đột biến gen EGFR với các nghiên cứu trên thế giới

Tác giả	n	EGFR TKI	ORR
Sequist LV (2008) [88]	31	Gefitinib bước 1	55%
Tamura K (2008) [169]	28	Gefitinib bước 1	75%
Mok T. (2009) [90]	132	Gefitinib bước 1	71,4%
Inoue A (2009) [87]	30	Gefitinib bước 1	66%
Jeanne PA. (2012) [168]	32	Erlotinib bước 1	66%
Nghiên cứu này (2014)	61	Erlotinib bước 1	63,9%

Tỷ lệ ORR trong nghiên cứu này củng cố những kết luận đã được rút ra từ các nghiên cứu trước đó là thuốc EGFR TKIs hiệu quả tốt trên những bệnh nhân có đột biến gen EGFR. Sequist và cộng sự điều trị gefitinib trên 31 bệnh nhân (đã được chọn lựa dựa vào các đặc điểm lâm sàng) có đột biến EGFR và ghi nhận ORR là 54,8%, trong đó chỉ có 2 bệnh nhân là người châu Á [88]. Khi tiến hành điều trị gefitinib hoặc erlotinib bước 1 trên đối tượng bệnh nhân

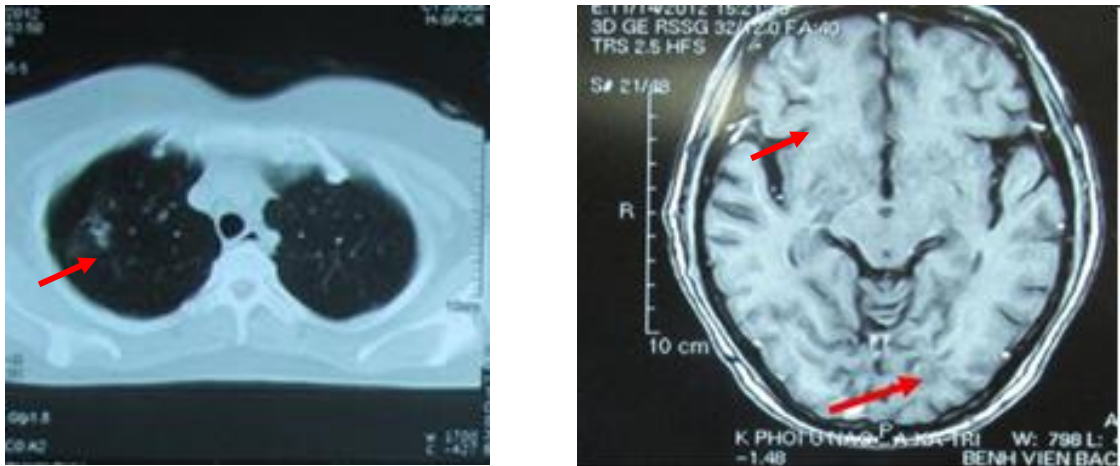
châu Á có đột biến gen EGFR, ORR trong nghiên cứu của Tamura và cộng sự là 75%, của Mok và cộng sự là 71,4%, của Inoue và cộng sự là 66% và của Jeanne và cộng sự là 66% [87], [90], [168], [169].

Minh họa trường hợp đáp ứng hoàn toàn: Bệnh nhân VTTT (mã số mẫu 110) mang đột biến điểm L858R exon 21 gen EGFR và đạt đáp ứng hoàn toàn vào tháng thứ 9 điều trị. Đây là bệnh nhân nữ, 58 tuổi, không hút thuốc lá, khi phát hiện thì bệnh đã vào giai đoạn IV di căn não đa ổ, mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến. Trước khi điều trị, kích thước khối u phổi phải của bệnh nhân là 34x29 mm trên phim PET-CT kèm theo hình ảnh di căn xương đa ổ, nồng độ CEA là > 1000 ng/mL (bình thường < 4 ng/mL). Sau 9 tháng điều trị erlotinib, khối u phổi của bệnh nhân teo nhỏ hoàn toàn chỉ còn tổn thương xơ hóa, các tổn thương não biến mất hoàn toàn và nồng độ CEA giảm còn 4,4 ng/mL. Bệnh nhân có thể sinh hoạt bình thường (Hình 4.2 và 4.3).



Hình 4.2. Hình ảnh CT ngực (bên trái) và MRI sọ não (bên phải) ở thời điểm trước điều trị erlotinib của bệnh nhân VTTT:

Khối u phổi phải kích thước 34x29 mm (hình bên trái, mũi tên) và hai tổn thương di căn não (hình bên phải, mũi tên)

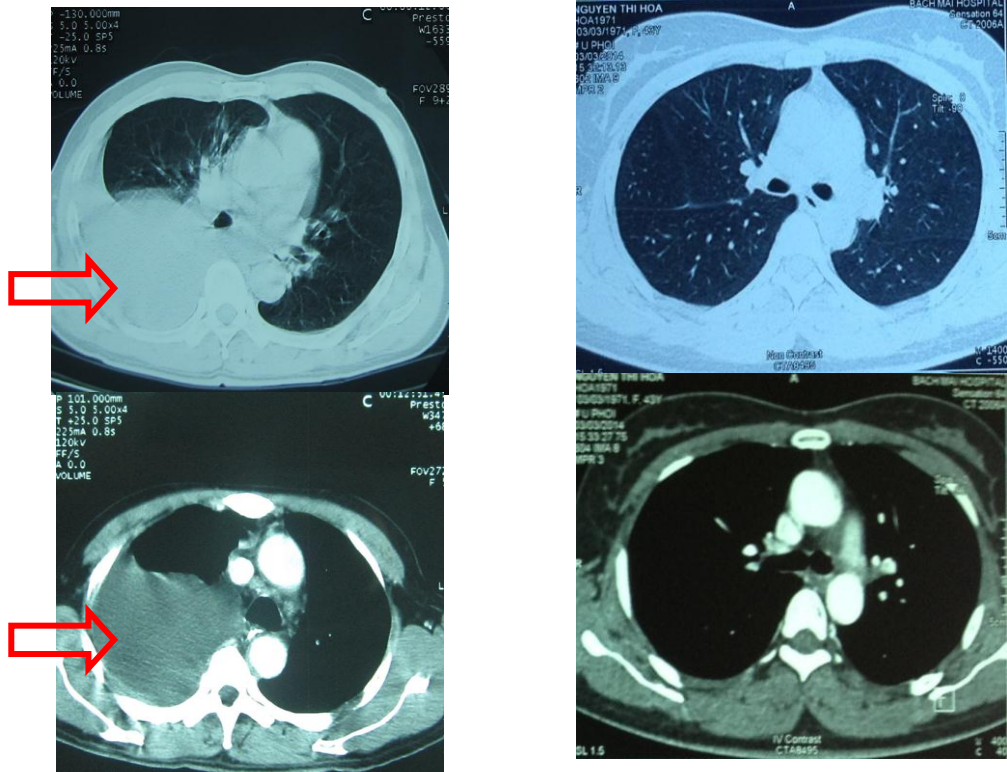


Hình 4.3. Hình ảnh CT ngực (bên trái) và MRI sọ não (bên phải) ở thời điểm tháng thứ 9 sau điều trị erlotinib của bệnh nhân VTTT

Vị trí khối u phổi phải lúc trước chỉ còn tổn thương xơ hóa rất nhỏ (hình bên trái, mũi tên) và hai tổn thương di căn não biến mất hoàn toàn (hình bên phải, mũi tên)

Minh họa trường hợp đáp ứng một phần: Bệnh nhân NTH (mã số mẫu 179), nữ, 42 tuổi, nhập viện do đau ngực phải, đau vùng xương chậu phải, khó thở, khám phát hiện tràn dịch màng phổi phải, xét nghiệm tế bào học là UT biểu mô tuyến. Nồng độ CEA lúc nhập viện là 306,3 ng/mL, chụp CT ngực có tràn dịch màng phổi phải, hạch trung thất, MRI sọ não bình thường, có di căn xương tại đốt sống D10 và khớp cùng chậu hai bên. Bệnh nhân được chẩn đoán UTP phải di căn màng phổi, hạch trung thất, xương. Xét nghiệm có đột biến LREA exon 19 gen EGFR. Do đó, bệnh nhân đã được điều trị bằng erlotinib 150mg 1 viên/ngày, kết hợp với chống hủy xương và giảm đau. Sau điều trị khoảng 7-10 ngày, bệnh nhân xuất hiện nổi mụn da vùng mặt độ I (tác dụng phụ của erlotinib). Sau khoảng 1 tháng, bệnh nhân không còn triệu chứng đau, không khó thở, có thể sinh hoạt, làm việc bình thường, không phải dùng thuốc giảm đau. Nồng độ CEA từ 306,3 ng/mL giảm còn 215,4 ng/mL. Trên hình ảnh PET/CT, nhu mô hai phổi không thấy tổ chức hấp thu F-18 FDG bất thường, không thấy tràn dịch màng phổi, còn hạch rốn phổi phải

đường kính 0,9cm, tăng hấp thu F-18 FDG, max SUV=2,8, xương chậu phải tăng hấp thu F-18 FDG, max SUV=6,17, hình khuyết xương thân D10 không tăng hấp thu F-18 FDG.

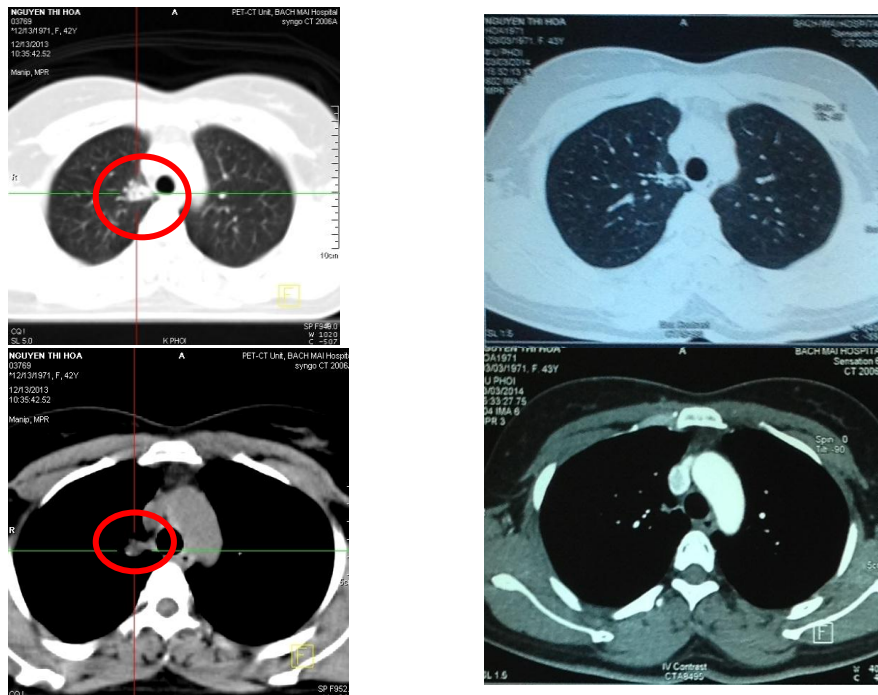


Hình 4.4. Hình ảnh MSCT ngực của bệnh nhân NTH trước và sau 1 tháng điều trị erlotinib

Chụp MSCT ngực trước điều trị (bên trái) cho hình ảnh tràn dịch màng phổi phải lượng nhiều.

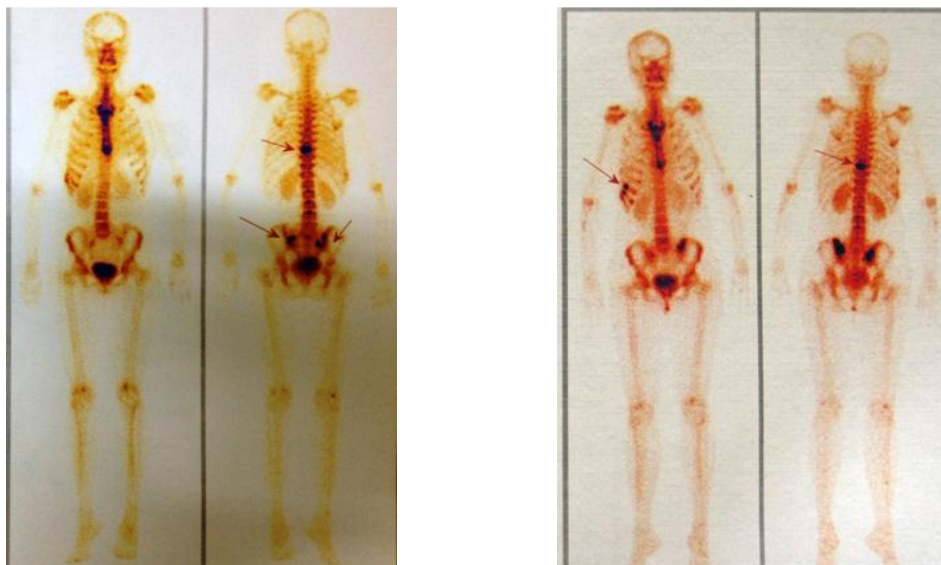
Chụp MSCT ngực sau điều trị erlotinib 1 tháng (bên phải) không còn dịch màng phổi.

Sau 5 tháng điều trị erlotinib, bệnh nhân không còn triệu chứng cơ năng, sinh hoạt và làm việc bình thường. Chụp MSCT ngực không thấy bất thường, không còn thấy hạch rốn phổi, xạ hình xương còn tăng hoạt độ phóng xạ tại D10, cung trước xương sườn 9,10 và xương chậu bên trái. Nồng độ CEA giảm còn 4,12 ng/mL. Đánh giá hiệu quả điều trị erlotinib: bệnh nhân NTH đạt đáp ứng một phần với triệu chứng lâm sàng và toàn trạng cải thiện tốt, không thấy tác dụng phụ trên tủy xương, gan và thận.



Hình 4.5. Hình ảnh MSCT ngực của bệnh nhân NTH sau 1 tháng và sau 5 tháng điều trị erlotinib

MSCT ngực sau điều trị 1 tháng (bên trái) cho hình ảnh hạch rốn phổi phải 0,9cm. MSCT ngực sau điều trị 5 tháng (bên phải) không còn hạch rốn phổi phải.



Hình 4.6. Hình ảnh xạ hình xương của bệnh nhân NTH trước và sau 5 tháng điều trị erlotinib

Xạ hình xương trước điều trị (trái) cho thấy tăng hoạt độ phóng xạ tại đốt sống D10 và khớp cùng chậu hai bên. Xạ hình xương sau 5 tháng điều trị (phải) cho thấy tăng hoạt độ phóng xạ tại đốt sống D10, cung sườn 9-10 và xương cánh chậu trái.

Tuy nhiên, sau khi đạt giá trị cao nhất tại thời điểm tháng thứ 6, ORR bắt đầu giảm dần, gợi ý một tình trạng kháng thuốc thứ phát. Có thể sự tiếp xúc với erlotinib một thời gian đã kích thích sự phát sinh một số rối loạn ở cấp độ phân tử gây kháng với EGFR TKIs như đột biến T790M exon 20 gen EGFR [99], [100], sự khuếch đại thụ thể MET [102], tăng biểu hiện yếu tố phát triển tế bào gan HGF [104] ... Do không thể tiến hành sinh thiết lại để xét nghiệm, đồng thời tại Việt Nam cũng chưa có điều kiện để xác định các rối loạn di truyền này nên nguyên nhân bệnh tiến triển sau một thời gian dùng thuốc vẫn chưa được tìm hiểu.

Bên cạnh đó, có 2 bệnh nhân có bệnh tiến triển chỉ sau một thời gian dùng thuốc rất ngắn và đã được xếp vào nhóm nghi ngờ kháng thuốc nguyên phát. Trong phạm vi nghiên cứu đã loại trừ đột biến codon 12-13 gen KRAS và các đột biến gen EGFR kháng thuốc cũng như các đột biến gen EGFR mới chưa công bố, là những nguyên nhân kháng erlotinib hoặc gefitinib nguyên phát đã được báo cáo [46], [48], [123]. Tuy nhiên, còn có các biến đổi ở cấp độ phân tử khác, tồn tại độc lập với những đột biến trên, gây kháng với erlotinib và gefitinib, như sự hiện diện của đột biến codon 600 gen BRAF [61] và phức hợp chuyển đoạn gen ALK-EML4 [170]. Các biến đổi di truyền này, nếu không được xác định trước khi quyết định điều trị đích cùng lúc với đột biến gen EGFR và KRAS, sẽ gây lãng phí cho nền y tế. Do đó, cần nhanh chóng xây dựng quy trình kỹ thuật xác định các rối loạn liên quan đến tình trạng kháng thuốc điều trị đích, đặc biệt là tình trạng kháng nguyên phát.

4.2.1.2. Đáp ứng toàn trạng

Tỷ lệ bệnh nhân có chỉ số Karnoski ổn định/tăng đạt cao nhất vào tháng thứ 3 sau điều trị (96,7%). 2 bệnh nhân không hề có cải thiện toàn trạng sau dùng thuốc. Có thể hai bệnh nhân này có một rối loạn ở cấp độ phân tử khác

gây kháng với erlotinib như đã đề cập ở mục 4.2.1.1. Tỷ lệ bệnh nhân có chỉ số Karnoski ổn định/tăng giảm dần ở các thời điểm đánh giá điều trị sau, tương ứng với sự tăng dần của tỷ lệ bệnh tiến triển. Ở một số trường hợp, việc triệu chứng cơ năng tái lập và toàn trạng xấu đi xuất hiện sau tình trạng tiến triển thực thể, có thể do người bệnh được theo dõi sát bằng các phương tiện cận lâm sàng nên phát hiện bệnh tiến triển sớm.

Chỉ số Karnofsky tăng chứng tỏ toàn trạng người bệnh khá lên, chất lượng sống có cải thiện. Trên bệnh nhân điều trị erlotinib có đáp ứng, cải thiện triệu chứng thường được ghi nhận ở ngay tháng đầu ở 80% bệnh nhân. Các bệnh nhân này cảm thấy đỡ đau, ăn uống được, tinh thần lạc quan, một số tình trạng ban đầu như tràn dịch màng phổi giảm nên đỡ khó thở, ho và giảm yếu liệt do giảm được tình trạng phù não do di căn não. Một số bệnh nhân dù đáp ứng chỉ ở mức *bệnh giữ nguyên* nhưng về cơ năng dung nạp thuốc tốt, bệnh nhân cảm thấy đỡ mệt, ăn uống khá hơn, chất lượng sống được nâng cao. Các bệnh nhân điều trị erlotinib bằng đường uống còn tránh được tình mệt mỏi, chán ăn và buồn nôn trong những ngày sau truyền hóa chất.

Điển hình cho việc cải thiện triệu chứng và đáp ứng toàn trạng tốt là trường hợp bệnh nhân NVH (mã số mẫu 76) 66 tuổi, giới tính nam, có tiền căn hút thuốc lá nhưng đã bỏ được 10 năm, bị UTPKTBN giai đoạn IV thể biểu mô tuyến, di căn xương và não đa ổ, mang đột biến L858R exon 21 gen EGFR. Bệnh nhân dung nạp thuốc tốt, chỉ bị phát ban thể nổi mụn độ 2. Sau 5 tháng điều trị erlotinib, bệnh nhân đạt đáp ứng một phần với kích thước u từ 44x35mm giảm còn 23x14mm, nồng độ CEA từ 31,6 ng/mL giảm còn 18,6 ng/mL (bình thường < 4ng/mL). Bệnh nhân có đáp ứng toàn trạng rất tốt. Từ tình trạng di căn xương gây đau nhức xương không giảm với thuốc giảm đau, di căn não gây yếu liệt nửa người trái không thể di chuyển, đau ngực, bệnh

nhân đã hết đau ngực, giảm đau xương có thể chịu được không dùng giảm đau và hết liệt, có thể tự đi lại được bằng nạng.

4.2.2. Thời gian sống thêm

Trung vị PFS và OS trong nghiên cứu này lần lượt là 9,4 tháng và 15,5 tháng, tương đồng so với báo cáo của Inoue, Sequist, Mok và Tamura [87], [88], [90], [169], nhưng lại có khác biệt so với của Jeanne (trung vị PFS và OS lần lượt là 14,1 và 31,3 tháng) dù cũng trên bệnh nhân châu Á, có thể do thời gian nghiên cứu của Jeanne là 44 tháng nên theo dõi sống còn kéo dài hơn [168]. Khi so sánh với các phác đồ hóa trị truyền thống 2 thuốc có platinum trên cùng đối tượng bệnh nhân ở một số nghiên cứu khác, PFS và OS của nghiên cứu này đều kéo dài hơn, ví dụ trong nghiên cứu IPASS, điều trị bước 1 phác đồ carboplatin/paclitaxel trên bệnh nhân có đột biến gen EGFR, cho trung vị PFS chỉ có 5,8 tháng [90]. Các phác đồ hóa trị 2 thuốc khác trên quần thể bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn nói chung đều cho PFS trong khoảng < 6 tháng [166]. Tỷ lệ bệnh nhân còn sống sau 1 năm trong nghiên cứu này là 74,9%, cao hơn của Mok là 58% và của các báo cáo trên nhóm hóa trị truyền thống là khoảng 33% [90],[166]. Như vậy, erlotinib thực sự có hiệu quả, kéo dài được PFS và OS cho người bệnh có đột biến gen EGFR, đặc biệt là bệnh nhân châu Á.

Một số nghiên cứu đã công bố mối tương quan giữa hiệu quả của erlotinib với giới tính, thể mô bệnh học, tình trạng hút thuốc lá và chủng tộc [44], [45]. Tuy nhiên, do quần thể nghiên cứu có tỷ lệ nam cao hơn nữ và nhóm tuổi ≥ 65 chiếm ưu thế nên chỉ có độ tuổi được ghi nhận là yếu tố giúp kéo dài thời gian PFS ($p < 0,04$). Lợi ích này không quan sát được ở thời gian OS cũng như ở các phân nhóm giới tính và tình trạng hút thuốc lá.

Bảng 4.6. So sánh thời gian sống thêm ở bệnh nhân có đột biến gen EGFR với các nghiên cứu trên thế giới

Tác giả	n	EGFR TKI	Trung vị PFS (tháng)	Trung vị OS (tháng)
Sequist LV (2008) [88]	31	Gefitinib bước 1	9,2	-
Tamura K (2008) [169]	28	Gefitinib bước 1	11,5	-
Mok T. (2009) [90]	132	Gefitinib bước 1	10,0	-
Inoue A (2009) [87]	30	Gefitinib bước 1	8,5	17,8
Jeanne PA. (2012) [168]	32	Erlotinib bước 1	14,1	31,3
Nghiên cứu này (2014)	61	Erlotinib bước 1	9,4	15,5

PFS và OS dài nhất trong nghiên cứu thuộc về bệnh nhân VTTT (mã số mẫu 110) và bệnh nhân NVT (mã số mẫu 49). Bệnh nhân VTTT đạt đáp ứng hoàn toàn ở tháng điều trị thứ 9 (đã đề cập ở phần *Tỷ lệ đáp ứng*) và bệnh tiến triển ở tháng thứ 18. Bệnh nhân NVT, nam, 62 tuổi, không hút thuốc lá, UTPKTBN giai đoạn IIIB thể biểu mô tuyến, đột biến LREA exon 19 gen EGFR. Bệnh nhân bắt đầu điều trị erlotinib tại Trung Quốc. Sau một thời gian, bệnh nhân trở về Việt Nam, tiếp tục với erlotinib và đạt được đáp ứng một phần. Kích thước khối u phổi thu nhỏ và xơ hóa tuy chưa thể đạt được đáp ứng hoàn toàn. Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu, bệnh nhân đã điều trị erlotinib tổng cộng được 48 tháng và bệnh vẫn chưa có dấu hiệu tiến triển. Kích thước khối u còn 15x10mm, các mô quanh u xơ hóa, nồng độ CEA ổn định ở mức dưới ngưỡng bình thường và toàn trạng bệnh nhân tốt, ở mức 90% (theo chỉ số Karnofski). Những trường hợp đáp ứng tốt với thời gian sống thêm kéo dài nêu trên là một tín hiệu rất khích lệ, đem lại niềm hy vọng cho

những bệnh nhân UTPKTBN, đặc biệt là những bệnh nhân có đột biến gen EGFR tăng tính nhạy cảm thuốc EGFR TKIs.

Tóm lại, erlotinib cần được chỉ định bước 1 trên các bệnh nhân có đột biến EGFR làm tăng tính nhạy cảm với thuốc EGFR TKIs. Trên các bệnh nhân bước 1 không thể hóa trị, nên xem xét điều trị erlotinib nếu là bệnh nhân châu Á và ung thư thể biểu mô tuyến. Tốt nhất là cần có kết quả xét nghiệm tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS trước khi lựa chọn phác đồ điều trị để người bệnh đạt được hiệu quả điều trị tối ưu, tránh những trường hợp điều trị thử, chờ đợi rồi thay đổi phác đồ. Bởi khi này có thể đã quá trễ cho người bệnh dù có thuộc nhóm nhạy cảm với erlotinib hoặc gefitinib.

4.2.3. Tác dụng phụ của erlotinib

Tác dụng phụ của thuốc điều trị giúp đánh giá sự dung nạp thuốc của cơ thể người bệnh, góp phần vào quyết định duy trì một phác đồ điều trị cho bệnh nhân. Đã có những trường hợp thuốc cho kết quả đáp ứng rất tốt nhưng bác sỹ phải dừng điều trị do xuất hiện những tác dụng phụ không chấp nhận được cho cơ thể người bệnh. So với các phác đồ hóa trị cổ điển có platinum, điều trị đích bằng erlotinib hoặc gefitinib được ghi nhận có sự dung nạp tốt hơn và ít các tác dụng phụ ở mức độ trung bình-nặng hơn, đặc biệt là tác dụng phụ trên hệ tạo huyết [90], [168]. Trong nghiên cứu này, tác dụng phụ gặp nhiều nhất của erlotinib là phát ban thể nổi mụn ở da, chiếm tỷ lệ là 52,4% và tiêu chảy, chiếm tỷ lệ là 39,3%. Tuy nhiên, độ nặng của tác dụng phụ này hầu hết là độ I-II, có thể kiểm soát được bằng thuốc bôi ngoài da có corticoid hoặc giảm liều erlotinib đối với phát ban da và sử dụng loperamide đối với tiêu chảy. Có rất ít trường hợp tác dụng phụ trên hệ tạo huyết như giảm bạch cầu hạt (14,8%) và giảm huyết sắc tố (11,5%) mức độ nhẹ. Người bệnh không phải dùng những thuốc kích thích tăng sinh bạch cầu hoặc phải truyền các chế phẩm máu. Đây

cũng là một ưu điểm, cho thấy thuốc EGFR TKIs đường uống, như erlotinib và gefitinib, là một liệu pháp an toàn cho bệnh nhân UTPKTBN.

Phát ban da thể nổi mụn là một trong những tác dụng phụ chính của EGFR TKIs, bên cạnh tiêu chảy và viêm cạnh móng. Trong nghiên cứu này, phát ban da thể nổi mụn cũng chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm erlotinib. Nghiên cứu của Lee trên hơn 600 bệnh nhân da trắng ghi nhận erlotinib bước một kéo dài PFS nếu lựa chọn các bệnh nhân có phát ban da thể nổi mụn sớm trong tháng đầu tiên điều trị [171]. Trong một nghiên cứu tiền cứu, Fiala ghi nhận phát ban thể nổi mụn giúp tiên lượng hiệu quả erlotinib [172]. Phát ban da thể nổi mụn càng nặng, kết quả điều trị thường càng tốt [173]. Tuy nhiên, đến hiện tại, ASCO vẫn hướng dẫn điều trị erlotinib hoặc gefitinib bước 1 chỉ trên những bệnh nhân có đột biến EGFR [174]. Việc có thể sử dụng phát ban da thể nổi mụn như một hướng dẫn lựa chọn điều trị hay không cần được nghiên cứu thêm.

Như vậy, erlotinib cho tỷ lệ đáp ứng cao và đồng thời có ý nghĩa kéo dài thời gian PFS, OS, đặc biệt ở bệnh nhân Châu Á [90], [175]. Ngoài hiệu quả kháng ung thư tốt, đặc biệt trên nhóm bệnh nhân có đột biến gen EGFR, cách dùng thuốc qua đường uống thuận lợi, an toàn hơn cho người bệnh, đồng thời tránh được các độc tính tích lũy, nên điều trị đích bằng erlotinib là liệu pháp điều trị triển vọng cho bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn, nhất là những bệnh nhân lớn tuổi, toàn trạng không cho phép hóa trị toàn thân.

So với những nghiên cứu trước về đột biến gen cũng như hiệu quả điều trị của EGFR TKIs trên bệnh nhân UTPKTBN tại Việt Nam, tỷ lệ bệnh nhân được xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR, gen KRAS và được theo dõi điều trị đặc hiệu ung thư trong nghiên cứu này đã tăng lên [106], [112], [113], [114], [115], [116]. Tần suất đột biến gen EGFR và KRAS được xác định bằng hai

kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS giúp nâng cao độ nhạy của xét nghiệm và giảm tỷ lệ âm tính giả [138]. Không chỉ vậy, 100% các bệnh nhân điều trị erlotinib đều được xét nghiệm tìm đột biến gen giúp cho việc đánh giá hiệu quả điều trị được chính xác hơn. Điều này có thể nhờ sự góp phần của nhiều yếu tố: đời sống kinh tế xã hội cải thiện trong giai đoạn này, chính sách bảo hiểm y tế hỗ trợ và erlotinib có hiệu quả cao, tác dụng phụ ít nên được sử dụng trên nhiều bệnh nhân hơn.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, có những kết luận được rút ra như sau:

1. Xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS bằng hai kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS.

- Phát hiện được 106/181 bệnh nhân mang đột biến gen EGFR (58,6%). Tỷ lệ đột biến LREA (exon 19) và L858R (exon 21) là 48,2% và 40,7%, các đột biến khác chiếm 12,1%. Đột biến tăng tính nhạy cảm thuốc EGFR TKIs chiếm 97,0% còn đột biến kháng EGFR TKIs chiếm 3,0%. Trong đó, 2/106 bệnh nhân mang đột biến đôi; 4/106 bệnh nhân mang đột biến mới, gồm đột biến c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) c.2554/2555insACA (exon 21).

- Phát hiện được 28/181 bệnh nhân mang đột biến gen KRAS (15,5%). Tỷ lệ đột biến tại codon 12 là 82,2% và tại codon 13 là 17,8%. Không phát hiện đột biến mới tại codon 12-13 exon 2 gen KRAS và không phát hiện trường hợp mang cùng lúc 2 đột biến codon 12 và codon 13.

- Phát hiện 4/181 bệnh nhân cùng mang đột biến gen EGFR và KRAS (2,2%).

2. Đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1 bằng erlotinib

Lần đầu tiên tại Việt Nam, nghiên cứu bước đầu đánh giá hiệu quả điều trị bước 1 bằng erlotinib được thực hiện trên 61 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn, có đột biến gen EGFR, không có đột biến gen KRAS, cho hiệu quả tốt và kéo dài thời gian sống thêm với tỷ lệ đáp ứng là 63,9%, trung vị PFS là 9,4 tháng và trung vị OS là 15,5 tháng. Erlotinib đường uống có tính dung nạp tốt. Chỉ có độ tuổi < 65 tuổi được ghi nhận là yếu tố giúp kéo dài PFS (p=0,04).

KIẾN NGHỊ

Do thực tế điều trị ung thư nói chung và UTPKTBN nói riêng tại Việt Nam còn nhiều tranh cãi, nhất là đứng trước một liệu pháp điều trị đích mang lại hiệu quả nhưng còn mới mẻ, một bộ phận bệnh nhân vẫn phải chịu gánh nặng kinh tế khi theo đuổi liệu pháp điều trị này, nên việc lựa chọn bệnh nhân cho các nghiên cứu đánh giá và so sánh điều trị còn gặp nhiều khó khăn. Trong tương lai gần, khi điều trị đích cho UTPKTBN trở nên phổ biến hơn nữa tại Việt Nam, nghiên cứu cần mở rộng với cỡ mẫu lớn hơn, để đưa ra kết quả có ý nghĩa hơn về mặt thống kê và có được các kết luận chính xác cho từng nhóm bệnh nhân UTPKTBN. Do đó, nghiên cứu có các kiến nghị sau:

1. Cần phải xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR và KRAS cho bệnh nhân trước khi bắt đầu liệu trình điều trị đích bước 1 nhằm đem lại lợi ích cao nhất cho người bệnh.

Tuy nhiên, để giảm chi phí xét nghiệm, bước đầu nên sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen (có giá thành cạnh tranh hơn) để tầm soát đột biến. Những bệnh nhân nào có kết quả đột biến gen âm tính bằng kỹ thuật giải trình tự sẽ được xét nghiệm lại bằng kỹ thuật Scorpion ARMS.

2. Mở rộng nghiên cứu hiệu quả điều trị đích trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn có đột biến gen EGFR theo từng nhóm bệnh và theo các dạng đột biến khác nhau.

3. Xác định tính đáp ứng với thuốc EGFR TKIs của các đột biến gen EGFR mới phát hiện, gồm các đột biến xóa đoạn c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) và đột biến thêm đoạn c.2554/2555insACA (exon 21).

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Minh Hà, Trần Văn Khánh, Nguyễn Tuyết Mai và cộng sự (2012). Bước đầu đánh giá hiệu quả điều trị trúng đích trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ có và không có đột biến gen EGFR. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **80**(4), 13-21.
2. Nguyễn Minh Hà, Trần Văn Khánh, Phạm Huy Tàn, Nguyễn Tuyết Mai, Phạm Lê Anh Tuấn, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn (2013). Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự xác định đột biến gen EGFR ở mẫu mô ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Tạp chí Y Học Việt Nam*, **407**(1), 129-134.
3. Nguyễn Minh Hà, Trần Văn Khánh, Đỗ Đình Hồ, Tạ Thành Văn (2014). Hiệu quả điều trị trúng đích trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn muộn có và không có đột biến gen EGFR. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **87**(2), 6-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jemal A, Bray F, Ward E. et al (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **61**(2), 69-90.
2. Sato M., Shames D.S., Gazdar A.F. and Minna J.D (2007). A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol.*, **2**, 327-343.
3. Wistuba I.I., Mao L. and Gazdar A.F (2002). Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene*, **21**, 7298-306.
4. National Research Council, Committee on Health Risks of Exposure to radon, Board on Radiation Effects Research, Commission on Life Sciences (1999). Health effects of exposure to radon (BEIR VI). Washington, DC.: National Academy Press.
5. Riely G.J., Marks J. and Pao W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc AmThorac Soc*, **6**, 201–205.
6. Herbst R.S., Heymach J.V. and Lippman S.M. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med*, **359**, 1367–1380.
7. Marks J.L., Gong Y., Chitale D., et al (2008). Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*; **68**, 5524.
8. Nguyễn Bá Đức (2004). Ung thư phổi. Hoá chất điều trị bệnh ung thư. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.64 – 70, 289 – 397.
9. Vũ Văn Vũ, Đặng Thanh Hồng, Bùi Chí Viết và cộng sự (2004). Hoá trị ung thư phổi. *Ung bướu học nội khoa*, Nhà xuất bản Y học chi nhánh TP Hồ Chí Minh, tr.224 – 232, 467 – 468.

10. Võ Văn Xuân (2001). Ung thư phế quản phổi. *Hướng dẫn thực hành chẩn đoán điều trị ung thư*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr.167 – 178.
11. Schottenfeld D. and Searle J.G. (2005). The etiology and epidemiology of lung cancer. *Lung cancer principles and practice*, Lippilcott William & Wilkins, 3 – 20.
12. Schalhorn A., Fuerst H. and Stieber P. (2001). Tumor markers in lung cancer. *J Lab Med*, **25**, 353-361.
13. Pujol J.L., Molinier O., Ebert W. et al (2004). CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer*, **90**, 2097-2105.
14. Nguyễn Minh Hải, Đồng Khắc Hưng và Hoàng Đình Chân (2009). Giá trị của CEA trong chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*, **4(4)**, 92-96.
15. Nguyễn Minh Hải và Đồng Khắc Hưng (2011). Nghiên cứu giá trị tiên lượng của CEA trong ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Tạp chí Lao và Bệnh phổi*, **5-6**, 44-50.
16. Fukai R., Sakao Y., Sakuraba M. et al (2007). The prognostic value of carcinoembryonic antigen in T1N1M0 and T2N1M0 non-small cell carcinoma of the lung. *Eur J Cardiothorac Surg.*, **32**, 440-444.
17. Bates J., Rutherford R., Divilly M. et al (1997). Clinical value of CYFRA 21.1, carcinoembryonic antigen, neurone-specific enolase, tissue polypeptide specific antigen and tissue polypeptide antigen in the diagnosis of lung cancer. *Eur Respir J*, **10**, 2535–2538.

18. Buccheri G. and Ferrigno D. (2001). Serum biomarkers facilitate the recognition of early- stage cancer and may guide the selection of surgical candidates: A study of carcinoembryonic antigen and tissue polypeptide antigen in patients with operable non–small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **122**, 891-899.
19. Ebert W., Dienemann H., Fateh-Moghadam A. *et al* (1994). Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuro specific enolase in lung cancer. Results of an international multicenter study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*, **32**, 189-199.
20. Molina R, Filella X, Auge JM. *et al* (2003). Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumour Biol*, **24**, 209-218.
21. Travis W.D., Colby T.V., Corrin B. *et al*. In Collaboration with Sobin LH and Pathologists from 14 Countries (1999). World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Lung and Pleural Tumours”, 3rd Edn. Springer-Verlag.
22. Mai Trọng Khoa, Trần Đình Hà và cộng sự (2010). Giá trị của PET/CT trong chẩn đoán bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Tạp chí Y học TP.HCM*, **2**, 570-579.
23. Ciardiello F. and Tortora G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, **358**, 1160–1174.

24. Herbst R.S. and Lippman S.M (2007). Molecular signatures of lung cancer toward personalized therapy. *N Engl J Med.*, **356**, 76-78.
25. James H. and Doroshow M.D (2005). Targeting EGFR in Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.*, **353**, 200-202.
26. Rowell N.P. and Williams C.J.. (2001). Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review. *Thorax.*, **56**(8), 133-141.
27. Dosoretz D.E., Katin M.J., Blitzer P.H. et al (1992). Radiation therapy in the management of medically inoperable carcinoma of the lung: results and implications for future treatment strategies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, **24**(1), 3-9.
28. PORT Meta-analysis Trialists Group (1998). Postoperative radiotherapy in non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. *Lancet*, **352**(9124), 257-263.
29. Rusch V.W., Albain K.S., Crowley J.J. et al (1993). Surgical resection of stage IIIA and stage IIIB non-small cell lung cancer after concurrent induction chemoradiotherapy. A Southwest Oncology Group trial. *J Thrac Cardiovasc Surg.*, **105**(1), 97-104, discussion 104-106.
30. Rajeswaran A., Trojan A., Burnard B. et al (2008). Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first-line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Lung Cancer*, **59**(1), 1-11.

31. Beadsmoore C.J. and Screaton N.J (2003). Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol.*, **45**(1), 8-17.
32. Carpenter G., King L.Jr. and Cohen S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, **276**, 409–410.
33. Kumar A., Petri E.T., Halmos B. et al (2008), Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol.*, **26**(10), 1742-51.
34. Wheeler D.L. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab : role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, **27**, 3944-3956.
35. Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 137-2001.
36. Marmor M. D., Skaria K. B. and Yarden Y. (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*, **58**, 903–913.
37. Lurje G. and Lenz H.J (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*, **77**(6), 400-10.
38. Sharma S.V., Bell D.W., Settleman J. and Haber D.A (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.*, **7**(3), 169-81.
39. Sakuma Y., Matsukuma S., Yoshihara M. et al (2007). Epidermal growth factor receptor gene mutations in atypical adenomatous hyperplasias of the lung. *Mod Pathol.*, **20**, 967-973.

40. Yasuda H., Park E., Yun C.H. *et al* (2013). Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med.*, **5**(216), 216ra177.
41. Carey K.D., Garton A.J. *et al* (2006). Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res.*, **66**(16), 8163-71.
42. Rebecca S.H. and David C (2009). EGFR-Targeted Therapies in Lung Cancer: Predictors of Response and Toxicity. *Pharmacogenomics.*, **10**(1), 59-68.
43. Pao W. and Miller V.A. (2005a). Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*, **23**(11), 2556-2568.
44. Sequist L.V., Bell D.W., Lynch T.J. and Haber D.A. (2007). Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, **25**, 587–595.
45. Shigematsu H., Lin L., Takahashi T. *et al* (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl Cancer Inst*, **97**, 339–346.
46. Roberts P.J., Stinchcombe T.E., Der C.J. and Socinski M.A. (2010). Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: Is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy?. *J Clin Oncol*, **28**, 4769–4777.

47. Lievre A., Blons H. *et al* (2010). Oncogenic mutation as predictive factor in colorectal cancer, *Oncogene*, **29**, 3033-3043.
48. Amado R.G., Wolf M. *et al* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, **26**, 1626-34.
49. Pao W., Wang T.Y., Riely G.J. *et al.* (2005c). KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*, **2**, e17.
50. Lievre A., Bachet J.B. , Le Corre D. *et al* (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, **66**(8), 3992 –3995
51. Benvenuti S., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F. *et al* (2007). Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.*, **67** (6), 2643 –2648.
52. Riely G.J., Kris M.G., Rosenbaum D. *et al* (2008a). Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **14**(18), 5731-4.
53. Aoki Y., Niihori T. *et al* (2008). The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat*, **29**, 992-1006.
54. Bos J.L., Fearon E.R. *et al* (2008). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, **327**, 293-7.
55. Brose M.S., Volpe P., Feldman M. *et al* (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, **62**, 6997-7000.

56. Mao C., Qiu L.X., Liao R.Y. *et al.* (2010). KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer*, **69**, 272–278.
57. Sequist L.V., Heist R.S., Shaw A.T. *et al* (2011a). Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol*, **22**, 2616.
58. Paik P.K., Arcila M.E., Fara M. *et al* (2011). Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*, **29**:2046.
59. Kinno T., Tsuta K., Shiraishi K. *et al* (2014). Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Ann Oncol*, **25**, 138.
60. Ohashi K., Sequist L.V., Arcila M.E. *et al* (2012). Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, E2127.
61. Lee S.Y., Kim M.J., Jin G. *et al* (2010). Somatic mutations in epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in non-small cell lung cancers. *J Thorac Oncol*, **5**, 1734.
62. Jin G., Kim M.J., Jeon H.S. *et al* (2010). PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, **69**, 279.

63. Malanga D., Scrima M., De Marco C. *et al* (2008). Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle*, **7**, 665.
64. Rekhtman N., Paik P.K., Arcila M.E. *et al* (2012). Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res*, **18**, 1167.
65. Sequist L.V., Waltman B.A., Dias-Santagata D. *et al* (2011c). Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*, **3**, 75ra26.
66. Sobrero A.F. *et al* (2008). EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol*, **26**, 2311–2319.
67. Van Cutsem E. *et al.* (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med*, **360**, 1408–1417.
68. Saltz L.B. *et al.* (2007). Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J. Clin. Oncol*, **25**, 4557–4561.
69. Jonker D.J. *et al.* (2007). Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med*, **357**, 2040–2048.
70. Vermorcken J.B. *et al.* (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med*, **359**, 1116–1127.

71. Burtness B., Goldwasser M. A., Flood W. et al (2005). A Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol*, **23**, 8646–8654.
72. Lynch T.J., Patel T., Dreisbach L. et al (2008). Overall survival (OS) results from the phase III trial BMS 099: cetuximab plus taxane/carboplatin as 1st line treatment for advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*, **3**, S305.
73. Pirker R., Pereira J.R., von Pawel J. et al (2012). EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*, **13**(1), 33-42.
74. Lichtner R. B., Menrad A., Sommer A. et al. (2001). Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*, **61**, 5790–5795.
75. Eisenhauer E.A, Therasse P., Bogaerts G. et al (2009). New responses evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, **45**, 228-247.
76. Kris M.G. et al. (2003). Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial, *JAMA*, **290**, 2149–2158.
77. Fukuoka M. et al. (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J. Clin. Oncol*, **21**, 2237–2246.

78. Perez-Soler R., Chachoua A., Hammond L.A. *et al.* (2004). Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, **22**, 3238–3247.
79. Cappuzzo F., Ciuleanu T., Stelmakh L., *et al* (2010). Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*, **11**(6), 521-529.
80. Herbst R. S. *et al.* (2004). Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT 2. *J. Clin. Oncol*, **22**, 785–794.
81. Giaccone G. *et al.* (2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial—INTACT1. *J. Clin. Oncol*, **22**, 777–784.
82. Herbst R.S. *et al.* (2005). TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol*, **23**, 5892–5899.
83. Gatzemeier U. *et al.* (2007). Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J. Clin. Oncol*, **25**, 1545–1552.
84. Costa D.B., Kobayashi S., Tenen D.G. and Huberman M.S. (2007). Pooled analysis of the prospective trials of gefitinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, **58**, 95–103

85. Asahina H. *et al.* (2006). A phase II trial of gefitinib as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. *Br. J. Cancer*, **95**, 998–1004.
86. Inoue A. *et al.* (2006). Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol*, **24**, 3340–3346.
87. Inoue A. *et al.* (2009). First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J. Clin. Oncol*, **27**, 1394–1400.
88. Sequist L. V. *et al.* (2008). First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol*, **26**, 2442–2449.
89. van Zandwijk N. *et al.* (2007). EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol*, **18**, 99–103.
90. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S. *et al* (2009). Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Eng J Med.*, **361**(10), 947-958.
91. Mitsudomi T., Morita S., Yatebe Y. *et al* (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): An open label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, **11**, 121-128.

92. Maemondo M., Inoue A., Kobayashi K., *et al.* (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*, **362**, 2380–2388
93. Ceresoli G.L., Cappuzzo F., Gregorc V., *et al* (2004). Gefitinib in patients with brain metastase from non-small cell lung cancer: a prosperpective trial. *Ann Oncol*, **15**, 1042-1047.
94. Zhou C., Wu Y.L., Chen G. *et al* (2010). Efficacy results from the randomized phase III OPTIMAL (CTONG 0802) study comparing first-line erlotinib *versus* carboplatin (CBDCA) plus gemcitabine (GEM), in Chinese advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (PTS) with EGFR activating mutations. *Ann Oncol*, **21**: LBA13.
95. Riely G.J., Politi K.A., Miller V.A. and Pao W. (2006). Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **12**, 7232–7241.
96. Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Cappuzzo F. *et al* (2007). Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol*, **18**(4), 752-60.
97. Jackman D., Pao W., Riely G.J. *et al.* (2010). Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, **28**, 357–360.
98. Nguyen K.S., Kobayashi S. and Costa D.B. (2009). Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer*, **10**, 281–289.

99. Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T., *et al.* (2005a). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, **352**, 786–792.
100. Pao W., Miller V.A., Politi K.A. *et al.* (2005b). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, **2**, e73.
101. Bean J., Riely G.J., Balak M. *et al.* (2008). Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **14**, 7519–7525.
102. Balak M.N., Gong Y., Riely G.J. *et al.* (2006). Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, **12**, 6494–6501.
103. Engelman J.A., Zejnullahu K., Mitsudomi T. *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, **316**, 1039–1043.
104. Yano S., Wang W., Li Q. *et al.* (2008). Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor activating mutations. *Cancer Res*, **68**, 9479–9487.
105. Kobayashi S., Ji H., Yuza Y. *et al.* (2005b). An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, **65**, 7096–7101.

106. Lê Thượng Vũ (2009). Bước đầu sử dụng điều trị nhắm trúng đích cho ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn tiến xa tại khoa phổi bệnh viện Chợ Rẫy. *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, **13**(1), 98-107.
107. Vũ Văn Vũ, Đặng Thanh Hồng, Trần Thị Ngọc Mai và cộng sự (2010). Điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ tiến xa bằng erlotinib – Những nhận định ban đầu nhân 10 trường hợp tại Bệnh viện Ung Bướu TP.Hồ Chí Minh. *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, **14**(4), 408-413.
108. Nguyễn Thiện Nhân, Trần Đình Thanh và cộng sự (2010). Báo cáo một trường hợp ung thư phế quản-phổi xâm lấn gây chít hẹp khí quản, đáp ứng hoàn toàn sau 10 ngày điều trị erlotinib. *Tạp chí Y Học TP.HCM – Chuyên đề Ung Bướu*, **14**(4), 379-386.
109. Hoàng Anh Vũ, Nguyễn Thiện Nhân, Phan Thị Xinh và cộng sự (2011a). Phát hiện đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ có đáp ứng với erlotinib. *Tạp chí Y học TP.Hồ Chí Minh - chuyên đề Giải Phẫu Bệnh*, **15**(2), tr.150-154.
110. Hoàng Anh Vũ, Phan Thị Xinh (2011c). Đột biến gen trong các bệnh ung thư. *Tạp chí Y học TP.Hồ Chí Minh - chuyên đề Giải phẫu bệnh*, **15**(2), tr. 22-28.
111. Hoàng Anh Vũ, Cao Văn Động, Ngô Thị Tuyết Hạnh và cộng sự (2011b). Đột biến gen EGFR và KRAS trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. *Tạp chí Y học TP.Hồ Chí Minh - chuyên đề Điều Dưỡng Kỹ Thuật Y Học*, **15**(4), tr.166-172.
112. Trần Văn Khánh, Tạ Minh Hiếu, Trần Huy Thịnh và cộng sự (2011). Đột biến gen EGFR, KRAS trong ung thư và liệu pháp điều trị đích. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 138-148.

113. Phạm Lê Anh Tuấn, Trần Văn Khánh, Tạ Minh Hiếu và cộng sự (2013). Phát hiện đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **83(3)**, 1-6.
114. Nguyễn Tuyết Mai, Đỗ Huyền Nga (2013). Đánh giá hiệu quả điều trị của erlotinib trong bệnh ung thư phổi thể biểu mô tuyến tiến triển sau hóa trị phác đồ chuẩn. *Tạp chí Lao và Bệnh phổi*, (3).
115. Lê Thượng Vũ, Trần Văn Ngọc (2013). Kết quả điều trị ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn tiến xa bằng erlotinib (Tarceva) tại khoa Phổi bệnh viện Chợ Rẫy. *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, **17(1)**, 105-110
116. Shi Y., Joseph Siu-Kie A., Sumitra T. et al (2014). A Prospective, Molecular Epidemiology Study of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology (PIONEER). *J Thor Oncol.*, 9(2),154-162.
117. Asano H., Toyooka S., Tokumo M. et al (2006). Detection of EGFR gene Mutation in Lung Cancer by Mutant-Enriched Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Cancer Res.*,**12**, 43-48
118. Dobre M., Comanescu M., Arsene D. et al (2013). K-ras gene mutation status in colorectal cancer: comparative analysis of pyrosequencing and PCR-RFLP. *Rom J Morphol Embryol.* , **54(3)**,567-74.
119. Bell D.W and Daniel A.H (2006). A Blood-Based Test for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Clin Cancer Res.*, **12**, 3875-3877.
120. Hoshi K., Takakura H., Mitani Y. et al (2007). Rapid Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer by the SMart-Amplification Process. *Clin Cancer Res.*, **13**, 4974-4983.

121. American Joint Committee on Cancer. Lung. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC et al. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7th ed. Chicago, III: Springer; 2010: Chapter 25.
122. Geoffrey H., Nathan I. Cherny N.A. et al (1993). Karnofsky scoring. *Oxford Textbook of Palliative Medicine*, Oxford University Press, 109.
123. <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/> (accessed 25 June 2014)
124. Trotti A., Colevas A.D., Setser A. et al (2003). CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol.*, **13**(3), 176-181.
125. Pikor L.A., Enfield K.S., Cameron H. et al (2011). DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*, **26**(49), 2763.
126. Tabanifar B., Salehi R., Asgarani E. et al (2008). An efficient method for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *Iranian Journal of Pathology*, **3**(4), 173-178.
127. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
128. Khuất Hữu Thanh (2006). Nguyên lý kỹ thuật gen. Kỹ thuật gen – Nguyên lý và ứng dụng, *Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật*, tr.102-53.
129. Tạ Thành Văn (2010). PCR và một số kỹ thuật Y Sinh học phân tử. *NXB Y Học Hà Nội*, tr.81-82.

130. York C., Birschbach D. and Navarro S. (1993), Large-scale gel purification of DNA fragments using Wizard [®]PCR Preps Resin. *Promega Notes*, **43**, 14–7.
131. Boom R., Sol C.J.A. *et al* (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**(3), 495-503.
132. Gu D., Scaringe W.A., Li K., *et al* (2007). Database of somatic mutations in EGFR with analyses revealing indel hotspots but no smoking-associated signature. *Hum. Mutat*, **28**, 760-770.
133. William P. and Marc L. (2007). Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Testing in Lung Cancer : Searching for the Ideal Method. *Clin Cancer Res.*, **13**, 4954-4955.
134. Huang S.F., Liu H.P., Li L.H. *et al* (2004). High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res.*, **10**(24), 8195-203.
135. Boch C., Kollmeier J., Roth A. *et al* (2013). The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open*, **3**, e002560.
136. Kimura H., Kasahara K., Kawaishi M. *et al* (2006). Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.*, **13**, 3915-21.
137. Bando H., Yoshino T., Tsuchihara K. *et al* (2011). KRAs mutation detected by the amplification refractory mutations system-Scorpion

- assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *British Journal of Cancer*, **105**(3), 403-406.
138. Zhu C.Q., da Cunha S.G., Ding K. *et al* (2008). Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol*, **26**, 4268-4275.
139. Ellison G., Donald E., McWalter G. *et al* (2010). A comparison of ARMS and DNasequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *J Exp Clin Cancer Res.*, **29**, 132.
140. Kawada I., Soejima K., Watanabe H. *et al* (2008). An alternative method for screening EGFR mutation using RFLP in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol.*, **3**, 1096-103.
141. Endo K., Konishi A., Sasaki H. *et al* (2005). Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay. *Lung Cancer*, **50**, 375–84.
142. Ebert W., Dienemann H., Fatech-Moghadam A. *et al* (1994). Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuro specific enolase in lung cancer. Results of an international multicenter study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*, **32**, 189-199.
143. Sonobe M., Manabe T., Wada H. *et al* (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma. *Br J Cancer*, **93**, 355-63

144. Sriuranpong V., Chantranuwat C., Huapai N. *et al* (2006). High frequency of mutation of epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinoma in Thailand. *Cancer Lett.*, **239**(2), 292-7.
145. Bae N.C., Chae M.H., Lee M.H. *et al* (2007). EGFR, ERBB2, and KRAS mutations in Korean non-small cell lung cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet.*, **173**(2), 107-113.
146. Querings S., Altmüller J., Ansén S. *et al* (2011). Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PLoS One.*, **6**, e19601.
147. Thomas R.K., Nickerson E., Simons J.F. *et al* (2006). Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimen by massively parallel picoliter reactor sequencing. *Nat Med*; **12**, 852-5.
148. Eberhard D.A., Johnson B.E., Amler L.C. *et al* (2005). Mutations in the EGFR and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol.*, **23**, 5900-9.
149. Felip E., Gridelli C., Baas P. *et al* (2011). Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Ann Oncol*, **22**(7), 1507-19.
150. Beau-Faller M., Degeorges A., Rolland E. *et al* (2011). Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the

administration of EGFR TKIs in non-small cell lung carcinoma [ERMETIC] project—part 1). *J Thorac Oncol.*, **6**, 1006–15.

151. Ellison G., Zhu G., Moulis A. *et al* (2012). EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumor tissue and cytology samples. *J Clin Pathol.*, **0**, 1-11.
152. Mitsudomi T. and Yatabe Y. (2007). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* **98**, 1817–1824.
153. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. *et al* (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib, *N Engl J Med.*, **350**(21), 2129-39.
154. Mitsudomi T., Kosaka T. and Yatabe Y. (2006). Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol*, **11**, 190–8.
155. Tam I.Y., Leung E.L., Tin V.P. *et al* (2009). Double EGFR mutants containing rare EGFR mutant types show reduced in vitro response to gefitinib compared with common activating missense mutations. *Mol Cancer Ther.*, **8**, 2142-2151.
156. Yun C.H., Mengwasser K.E., Toms A.V. *et al* (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *PNAS*, **105**(6), 2070-2075.
157. Tiseo M., Rossi G., Capelletti M. *et al* (2009). Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): study of a comprehensive panel of molecular markers. *Lung Cancer*, **67**(3), 355-60.

158. Miller V.A., Riely G.J., Zakowski M.F. *et al* (2008). Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol*; **26**(9), 1472-8.
159. Edkins S., O'Meara S., Parker A. *et al* (2006). Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*; **5**(8), 928-32.
160. Sun Y., Ren Y., Fang Z. *et al* (2010). Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol*. **28**(30), 4616-20.
161. Sun J-M., Hwang D.W., Ahn J.S. *et al* (2013). Prognostic and predictive value of KRAS mutations in advanced non-small cell lung cancer. *PloS ONE*, **8**(5), e64816.
162. Sun L., Zhang Q., Luan H. *et al* (2011). Comparison of KRAS and EGFR gene status between primary non-small cell lung cancer and local lymph node metastases: implications for clinical practice. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**, 30
163. Do H., Krypuy M., Mitchell P.L. *et al* (2008). High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer*; **8**:142.
164. Marchetti A., Milella M., Felicioni L. *et al* (2009). Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones. *Neoplasia*, **11**(10), 1084-92.

165. Riely G.J. and Ladanyi M. (2008b). KRAS mutations: an old oncogene becomes a new predictive biomarker. *J Mol Diagn.*, **10**(6), 493-5.
166. Schiller J.H., Harrington D., Belani C.P., *et al* (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.*, **346**, 92-98.
167. Pfister D.G., Johnson D.H., Azzoli C.G. *et al* (2004). American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-smallcell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol*, **22**, 330-53.
168. Janne P.A., Wang X. *et al* (2012). Randomized Phase II Trial of Erlotinib alone or with Carboplatin and Paclitaxel in patients who were never or light former smokers with advanced lung adenocarcinoma:CALBG 30406 Trial, *J Clin Oncol*, **30**, 1-9
169. Tamura K., Okamoto I., Kashii T. *et al* (2008). Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG0403). *Br J Cancer*, **98**, 907-914.
170. Shaw A.T., Yeap B.Y., Mino-Kenudson M. *et al* (2009). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. **27**, 4247–4253.
171. Lee S.M., Khan I., Upadhyay S. *et al*. (2012). First-line erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer unsuitable for chemotherapy (TOPICAL): a double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet Oncol*, **13**(11), 1161-1170.

172. Fiala O., Pesek M. *et al* (2012). Skin rash as useful marker of erlotinib efficacy in NSCLC and its impact on clinical practice. *Neoplasma*, **60**(1), 26-32
173. Reck M., van Zandwijk N. *et al* (2010). Erlotinib in advanced non-small-cell lung cancer: efficacy and safety findings of the global phase IV Tarceva Lung Cancer Survival Treatment study. *J Thorac Oncol*, **5**(10), 1616
174. Azzoli C.G., Baker S.Jr., Temin S. *et al* (2009). American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guildline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, **27**(36), 6251-6266.
175. Xu X.H., Su J., Fu X.Y. *et al* (2011). Clinical effect of erlotinib as first-line treatment for Asian erderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, **67**(2), 475-479

PHỤ LỤC 1

MẪU PHIẾU THU THẬP THÔNG TIN BỆNH NHÂN

Mẫu số 1: Phiếu thu thập thông tin cho việc xác định đột biến gen EGFR, KRAS

Mẫu số 2: Phiếu thu thập thông tin cho việc theo dõi hiệu quả điều trị đích

MẪU SỐ 1

Mã số:.....

1.THÔNG TIN CHUNG

Họ và tên:..... Năm sinh:.....

Nam/Nữ:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại liên lạc:.....

2.TIỀN CĂN

Hút thuốc lá:.....

Tiếp xúc với hóa chất:.....

Các bệnh lý khác:.....

Gia đình:.....

3.ĐẶC ĐIỂM BỆNH UNG THƯ' PHỔI

Chẩn đoán lâm sàng:..... Giai đoạn:.....

Giải phẫu bệnh:

Carcinom tế bào vảy

Carcinom tế bào tuyến

Carcinom tế bào tuyến vảy

Carcinom tế bào lớn

Đang điều trị tại: Bệnh viện.....Khoa:.....Mã số hồ sơ:.....

4.XÉT NGHIỆM GEN

Ngày nhận mẫu:.....

Loại mẫu bệnh phẩm:

Mô tươi

Bệnh phẩm sinh thiết

Mô đúc nên

Kết quả xét nghiệm:

Gen KRAS:

Không đột biến

Đột biến:

Gen EGFR:

Không đột biến

Đột biến: exon..... – loại đột biến.....

MẪU SỐ 2

Mã số:.....

1.THÔNG TIN CHUNG

Họ và tên:..... Nam/Nữ:..... Năm sinh:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại liên lạc:.....

2.TIỀN CĂN

Hút thuốc lá:.....

Tiếp xúc với hóa chất:.....

Các bệnh lý khác:.....

Gia đình:.....

3.ĐẶC ĐIỂM BỆNH UNG THƯ PHỔI

Chẩn đoán lâm sàng:..... Giai đoạn:.....

Giải phẫu bệnh:

- Carcinom tế bào gai
- Carcinom tế bào tuyến
- Carcinom tế bào tuyến vảy
- Carcinom tế bào lớn

Đang điều trị tại: Bệnh viện..... Khoa:..... Mã số hồ sơ:.....

Ngày nhận vào nghiên cứu:.....

4. TÌNH TRẠNG BỆNH TRƯỚC KHI THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tiền sử điều trị ung thư phổi trước khi vào nghiên cứu (nếu có):.....

.....
.....

Chẩn đoán: giai đoạn bệnh..... tổn thương di căn.....

Chỉ số Karnofski (%):.....

Cận lâm sàng:

- Nồng độ CEA: ng/mL

- XQ phổi:.....

.....

- MSCT ngực (nếu có): :.....

.....

Các xét nghiệm khác (nếu có): :.....

.....

.....

Ngày tiếp nhận điều trị đích:.....

5. ĐÁNH GIÁ TIẾN TRIỂN SAU MỖI ĐỢT ĐIỀU TRỊ ĐÍCH

Ngày đánh giá:.....

Chỉ số Karnofski (%):.....

Sự cải thiện của BN (tăng cân, giảm đau, ăn ngon hơn...):.....

.....

.....

Nồng độ CEA (ng/mL):

Thay đổi trên phương tiện chẩn đoán hình ảnh (XQ phổi, CT ngực, PET-CT):

Tình trạng tổn thương thứ phát:

Biến mất :.....

Xuất hiện thêm :

Khác :

Tác dụng phụ điều trị (nếu có):

Đánh giá đáp ứng với điều trị (theo tiêu chuẩn RECIST):

PHỤ LỤC 2

QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA TỪ MÔ UNG THƯ

Quy trình xử lý mẫu mô UTP trong paraffin:

Tiến hành tuân tự theo các bước sau:

- Sau khi xác định vùng tập trung tế bào ung thư của mẫu mô, cắt lát 10-20 lát mô (30 μm) cố định bằng formalin đúc trong paraffin, cho các lát mô vào ống eppendorf .
- Thêm vào ống 1200 μL dung dịch xylene, ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút rồi trộn đều bằng máy.
- Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 5 phút, đổ bỏ phần dung dịch phía trên, giữ lại phần cặn lắng.
- Thêm vào ống 1200 μL ethanol 100%, trộn đều bằng máy và ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút.
- Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 5 phút, đổ bỏ phần dung dịch phía trên, giữ lại phần cặn lắng.
- Lặp lại bước 4 và 5.
- Thêm vào ống 500 μL Lysis buffer (50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 0,5% Tween20), 25 μL dung dịch SDS 10%, 20 μL dung dịch Proteinase K (nồng độ 1 mg/mL).
- Ủ ống ở 56°C trong 15 phút (máy ủ lắc).

Quy trình tinh sạch DNA bằng phenol/chloroform

Sử dụng ống chứa mẫu sau khi đã ủ ở máy ủ lắc, tiếp tục các bước sau (chú ý vào việc trong buồng hút, tránh hít phải phenol chloroform):

- Thêm vào ống 500 μ L dung dịch phenol-clo-isoamyl (25:24:1), trộn đều bằng máy.
- Ly tâm lạnh hỗn hợp với tốc độ 10 000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C.
- Lặp lại bước 1 và 2 .
- Thêm vào 1 thể tích dung dịch clo-isoamyl (24:1) (khoảng 500 μ L)
- Ly tâm lạnh hỗn hợp với tốc độ 10 000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C.
- Thu lấy lớp dung dịch trong suốt trên cùng, cho vào một ống mới.
- Thêm vào ống 2,5 thể tích ethanol 100% (khoảng 1,25 mL) và 1/10 thể tích natri acetat 3M (khoảng 50 μ L).
- Trộn đều hỗn hợp bằng máy, để ở -20°C qua đêm.
- Hôm sau: Ly tâm lạnh hỗn hợp với tốc độ 13 000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C
- Đổ bỏ phần dung dịch trên cùng. Thu lấy cặn lắng còn lại.
- Thêm vào cặn lắng 1mL ethanol 70%, trộn đều và ly tâm lạnh hỗn hợp với tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C.
- Lặp lại bước 11.
- Đổ bỏ phần dung dịch trên cùng. Thu lấy cặn lắng còn lại.
- Để cặn lắng trong ống khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.
- Sau khi kiểm tra dung dịch trong ống đã bốc hơi hết, thêm vào ống 25 μ L nước tinh khiết để hòa tan mảnh DNA.
- Tiến hành đo độ tinh khiết và nồng độ DNA hoặc trữ ở -20°C.

Xác định độ tinh khiết và nồng độ DNA vừa tinh sạch

Độ tinh khiết của dung dịch DNA được xác định bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ quang (absorbance) của dung dịch DNA ở bước sóng 260 nm và 280 nm (A_{260}/A_{280}). Độ tinh khiết tốt nhất trong khoảng 1,8 – 2,0. Nếu độ tinh khiết <1,6 chứng tỏ mẫu bị lẫn protein, phải ly trích lại. Độ tinh khiết và nồng độ dung dịch DNA vừa ly trích được xác định bằng máy đo quang phổ NanoDrop.

PHỤ LỤC 3

KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG DNA MỚI LY TRÍCH

BẢNG PCR SỬ DỤNG CẶP MÔI GEN NỘI CHUẨN GAPDH

GAPDH (Glyceraldehyd triphosphate dehydrogenase) là loại enzyme có mặt ổn định ở tất cả các tế bào trong cơ thể cũng như trong những giai đoạn phát triển, biệt hóa khác nhau của tế bào (house keeping protein). Cặp môi sử dụng trong nghiên cứu này khuếch đại một đoạn gen mã hóa của GAPDH có chiều dài khoảng 300 bp. Quy trình này nhằm kiểm tra chất lượng của DNA vừa ly trích và xác định nồng độ DNA tối ưu cho phản ứng khuếch đại các exon gen EGFR và KRAS tiếp theo sau. Tiến hành pha loãng DNA chuẩn thành các nồng độ 20ng, 50ng, 75ng, 100ng, 150ng, 200ng, 300ng, 400ng. Thành phần phản ứng PCR:

STT	Thành phần	Thể tích (μL)
1	DNA chuẩn(đã pha các nồng độ)	2
2	Master mix PCR 2X	10
3	Môi xuôi GAPDH 10pmol	0,5
4	Môi ngược GAPDH 10pmol	0,5
5	Nước PCR	7,0
	Tổng thể tích	20

Chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút

94°C trong 30 giây

55°C trong 30 giây

72°C trong 30 phút

72°C trong 5 phút

Giữ ở 4°C

} x 35 chu kỳ.

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% cùng thước đo 100bp.

PHỤ LỤC 4

QUY TRÌNH TIẾN HÀNH PCR EXON 18-21 GEN EGFR

Chuẩn bị dung dịch chạy PCR với thành phần gồm:

10X buffer	2 μ l
dNTP (2.5 mmol/ μ L)	2 μ l
Taq polymerase	0,2 μ l
Mồi xuôi (10 pmol/ μ L)	1 μ l
Mồi ngược (10pmol/ μ L)	1 μ l
DNA (100ng/ μ L)	1 μ l
Nước cất	12,8 μ l
Tổng thể tích của phản ứng	20 μ l

Tiến hành phản ứng PCR trên máy luân nhiệt: Cài đặt chu kỳ nhiệt của 4 phản ứng khuếch đại tương ứng với từng exon:

Exon 18: 94°C 5 phút
94°C 15 giây }
58°C 45 giây } x 35 chu kỳ
72°C 30 giây }
72°C 5 phút

Exon 20: 94°C 5 phút
94°C 15 giây }
59°C 45 giây } x 36 chu kỳ
72°C 30 giây }
72°C 5 phút

Exon 19: 94°C 5 phút
94°C 15 giây }
59°C 45 giây } x 37 chu kỳ
72°C 30 giây }
72°C 5 phút

Exon 21: 94°C 5 phút
94°C 15 giây }
60°C 45 giây } x 36 chu kỳ
72°C 30 giây }
72°C 5 phút

PHỤ LỤC 5

QUY TRÌNH TIẾN HÀNH PCR EXON 2 GEN KRAS

Chuẩn bị dung dịch chạy PCR với thành phần gồm:

10X buffer	2 μ l
dNTP (2.5 mmol/ μ L)	2 μ l
Taq polymerase	0,2 μ l
Mồi xuôi (10 pmol/ μ L)	1 μ l
Mồi ngược (10pmol/ μ L)	1 μ l
DNA (100ng/ μ L)	1 μ l
Nước cất	12,8 μ l
Tổng thể tích của phản ứng	20 μ l

Tiến hành phản ứng PCR trên máy luân nhiệt: 94°C 5 phút

94°C 15 giây	} x 36 chu kỳ
59°C 30 giây	
72°C 30 giây	
72°C 5 phút	

PHỤ LỤC 6

ĐIỆN DI SẢN PHẨM PCR TRÊN GEL AGAROSE

Chuẩn bị gel agarose 1,5%

- Cân 1,5g agarose hòa tan trong 10ml boric acid EDTA (TBE) (sử dụng lò vi sóng). Sau khi agarose tan hết, để nguội 55- 60°C, đổ vào khuôn gel, tùy thuộc vào số lượng giếng cần cho điện di mà cài lược làm giếng từ 4- 6- 8- 12 răng.
- Pha dung dịch TBE 10X : Tris 0,89M; acid boric 0,89M; EDTA 0,02M.

Tiến hành kỹ thuật điện di

- Chuẩn bị dung dịch điện di

Thành phần	Ống chuẩn	Ống bệnh nhân
Dung dịch Marker	10 μ l	
Sản phẩm PCR	-	9 μ l
Dung dịch đệm 10X	-	1 μ l
Tổng số	10 μ l	10 μ l

- Đưa gel agarose vào máy điện di, cho TBE đến ngập gel
- Dùng pipet và đầu côn nhỏ hút lần lượt dung dịch ở mỗi ống đưa vào giếng (10 μ l/giếng)
- Đưa gel vào máy điện di 80-100V (Mupid-Nhật Bản), khởi động cường độ 90V điện di trong 30 phút.
- Sau điện di, gel được ngâm vào Ethidium bromide 20 phút, rửa qua nước cất và đưa vào soi dưới đèn UV, chụp ảnh, lưu ảnh vào máy vi tính hoặc in ra giấy.

PHỤ LỤC 7

QUY TRÌNH TINH SẠCH SẢN PHẨM PCR TRÊN GEL AGAROSE

Sử dụng Promega Wizard SV gel clean-up system (Promega, USA).

1. Chuẩn bị dung dịch rửa màng (Membrane Wash Solution) (chỉ thực hiện khi bắt đầu sử dụng hộp sản phẩm mới) : Thêm ethanol 95% vào lọ dung dịch rửa màng. Lượng ethanol cho thêm vào phụ thuộc vào thể tích của lọ dung dịch rửa màng (được quy định sẵn trong kit).
2. Cắt phần gel agarose có chứa sản phẩm PCR mong muốn (hiển thị dưới đèn chiếu UV). Ước lượng trọng lượng miếng gel.
3. Cho miếng gel vào ống có dung tích 1,5mL, thêm vào 10 μ L dung dịch bám màng (Membrane Binding Solution) cho mỗi 10 mg trọng lượng miếng gel.
4. Nhẹ nhàng trộn đều hỗn hợp trong ống và ủ ống ở 50 – 65°C trong 10 phút hoặc cho đến khi quan sát thấy miếng gel tan hoàn toàn. Ly tâm ống để toàn bộ DNA tập trung xuống đáy ống.
5. Đặt 1 cột lọc (SV Minicolumn) vào một ống thu thập (Collection Tube). Chuyển toàn bộ hỗn hợp gel đã hòa tan vào cột lọc và ủ 1 phút ở nhiệt độ phòng.
6. Ly tâm phức hợp cột lọc-ống thu thập ở tốc độ 14 000 vòng/ phút trong 1 phút.
7. Gỡ cột lọc ra, đổ bỏ phần dung dịch trong ống thu thập. Sau đó đặt cột lọc lại trong ống thu thập.
8. Thêm vào cột lọc 700 μ L dung dịch rửa màng và ly tâm ở tốc độ 14 000 vòng/ phút trong 1 phút. Lặp lại bước 7.

9. Thêm vào cột lọc 500 μL dung dịch rửa màng và ly tâm ở tốc độ 14 000 vòng/phút trong 5 phút.

10. Chuyển cột lọc sang một ống 1,5 mL mới. Thêm vào cột 50 μL Nuclease-Free Water. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm ở tốc độ 14 000 vòng/phút trong 1 phút.

11. Bỏ cột lọc, dung dịch trong ống chứa DNA đích đã được tinh sạch. Tiếp tục thực hiện các kỹ thuật hoặc trữ ống ở -20°C .

PHỤ LỤC 8

QUY TRÌNH GIẢI TRÌNH TỰ GEN

1. Quy trình PCR khuếch đại gen EGFR và KRAS sử dụng BigDye kit

Thực hiện tuân tự theo các bước sau:

1. Cho vào ống dung tích 200 μL các thành phần sau :

<i>Thành phần</i>	<i>Thể tích (μL)</i>
Sản phẩm sau PCR đã được tinh sạch	0,5
Big Dye Buffer 5X	1,5
Big Dye 2,5X	1,0
Nước siêu sạch	6,0
Mồi đơn (5pmol/ μL)	1,0
Tổng thể tích	10

(thực hiện 2 ống cho 1 mẫu: 1 ống cho mỗi xuôi, 1 ống cho mỗi ngược)

2. Cài đặt chu trình nhiệt :

96°C trong 1 phút
96°C trong 10 giây
50°C trong 4 giây
60°C trong 4 phút

} x 25 chu kỳ.

3. Sau khi kết thúc phản ứng khuếch đại, giữ lạnh ống ở 4°C hoặc tiến hành ngay bước tinh sạch tiếp theo.

2. Quy trình tinh sạch sản phẩm sau PCR sử dụng BigDye kit

Thực hiện tuân tự theo các bước sau:

1. Thêm 5 μL EDTA 0,125M vào ống 200 μL có chứa sẵn sản phẩm PCR
2. Thêm 60 μL cồn 100°, trộn đều, để 15 phút ở nhiệt độ phòng.
3. Ly tâm ống với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 15 phút.
4. Đổ bỏ phần dung dịch, giữ lại phần cặn lắng ở đáy ống.
5. Thêm vào ống 250 μL ethanol 70%, trộn đều.
6. Ly tâm ống với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 10 phút.
7. Đổ bỏ phần dung dịch, giữ lại phần cặn lắng ở đáy ống
8. Để mảnh sản phẩm PCR khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng
9. Lập tức sử dụng kết tủa của sản phẩm PCR này để thực hiện bước tiếp theo là đọc trình tự gen.

3. Quy trình giải trình tự xác định đột biến gen EGFR và KRAS

Ngay sau khi lấy mảnh DNA khô vừa tinh sạch bằng cồn sau phản ứng PCR khuếch đại bằng BigDye kit, thực hiện tuần tự các bước sau:

1. Cho vào mỗi giếng 20 μ L dung dịch Hi-Di (formamide) hòa tan sản phẩm PCR.
2. Ủ ở 95°C trong 3-5 phút (trong block nhiệt) để gắn Hi-Di vào các sợi đơn DNA.
3. Lấy mẫu ra khỏi block nhiệt để ở -20°C trong 5 phút.
4. Trộn đều hỗn hợp
5. Đặt các giếng chứa mẫu vào máy đọc trình tự và khởi động chương trình chạy.
6. Phân tích trình tự gen bằng hệ thống ABI Prism 310 (Applied Biosystems).
7. So sánh kết quả giải trình tự gen với trình tự gen chuẩn tương ứng của GenBank.

4. Mã quy ước cho ký hiệu trình tự nucleotid trong phản ứng giải trình tự gen

Mã quy ước	Trình tự nucleotid	Mã quy ước	Trình tự nucleotid
A	Adenine	M	A hoặc C
T	Thymine	K	G hoặc T
C	Cytosine	H	A hoặc T hoặc C
G	Guanine	B	G hoặc C hoặc T
R	A hoặc G	V	G hoặc A hoặc C
Y	C hoặc T	D	G hoặc A hoặc T
W	A hoặc T	N	A hoặc T hoặc C hoặc G
S	G hoặc C		

Bảng mã quy ước này được trích từ:

Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences

(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), Recommendations 1984, World Wide Web version Prepared by G. P. Moss, Department of Chemistry, Queen Mary University of London, UK, available at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>)

PHỤ LỤC 9

QUY TRÌNH KỸ THUẬT SCORPIONS ARMS

1. Quy trình đánh giá nồng độ DNA tối ưu với cặp môi gen nội chuẩn GADPH sử dụng kỹ thuật Scorpions ARMS:

Sử dụng gen nội chuẩn nhằm kiểm tra chất lượng DNA sau khi tách chiết đồng thời đánh giá nồng độ DNA cho mỗi phản ứng, từ đó chọn nồng độ DNA cho vào mỗi phản ứng thích hợp.

- Pha loãng DNA chuẩn với các nồng độ 20ng, 100ng, 500ng
- Chuẩn bị phản ứng realtime PCR: Chuẩn bị trên khay lạnh (thể tích μL)

TT	Thành phần	EGFR		KRAS	
		Thể tích	Thể tích	Thể tích	Thể tích
1	Master mix đối chứng	19,5	19,5	19,8	19,8
2	Taq DNA polymerase	0,5	0,5	0,2	0,2
3	DNA khuôn:				
3.1	Đối chứng dương : DNA dương tính trong kit	5,0		5,0	
3.2	Đối chứng âm: Nước		5,0		5,0
	Tổng thể tích	25	25	25	25

- Trộn đều các thành phần sau đó spin nhẹ cho toàn bộ dịch xuống đáy ống;
- Đặt mẫu vào máy realtime PCR đã được cài đặt sẵn chương trình chạy;
- Cài đặt chương trình cho máy realtime PCR:
 - Bật máy realtime PCR, nhất là đèn của đầu đọc realtime ít nhất 15 phút trước khi chạy chương trình. Bật máy tính và chờ cho máy tính khởi động xong, gọi chương trình realtime PCR lên. Phải kiểm tra chắc chắn máy realtime PCR và máy tính đã kết nối với nhau (xem hướng dẫn sử dụng máy realtime PCR).
 - Chọn chức năng chờ cho đến khi “Heat lid” đạt 105°C thì chương trình luân nhiệt mới bắt đầu.
 - Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy realtime PCR.
 - Với mẫu: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên hoặc số tương ứng với ký hiệu của mẫu.

- Với chứng dương và âm: Đặt tên “Chứng dương”, “Chứng Âm” tương ứng.
 - Chọn màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
 - Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động: 1 chu kỳ: 95⁰C-4phút; 40 chu kỳ: 95⁰C-30 giây, 60⁰C-1 phút (chọn đọc kết quả tại bước này), giữ mẫu ở 15⁰C.
- Cách phân tích kết quả kiểm tra chứng nội chuẩn:
- Sau khi kết thúc quá trình realtime PCR, chuyển sang chế độ “Analysis” để phân tích kết quả.
 - Phân tích chứng dương và âm: Chọn màu FAM để phân tích kết quả, chứng dương (PC) phải cho tín hiệu rõ ràng và có giá trị Ct đạt 26,26 – 30,95. Chứng âm phải chắc chắn rằng không bị ngoại nhiễm tức là không cho tín hiệu.
 - Phân tích mẫu: Chọn màu FAM để phân tích kết quả:
 - Mẫu cho tín hiệu Ct từ 26.26-30.95: mẫu đạt yêu cầu để thực hiện phản ứng với các môi đột biến
 - Mẫu cho tín hiệu Ct từ 30.69-37.00: Mẫu cho tín hiệu yếu có thể có thể làm cho đột biến không thể phát hiện. Trường hợp này phải tăng thêm lượng DNA khuôn bằng cách cho gấp đôi lượng DNA sẽ cho tín hiệu giảm 1 chu kỳ.
 - Mẫu cho tín hiệu Ct từ 37.00-40.00 : Kết quả cho tín hiệu quá yếu chứng tỏ chỉ có một vài DNA được khuếch đại. Không thể phát hiện được đột biến nếu các DNA được khuếch đại đó không phải hầu hết là DNA mang đột biến. Trường hợp này phải tách chiết DNA lại.
 - Mẫu cho tín hiệu Ct < 23.00 : trường hợp này phải tiến hành pha loãng DNA đưa kết quả tín hiệu về 26.69-30.95 bằng cách cứ pha loãng ½ lượng DNA thì sẽ cho tín hiệu tăng lên 1 chu kỳ.

2.Quy trình chạy chứng dương và chứng âm với các môi đột biến:

- Chuẩn bị Master mix cho phản ứng (7 môi đột biến gen EGFR): Thực hiện trên khay lạnh (Thể tích μ L)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	19,5							
T790M		19,5						
Xóa đoạn exon 19			19,5					
L858R				19,5				
L861Q					19,5			
G719X						19,5		
S768I							19,5	
Thêm đoạn exon 20								19,5
Taq DNA pol.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA khuôn (đã chuẩn nồng độ)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Tổng thể tích	25	25	25	25	25	25	25	25

- Chuẩn bị Master mix cho phản ứng (7 môi đột biến gen KRAS): Thực hiện trên khay lạnh (Thể tích μL)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	19,8							
G12D		19,8						
G12V			19,8					
G12A				19,8				
G12R					19,8			
G12C						19,8		
G12S							19,8	
G13D								19,8
Taq DNA polymerase	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
DNA khuôn	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Tổng thể tích	25	25	25	25	25	25	25	25

- **DNA khuôn lần lượt là:**

- Chứng dương (PC): là DNA đã xác định có cả 7 đột biến trên khi chạy với cặp môi đột biến sẽ cho kết quả dương tính được pha ở nồng độ thích hợp

- Chứng âm (NC) : là nước PCR không chứa DNA khi chạy với các cặp môi đột biến cho kết quả âm tính
- Trộn đều các thành phần sau đó ly tâm nhẹ cho toàn bộ dịch xuống đáy ống
- Đặt mẫu vào máy realtime PCR đã được cài đặt sẵn chương trình chạy
- Cài đặt chương trình cho máy realtime PCR:
 - Bật máy realtime PCR, nhất là đèn của đầu đọc realtime ít nhất 15 phút trước khi chạy chương trình. Bật máy tính và chờ cho máy tính khởi động xong, gọi chương trình realtime PCR lên. Phải kiểm tra chắc chắn máy realtime PCR và máy tính đã kết nối với nhau (xem HDSĐ máy realtime PCR).
 - Chọn chức năng chờ cho đến khi “Heat lid” đạt 105°C thì chương trình luân nhiệt mới bắt đầu.
 - Cài đặt vị trí mẫu “Plate setup” trên phần mềm đúng với vị trí mẫu đã đặt trên máy realtime PCR.
 - Với mẫu: Chọn loại mẫu là “Unknown”. Đặt tên hoặc số tương ứng với ký hiệu của mẫu.
 - Với chứng dương và âm: Đặt tên “Chứng dương”, “Chứng Âm” tương ứng.
 - Chọn màu “FAM” và “HEX” cho mẫu, chứng dương và chứng âm.
 - Cài đặt chương trình “Protocol” cho máy realtime PCR hoạt động: 1 chu kỳ: 95°C -4phút; 40 chu kỳ: 95°C -30 giây, 60°C -1 phút (chọn đọc kết quả tại bước này), giữ mẫu ở 15°C .

- Các môi đột biến được sử dụng để xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS:

Gen EGFR			Gen KRAS		
STT	Môi đột biến	Exon	STT	Môi đột biến	Exon
1	Deletions Reaction Mix	19	1	G12A Reaction Mix	12
2	L858R Reaction Mix	21	2	G12D Reaction Mix	12
3	L861Q Reaction Mix	21	3	G12V Reaction Mix	12
4	G719X Reaction Mix	18	4	G12R Reaction Mix	12
5	S768I Reaction Mix	20	5	G12C Reaction Mix	12
6	Insertion Reaction Mix	20	6	G12S Reaction Mix	12
7	T790M Reaction mix	20	7	G13D Reaction mix	13

- Cách phân tích kết quả real-time với các môi đột biến:
 - Sau khi kết thúc quá trình realtime PCR, chuyển sang chế độ “Analysis” để phân tích kết quả.
 - Phân tích chứng dương và âm: Chọn màu FAM để phân tích kết quả, chứng dương (PC) với các môi đột biến phải cho tín hiệu rõ ràng và có giá trị Ct đạt 26,26 – 30,95. Chứng âm phải chắc chắn rằng không bị ngoại nhiễm tức là cho tín hiệu không vượt qua tín hiệu nền.
 - Phân tích mẫu: Chọn màu FAM để phân tích kết quả:
 - Mẫu chạy với môi đột biến cho kết quả là đường biểu diễn tín hiệu âm tính (không vượt qua tín hiệu nền). Mẫu này không có đột biến với môi tương ứng.
 - Mẫu chạy với môi đột biến cho kết quả là đường biểu diễn tín hiệu dương tính (vượt qua tín hiệu nền), tiến hành tính toán giá trị ΔCt theo công thức: $Ct \text{ đột biến} - Ct \text{ chứng} = \Delta Ct$. So sánh giá trị ΔCt với giá trị ngưỡng “Cutoff” (Bảng 2.3). Nếu mẫu có giá trị ΔCt thấp hơn hoặc bằng giá trị “cutoff” thì mẫu đó được coi là (+) với đột biến đó, còn nếu mẫu có giá trị ΔCt cao hơn giá trị “cutoff” thì mẫu đó được coi là (-) với đột biến đó hoặc ngoài giới hạn phát hiện của kit.

Giá trị cutoff của gen EGFR và gen KRAS

Gen EGFR		Gen KRAS	
Đột biến	Giá trị cutoff ΔCt	Đột biến	Giá trị cutoff ΔCt
T790M	6,38	G12A	6,5
Xóa đoạn exon 19	9,06	G12D	8,0
L858R	8,58	G12R	8,0
L861Q	9,26	G12C	7,0
G719X	9,32	G12S	9,0
S768I	9,26	G12V	6,5
Thêm đoạn exon 20	7,91	G13D	9,0

PHỤ LỤC 10

BẢNG TÓM TẮT CÁC PHÂN ĐỘ MỘT SỐ TÁC DỤNG PHỤ CỦA HÓA CHẤT

Độc tính	Độ 0	Độ 1	Độ 2	Độ 3	Độ 4
Trên hệ tạo huyết:					
Bạch cầu	≥ 4	3 – 3,9	2 – 2,9	1 – 1,9	< 1
Tiểu cầu (x10 ³)	BT	75 - BT	50 – 74,9	25 – 49,9	< 25
Huyết sắc tố (g/l)	BT	100-BT	80-100	65-79	< 65
Huyết sắc tố (mmol/l)	BT	6,2-BT	4,9-6,2	4-4,9	< 4
Bạch cầu hạt	≥ 2	1,5-1,9	1-1,4	0,5-0,9	< 0,5
Độc tính trên hệ tiêu hóa:					
Buồn nôn	Không	Có thể ăn được	Khó ăn	Không thể ăn được	
Nôn	Không	1 lần/24h	2-5 lần/24h	6-10 lần/24h	>10lần/24h hoặc cần nuôi dưỡng ngoài đường tiêu hóa
Ỉa chảy	Không	2–3 lần/ngày	4-6 lần/ngày chuột rút mức độ nhẹ	7-9 lần/ngày, ỉa són, hoặc chuột rút mức độ nặng	≥10 lần/ngày, ỉa máu đại thể hoặc cần nuôi dưỡng ngoài đường tiêu hóa
Viêm loét dạ dày	Không	Cần điều trị thuốc trung hòa acid	Cần điều trị bằng thuốc mạnh tích cực, không cần mổ	Không kiểm soát được bằng thuốc, cần mổ	Thủng hoặc chảy máu
Dị ứng	Không	Rất nhỏ, sốt do thuốc < 38 ⁰ C (< 100,4 ⁰ F)	Nổi mào đay, sốt do thuốc > 38 ⁰ C (100,4 ⁰ F)	Bệnh huyết thanh, co thắt phế quản, yêu cầu nuôi dưỡng ngoài hệ tiêu hóa	Sốc phản vệ
Trên gan:					
Billirubin	BT	BT	< 1,5 lần BT	1,5-3 lần BT	> 3 lần BT
AST, ALT	BT	<2,5 lần BT	2,6-5 lần BT	5,1-20 lần BT	> 20 lần BT

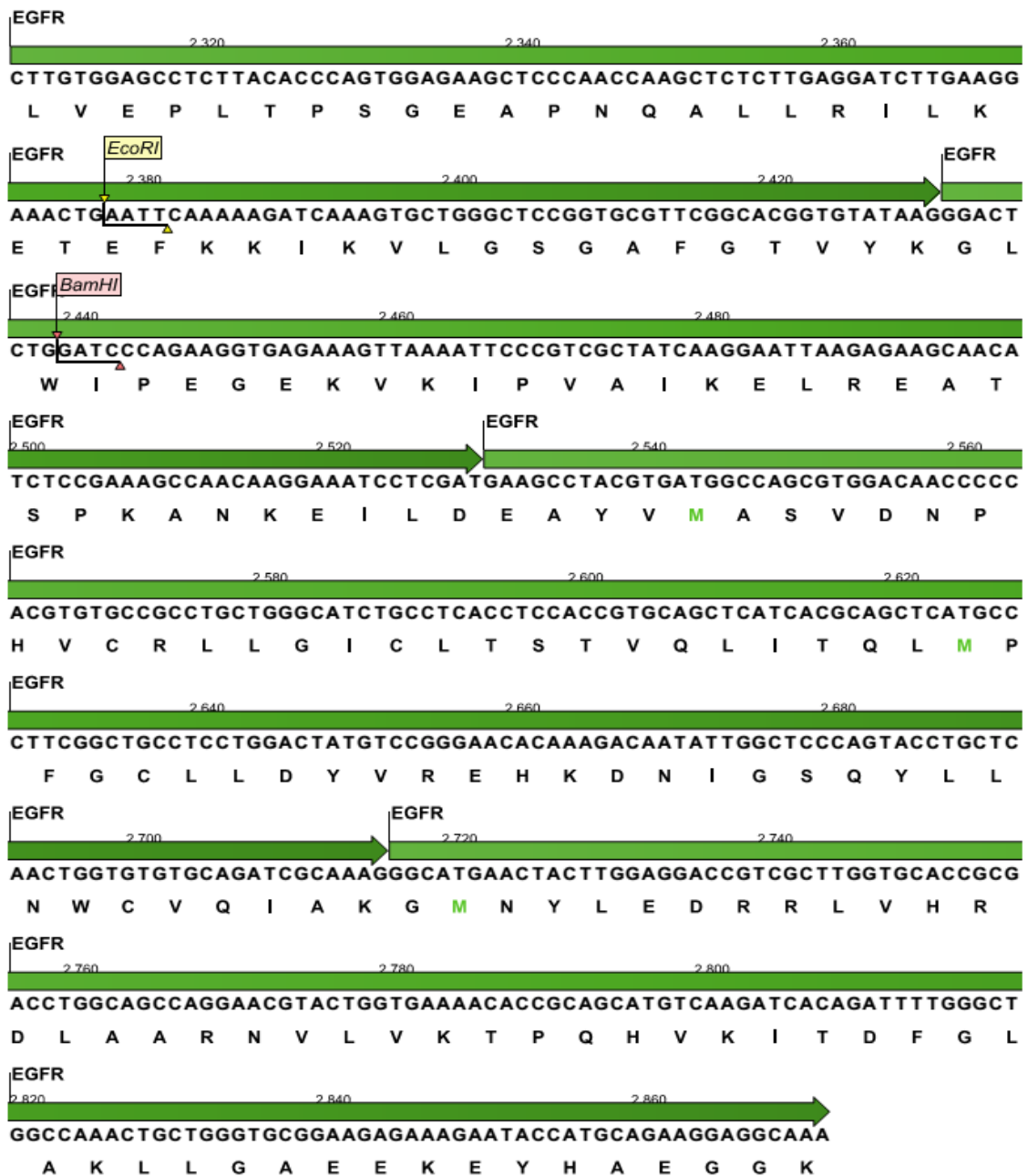
Trên thận :					
Creatinine	BT	< 1,5 lần BT	1,5-3 lần BT	3,1-6 lần BT	> 6 lần BT
Ure	BT hoặc < 7,5	7,6-10,9	11-18	>18	
Trên da:					
Ban da	không	Nổi ban đỏ, không ngứa	Nổi ban đỏ gây ngứa, vùng tổn thương <50% diện tích da cơ thể	Nổi ban đỏ gây ngứa, vùng tổn thương ≥50% diện tích da cơ thể	Viêm loét, nhiễm trùng da
Rụng tóc	không	tóc thưa	Rụng từng mảng	Rụng hoàn toàn	-
Viêm móng	không	Móng mất màu hoặc sần sùi	Mất móng một phần hoặc hoàn toàn	-	-

(BT: bình thường)

PHỤ LỤC 11

TRÌNH TỰ THAM CHIẾU CỦA GEN EGFR (exon 18-21) VÀ GEN KRAS (exon 2)

1. Trình tự tham chiếu của exon 18-21 gen EGFR



2. Trình tự tham chiếu của exon 2 gen KRAS

