

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH

NGUYỄN THỦY LÊ

**ĐỘT BIẾN GEN *EGFR* TRÊN BỆNH NHÂN
UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ
NHẪM ĐỊNH HƯỚNG ĐIỀU TRỊ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

NGHỆ AN - 2017

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH

NGUYỄN THỦY LÊ

**ĐỘT BIẾN GEN *EGFR* TRÊN BỆNH NHÂN
UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ NHẪM
ĐỊNH HƯỚNG ĐIỀU TRỊ**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60.42.01.14

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

TS. NGUYỄN QUANG TRUNG

TS. NGUYỄN THỊ GIANG AN

NGHỆ AN - 2017

LỜI CẢM ƠN

Với tấm lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin trân trọng cảm ơn:

Đảng ủy, Ban giám hiệu, Phòng sau đại học, Viện sư phạm tự nhiên Trường Đại học Vinh đã cho phép và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong thời gian học tập và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn Ban giám đốc, tập thể các bác sĩ, kỹ thuật viên, nhân viên bệnh viện Ung bướu Nghệ An đã truyền đạt kiến thức thực tế, nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới thầy giáo TS.BS Nguyễn Quang Trung – Giám đốc bệnh viện Ung bướu Nghệ An và cô giáo TS. Nguyễn Thị Giang An – Phó viện Trưởng viện Sư phạm tự nhiên Trường Đại học Vinh, là những người hướng dẫn khoa học, đã dày công chỉ bảo, tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn bố, mẹ, anh, chị và bạn bè đã luôn ở bên cạnh động viên, chia sẻ những lúc khó khăn, thuận lợi cùng tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Nghệ An, tháng 8 năm 2017

Tác giả

Nguyễn Thủy Lê

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi và nhóm nghiên cứu thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS.BS. Nguyễn Quang Trung và TS. Nguyễn Thị Giang An. Các kết quả, số liệu trình bày trong luận văn này trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Nghệ An, tháng 8 năm 2017

Tác giả

Nguyễn Thủy Lê

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	2
LỜI CAM ĐOAN	3
MỤC LỤC	1
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC BẢNG	5
DANH MỤC HÌNH ẢNH	6
MỞ ĐẦU	1
I. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI.....	1
II. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU	2
III.NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Lược sử nghiên cứu đề tài.....	3
1.1.1. Tình hình nghiên cứu đề tài trên thế giới	3
1.1.2. Tình hình nghiên cứu đề tài tại Việt Nam.....	4
1.2. Tổng quan về bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ	6
1.2.1. Tổng quan về bệnh ung thư	6
1.1.2. Các đặc tính của ung thư	6
1.2.2. Tổng quan về bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ	9
1.2.3. Nguyên nhân gây ung thư phổi	9
1.2.4. Các giai đoạn bệnh và phân loại giải phẫu bệnh	11
1.2.5. Các triệu chứng của ung thư phổi không tế bào nhỏ	13
1.3. Cơ chế phân tử của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ và vai trò của con đường truyền tín hiệu EGFR trong cơ chế bệnh	14
1.3.1. Cơ chế phân tử của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ	14
1.3.2. Thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (EGFR).....	15
1.3.3. Đột biến gen EGFR.....	18

1.4. Phương pháp phát hiện đột biến gen EGFR	21
1.4.1. Kỹ thuật PCR - RFLP	21
1.4.2. Kỹ thuật giải trình tự gen	22
1.4.3. Kỹ thuật Scorpion ARMS	23
1.4.4. Kỹ thuật Smart Amplification Process (SMAP)	25
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. Đối tượng nghiên cứu	26
2.2. Khách thể nghiên cứu	26
2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	26
2.4. Thiết kế nghiên cứu	26
2.5. Phương pháp nghiên cứu	26
2.5.1. Thiết bị nghiên cứu	27
2.5.2. Hóa chất phục vụ nghiên cứu	28
2.6. Các bước tiến hành phân tích đột biến gen EGFR	29
2.6.1. Phương pháp lấy mẫu mô tế bào ung thư	29
2.6.2. Quy trình xử lý mẫu bệnh phẩm	29
2.6.3. Quy trình tách chiết và tinh sạch ADN	31
2.6.4. Phương pháp phân tích đột biến gen EGFR	33
2.7. Phương pháp xử lý số liệu	39
2.8. Vấn đề đạo đức y sinh trong nghiên cứu	39
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN	40
3.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân UTPKTBN	40
3.1.1. Tỷ lệ đột biến theo giới tính	40
3.1.2. Đột biến gen EGFR theo nhóm tuổi	41
3.1.3. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo thói quen hút thuốc lá	43
3.1.4. Đặc điểm nghề nghiệp, địa bàn cư trú của bệnh nhân UTPKTBN	45
3.1.5. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo giai đoạn bệnh	46
3.1.6. Dấu hiệu biểu hiện của bệnh nhân UTPKTBN	47

3.1.7. Tỷ lệ đột biến theo phân loại giải phẫu bệnh.....	49
3.1.8. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo vị trí và phương pháp lấy bệnh phẩm	49
3.2. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen.....	52
3.2.1. Kết quả khuếch đại các exon 18 – 21 của gen EGFR	52
3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen EGFR bằng phương pháp giải trình tự gen ...	53
3.2.3. Kết quả xác định đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR	57
3.2.4. Kết quả so sánh hai kỹ thuật phân tích trình tự gen EGFR	61
3.3.4. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR	67
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	75
TÀI LIỆU THAM KHẢO	76
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AKT	Gen thuộc họ v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
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)
ADN	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribose nucleoside triphosphate
EGFR	Thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (Epidermal Growth Factor Receptor)
kDa	kiloDalton
KRAS	Gen thuộc họ v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogen
MEK	Protein thuộc nhóm serine/threonine-selective protein kinases
OS	Thời gian sống thêm tổng cộng (Optilcal Density)
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)
PFS	Thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (Progression-Free Survival)
Scorpion	Scorpion Amplification Refractory Mutation System
ARMS	
SMAP	Smart Amplification Process
TKI	Chất ức chế hoạt tính tyrosine kinase (tyrosine kinase inhibitor)
UTP	Ung thư phổi
UTPKTBN	Ung thư phổi không tế bào nhỏ

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1: Các trang thiết bị phục vụ nghiên cứu.....	27
Bảng 2.2: Các dạng đột biến exon 18-21 gen EGFR được phát hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR	34
Bảng 2.3: Các đoạn mồi dùng để khuếch đại exon 18 – 21	35
Bảng 3.1. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo giới tính	40
Bảng 3.2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo độ tuổi.....	41
Bảng 3.3. Tỷ lệ đột biến theo đặc điểm bệnh nhân có/không hút thuốc	43
Bảng 3.4. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo nghề nghiệp	45
Bảng 3.5. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo giai đoạn bệnh	46
Bảng 3.6. Dấu hiệu biểu hiện của bệnh UTPKTBN	47
Bảng 3.7. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo đặc điểm giải phẫu bệnh.....	49
Bảng 3.8. Tỷ lệ đột biến theo vị trí lấy bệnh phẩm và phương pháp lấy bệnh phẩm	50
Bảng 3.9. Kết quả phân tích đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen	54
Bảng 3.10. Kết quả phân tích đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS .	57
Bảng 3.11. Tỷ lệ phân tích đột biến gen EGFR bằng 2 kỹ thuật giải trình tự và Scorpion ARMS	61
Bảng 3.12. So sánh kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS [4].....	66
Bảng 3.13. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen EGFR	67
Bảng 3.14. Vị trí đột biến gen EGFR.....	67
Bảng 3.15. Tỷ lệ bệnh nhân theo số lượng đột biến/bệnh nhân	68
Bảng 3.16: Tỷ lệ đột biến theo tính kháng thuốc TKI	69
Bảng 3.17. Tỷ lệ đột biến gen EGFR trong bệnh UTPKTBN ở một số nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam	71
Bảng 3.18. Phân bố đột biến gen EGFR trên exon 18-21 theo một số nghiên cứu	72

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Sơ đồ tóm tắt quá trình phát triển của bệnh ung thư.....	7
Hình 1.2. Cấu trúc thụ thể phát triển biểu bì (EGFR)[76].....	16
Hình 1.3.(a) Cấu trúc thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR);(b) Sự hoạt hóa của EGFR [49]	17
Hình 1.4. Các dạng đột biến gen EGFR quyết định tính đáp ứng với EGFR TKI [63]	20
Hình 1.5. Phát hiện đột biến exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật RFLP [24]	21
Hình 1.6. Nguyên lý của kỹ thuật Scorpion ARMS [76]	23
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu xác định đột biến gen EGFR.....	29
Hình 3.1. Biểu đồ tỷ lệ đột biến gen EGFR theo giới tính	40
Hình 3.2. Biểu đồ tương quan giữa đột biến gen EGFR và độ tuổi	42
Hình 3.3. Biểu đồ tỷ lệ đột biến theo đặc điểm bệnh nhân có/không hút thuốc.....	43
Hình 3.4. Biểu đồ tỷ lệ nghề nghiệp của bệnh nhân UTPKTBN	45
Hình 3.5. Biểu đồ tỷ lệ giai đoạn bệnh của UTPKTBN.....	46
Hình 3.6. Biểu đồ các dấu hiệu biểu hiện của bệnh UTPKTBN	48
Hình 3.7. Biểu đồ tỷ lệ đột biến gen EGFR trong UTPKTBN theo vị trí lấy mẫu.....	50
Hình 3.8. Biểu đồ tỷ lệ UTPKTBN theo phương pháp lấy mẫu.....	51
Hình 3.9. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các exon 18,19,20 và 21 gen EGFR	52
Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự chuỗi ADN của exon 21 theo hai chiều xuôi (A) và ngược (B). Mũi tên chỉ vị trí đột biến.....	53
Hình 3.11: Hình ảnh giải trình tự gen (theo chiều xuôi) phát hiện đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 của gen EGFR (mã số mẫu E1235)	54
Hình 3.12: Hình ảnh giải trình tự gen theo chiều xuôi phát hiện đột biến L747-P753delinsS (mã số mẫu SM 0888)	55

Hình 3.13: Hình ảnh giải trình tự (theo chiều xuôi) phát hiện đột biến L858R trên exon 21 của gen EGFR (mã số mẫu B5390)	56
Hình 3.14: Hình ảnh giải trình tự gen (theo chiều xuôi) phát hiện đột biến T790M trên exon 20 và đột biến L585R trên exon 21 gen EGFR của cùng một bệnh nhân (mã số mẫu B3562).....	56
Hình 3.15. Kết quả xác định đột biến L585R của gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR (mã số mẫu C2013).....	58
Hình 3.16. Kết quả xác định đột biến xóa đoạn LREA của gen EGFR bằng phương pháp Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR (mã số mẫu C3228).....	58
Hình 3.17: Hình ảnh xác định đột biến kép là đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 và đột biến INS trên exon 20 của cùng một mẫu bệnh nhân (có mã số mẫu Cell48) bằng kỹ thuật Scorpion ARMS.....	59
Hình 3.18: Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến LREA trên exon 19 của gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu E1810)	60
Hình 3.19. Biểu đồ tỷ lệ đột biến trên các exon 18 – 21 gen EGFR.....	68

MỞ ĐẦU

I. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Ung thư phổi là một trong những loại ung thư hay gặp nhất và gây tử vong hàng đầu trong các loại ung thư ở cả 2 giới. Theo Globocan (2012) trên thế giới có 14,1 triệu ca ung thư mới mắc trong đó ung thư phổi có tỷ lệ mới mắc cao nhất chiếm 12,9% và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở bệnh ung thư [35].

Ung thư phổi được chia làm hai loại: ung thư phổi tế bào nhỏ (chiếm khoảng 20%) và ung thư phổi không tế bào nhỏ (chiếm khoảng 80%), mỗi loại có tiên lượng bệnh và điều trị khác nhau.

Ung thư phổi không tế bào nhỏ thường gặp ở giai đoạn muộn nên liệu pháp điều trị chưa thật hiệu quả. Gần đây những hiểu biết về gen và việc ứng dụng sinh học phân tử trong chuẩn đoán ung thư đã mở ra các liệu pháp điều trị trúng đích, mang lại một số kết quả nhất định và hứa hẹn một tương lai hơn trong tầm soát và phát hiện sớm ung thư, đồng thời cho phép tiên lượng hiệu quả và mức độ đáp ứng điều trị. Sự phát triển của công nghệ sinh học đã giúp phát hiện ra sự đột biến gen *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) là một thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì. Trong UTPKTBN có thể có những bệnh nhân mang đột biến gen *EGFR*, nhưng cũng có những trường hợp âm tính với đột biến gen này. Đối với những bệnh nhân mang đột biến gen *EGFR* nếu được điều trị với các thuốc phân tử nhỏ ức chế hoạt tính tyrosine kinase hoặc kháng thể đơn dòng (thuốc điều trị đích) cho hiệu quả kiểm soát bệnh cao và kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân một cách đáng kể. Tuy nhiên những bệnh nhân không đột biến gen *EGFR* hoặc mang các đột biến kháng thuốc nếu được điều trị đích sẽ không hiệu quả và kinh phí điều trị cao. Vì vậy, việc xác định chính xác đột biến gen *EGFR* là vô cùng quan trọng trong điều trị cho bệnh nhân UTPKTBN. Trong những năm gần đây tại bệnh viện Ung bướu Nghệ An đã triển khai kỹ thuật xét nghiệm phân tích đột biến gen *EGFR* và sử dụng thuốc điều trị trúng đích cho

các bệnh nhân UTPKTBN có mang đột biến gen *EGFR*. Tuy nhiên chưa có công trình nghiên cứu nào đề cập về đột biến gen *EGFR* trên bệnh nhân UTPKTBN. Chính vì những lý do trên chúng tôi đã chọn đề tài nghiên cứu ***“Đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ nhằm định hướng điều trị”*** để góp phần cung cấp dẫn liệu cho việc tìm hiểu, ngăn ngừa và định hướng điều trị cho bệnh UTPKTBN một cách có hiệu quả nhất.

II. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Xác định đặc điểm bệnh nhân UTPKTBN và tỷ lệ đột biến gen *EGFR* trên các exon 18, 19, 20 và 21 ở nhóm bệnh nhân này tại bệnh viện Ung bướu Nghệ An nhằm định hướng cho việc điều trị.

III. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Đặc điểm dịch tễ học của bệnh nhân UTPKTBN đã và đang điều trị tại bệnh viện ung bướu Nghệ An.
- Khảo sát tỷ lệ bệnh nhân đột biến gen *EGFR* trên bệnh nhân được chuẩn đoán UTPKTBN bằng giải phẫu bệnh.
- Giải trình tự và phân tích trình tự gen *EGFR* của bệnh nhân UTPKTBN.
- Xác định các điểm đột biến trên các exon của gen *EGFR*.
- So sánh kết quả đột biến gen *EGFR* với kết quả phân type UTPTBN bằng hóa mô miễn dịch.

- CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Lược sử nghiên cứu đề tài

1.1.1. Tình hình nghiên cứu đề tài trên thế giới

Hàng năm, trên thế giới cứ có khoảng 12,7 triệu bệnh nhân ung thư mới thì có 1,61 triệu người mắc UTP, chiếm tỷ lệ 12,7%. Trong đó có 1,38 triệu trường hợp tử vong [35]. Tại Mỹ, theo ước tính có khoảng 215.000 trường hợp bệnh mới và 161.000 bệnh nhân ung thư phổi chết trong năm 2008 [42]. Điều đáng chú ý là phần lớn các trường hợp ung thư phổi được phát hiện tại các nước đang phát triển, với sự gia tăng từ 31% vào năm 1980 cho đến nay đã lên đến 55% [35]. Riêng khu vực Đông Nam Á, UTP chiếm hàng đầu trong các loại ung thư ở nam giới, với tỷ lệ mắc mới là 29,6/100.000 dân, xếp trên cả ung thư gan (21,4/100.000) và ung thư đại trực tràng (15,2/100.000). Trong khi đó, ở nữ giới ung thư phổi xếp hàng thứ tư (11,9/100.000 dân) sau ung thư vú, ung thư cổ tử cung và ung thư đại trực tràng. Tuy nhiên, UTP là loại ung thư có tiên lượng rất xấu, là nguyên nhân tử vong hàng đầu ở cả hai giới.

Năm 2009, trong một nghiên cứu trên người châu Á, Mok và cộng sự công bố tỷ lệ đột biến gen *EGFR* ở bệnh nhân UTP lên đến 59,7% [55].

Năm 2014, nghiên cứu Pioneer trên 1482 bệnh nhân UTPKTBN từ 51 trung tâm thuộc 7 nước châu Á. Trong số 1450 mẫu có khả năng đánh giá có 746 mẫu dương tính với đột biến gen *EGFR* (chiếm 51,4%). Riêng ở Việt Nam tỷ lệ này 64,2%, cao nhất trong các nước tham gia nghiên cứu. Trong khi đó ở Đài Loan là 62,1%, Thái Lan là 53,8%, Philippines là 52%, Trung Quốc là 50,2%, Hồng Kông là 47,2%, Ấn Độ là 22,2%. 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% [63].

Nghiên cứu của Toyooka thì tỷ lệ đột biến Gen *EGFR* tại Nhật Bản là 30,9%; Mỹ là 9,4% và Australia là 11,9% [70].

1.1.2. Tình hình nghiên cứu đề tài tại Việt Nam

Tại Việt Nam, UTP nguyên phát chiếm tỷ lệ cao, đặc biệt ở nam giới. Tại khu vực thành phố Hồ Chí Minh tỷ lệ bệnh nhân UTP là 24,6/100.000 dân, và khu vực Hà Nội tỷ lệ bệnh nhân UTP là 38,8/100.000 [23]. Trong giai đoạn 2 năm từ 2005 - 2006, trong số 93.719 bệnh nhân tử vong do ung thư có tới 22.209 do UTP [12]. Đã có nhiều nghiên cứu về dịch tễ học, lâm sàng và giải phẫu bệnh của ung thư phổi, nhưng thiếu các nghiên cứu đi sâu tìm hiểu cơ chế phân tử của căn bệnh phổ biến này.

Năm 2011, bằng kỹ thuật giải trình tự gen, Hoàng Anh Vũ và cộng sự 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 thành phố Hồ Chí Minh. 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% [18].

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 là 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 [8].

Năm 2013, Nguyễn Tuyết Mai và cộng sự đã khảo sát kết quả điều trị bước 2/3 của erlotinib trên 36 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn thể biểu mô tuyến tại bệnh viện K Trung Ương, có 11/36 bệnh nhân được làm xét nghiệm gen *EGFR*, có tới 6 trường hợp bị 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 [11].

Năm 2013, Lê Thượng Vũ, Trần Văn Ngọc đã đánh giá hiệu quả điều trị erlotinib trên 98 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn, ngay những tháng đầu tiên đã có 80% bệnh nhân có cải thiện các triệu chứng, trong đó có 8% thấy hiệu

quả ngay tuần đầu tiên điều trị bệnh. Tỷ lệ đáp ứng thuốc là 35,5%. Tàn suất bệnh nhân sống thêm trên 1 năm là 50% [19].

Năm 2014, Hoàng Anh Vũ và cộng sự đã nghiên cứu đặc điểm đột biến gen *EGFR* trên 332 bệnh nhân UTPKTBN có bệnh phẩm lưu tại bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại học y dược thành phố Hồ Chí Minh. Nghiên cứu đã phát hiện 40,7% (135/332) bệnh nhân có mang đột biến của gen *EGFR*, tỷ lệ đột biến ở bệnh nhân nữ cao hơn bệnh nhân nam (48,9% ở nữ so với 35% ở nam, $p = 0,012$) [18].

Phạm Văn Luận và cộng sự (2016), đã đánh giá tỉ lệ đột biến gen *EGFR* ở bệnh nhân UTPKTBN điều trị tại bệnh viện trung ương Quân đội 108, kết quả cho thấy tỷ lệ UTPKTBN nam/nữ là 3/1, tuổi trung bình là $61,66 \pm 10,57$ tuổi, tuổi có đột biến cao nhất là > 60 tuổi (chiếm tỷ lệ 55,6%). Tuổi mắc bệnh cao nhất là 86 tuổi, thấp nhất là 34 tuổi. Đặc điểm mô bệnh học theo nghiên cứu này, nhóm mô bệnh học gặp cao nhất là ung thư biểu mô tuyến chiếm 71,9%. Đột biến gen *EGFR* được phát hiện với tỷ lệ 40,6%, trong đó đột biến chủ yếu xảy ra ở vị trí exon 19 và 21 với tỷ lệ 58,5% và 33,8 % [10].

Năm 2016, Mai Trọng Khoa và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu xác định đột biến gen *EGFR* trên bệnh nhân UTPKTBN tại bệnh viện Bạch Mai. Kết quả phân tích đột biến gen *EGFR* trên 511 bệnh nhân UTPKTBN cho thấy tỷ lệ đột biến gen *EGFR* là 40,1%, trong đó dạng thường gặp nhất là exon 19 (56,4% tổng số đột biến) và đột biến L858R và L861Q trên exon 21 (37,4%). Đột biến T790M liên quan đến kháng thuốc TKI chỉ chiếm khoảng 1,9%. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* phụ thuộc vào giới tính, tiền sử hút thuốc, mô bệnh học, vị trí lấy bệnh phẩm; không phụ thuộc tuổi, giai đoạn bệnh, phương pháp thu mẫu bệnh phẩm [9].

Tại Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về dịch tễ học, lâm sàng và giải phẫu bệnh của ung thư phổi, nhưng thiếu các nghiên cứu đi sâu tìm hiểu về đặc điểm

sinh học của tế bào ung thư và sự tương tác giữa chúng với nhau, về sự biểu hiện của protein EGFR và cơ chế phân tử của căn bệnh phổ biến này.

Ung thư phổi chuẩn đoán muộn sẽ có tiên lượng xấu, thời gian sống ngắn. Tuy nhiên, với liệu pháp điều trị nhắm trúng đích bằng các thuốc phân tử nhỏ hoặc kháng thể đơn dòng sẽ giúp điều trị bệnh hiệu quả. Trong điều trị UTPKTBN, việc xác định đột biến gen *EGFR* sẽ giúp cho bác sĩ lựa chọn điều trị điều trị trúng đích phù hợp.

1.2. Tổng quan về bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ

1.2.1. Tổng quan về bệnh ung thư

Ung thư là tên dùng chung để gọi một nhóm bệnh gồm khoảng 200 loại khác nhau về nguồn gốc tế bào phát sinh, khả năng di căn, cách thức điều trị, nhưng đều có chung một đặc điểm nổi bật là tăng sinh vô hạn khó kiểm soát, xâm lấn và phát triển khối u [1], [2], [37].

Ung thư là căn bệnh phổ biến, được nghiên cứu chủ yếu trên cơ thể người, có thể xuất phát từ một hay một số tế bào ban đầu của cơ thể. Ung thư là căn bệnh của tế bào và rất đa dạng về căn nguyên, cách phòng bệnh, chuẩn đoán và điều trị.

Hippocrate, một nhà y học Hy Lạp thời cổ đại được xem là người đầu tiên nhận dạng căn bệnh ung thư, khi ông đặt tên cho căn bệnh này là “Karkinos” theo tiếng Hy Lạp có nghĩa là con cua. Bởi ông ví sự xâm lấn, phát triển của khối u ác tính giống như hình ảnh của con cua. Ngày nay, ung thư được cả thế giới biết với từ “Cancer” theo tiếng Anh và cũng có nghĩa là con cua [3], [7].

1.1.2. Các đặc tính của ung thư

1.1.2.1. Ung thư là căn bệnh của tế bào

Ung thư thường bắt đầu từ một hoặc một số tế bào và phải mất một thời gian phát triển cho tới khi có một kích thích đủ lớn mới có thể có dấu hiệu nhận thấy được. Thông thường, các tế bào lành có một tuổi thọ nhất định và tuân thủ chặt chẽ theo một quy luật chung là “phát triển – già – chết”. Các tế bào chết lại được thay thế bằng các tế bào mới. Cơ thể có cơ chế kiểm soát quy luật này rất

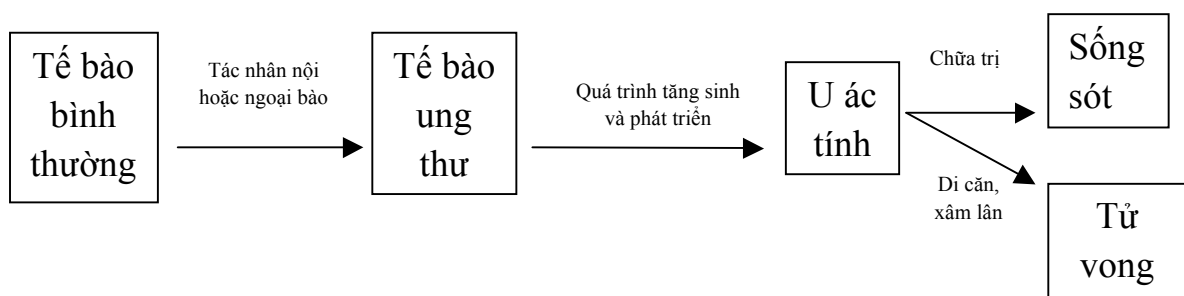
nghiêm ngặt và duy trì số lượng tế bào của mỗi cơ quan, mỗi tổ chức ở mức ổn định.

Bệnh ung thư bắt đầu khi có một tế bào vượt qua cơ chế kiểm soát của cơ thể, phát triển, chúng sinh sôi không ngừng, hình thành một đám tế bào có chung một đặc điểm là phát triển vô tổ chức, xâm lấn và chèn ép vào các cơ quan, tổ chức xung quanh gây tử vong cho bệnh nhân [6], [30].

1.1.2.2. Các giai đoạn của ung thư

Quá trình phát triển từ một tế bào ung thư ban đầu thành một khối u trải qua nhiều giai đoạn. Giai đoạn đầu là quá trình hình thành tế bào ung thư khởi phát do ảnh hưởng của các tác nhân nội bào hay ngoại bào nào đó. Diễn biến tiếp theo là quá trình phân chia liên tục không ngừng của tế bào ung thư này thành một khối u được gọi là quá trình phát triển bệnh. Các tế bào ung thư trong khối u sẽ tăng sinh, tự mất đi các thụ cảm nhận biết giới hạn với các tế bào lân cận, sản xuất ồ ạt các cytokine (tín hiệu tế bào) và các enzyme protease dẫn tới phá hủy màng đệm lót và môi trường ngoại bào bao quanh khiến chúng chỉ liên kết lỏng lẻo, dễ dàng bứt ra khỏi khối u mẹ, theo mạch máu và mạch bạch huyết di chuyển tới các tổ chức và cơ quan mới, bám lại và tiếp tục tăng sinh vô tổ chức. Quá trình này gọi là sự di căn (metastatic process). Các tế bào ung thư chèn ép hay di căn vào các cơ quan giữ chức năng sống trong cơ thể như não, phổi, gan, thận... khiến bệnh nhân tử vong [5], [29], [37], [51].

Quá trình hình thành và phát triển căn bệnh ung thư có thể được tóm tắt theo sơ đồ sau (hình 1.1)



Hình 1.1: Sơ đồ tóm tắt quá trình phát triển của bệnh ung thư

1.1.2.3. Sinh học phân tử và bệnh ung thư

Ngày nay người ta đã biết rằng có ba nhóm gen liên quan đến quá trình phát sinh, phát triển của ung thư:

- Nhóm gen gây ung thư Oncogen là tên gọi chung cho một nhóm các gen mà sự có mặt của chúng ở một dạng nào đó hoặc khi ở trạng thái tăng cường hoạt động sẽ dẫn tới sự hình thành và phát triển của bệnh ung thư [53], [59]. Nhóm Oncogen là dạng đột biến của một nhóm gen được gọi là Proto-oncogen chịu trách nhiệm mã hóa cho các yếu tố giám sát sự phát triển và sinh trưởng bình thường của tế bào [29]. Các yếu tố này có thể là yếu tố sinh trưởng, các thụ thể, enzyme truyền tín hiệu và các yếu tố điều hòa phiên mã. Yếu tố sinh trưởng gắn vào thụ thể trên bề mặt tế bào dẫn tới kích hoạt các enzyme truyền tín hiệu nội bào để rồi tác động tới một số protein đặc hiệu là các yếu tố điều hòa phiên mã trong nhân tế bào. Các yếu tố phiên mã bị kích thích sẽ tác động vào hệ gen trong nhân và kích hoạt các gen chịu trách nhiệm cho sự sinh sôi, phát triển của tế bào. Do vậy, nếu nhóm gen điều hòa sinh trưởng này đột biến thành các Oncogen sẽ dẫn tới sự sinh sản không kiểm soát được tế bào và bệnh ung thư được hình thành từ đây [5], [6]. Cho tới nay, một vài Oncogen đã được nhận biết là có mặt và ở dạng hoạt động trong một vài dạng ung thư như gen myc, ras hay họ gen bcl... [20].

- Nhóm gen áp chế Oncogen (Oncogen suppressors) chịu trách nhiệm ức chế các gen thuộc nhóm Oncogen từ đó không cho các tế bào tham gia tùy tiện vào chu kỳ sinh trưởng. Nếu gen này bị mất, tổn thương hay đột biến, sẽ khiến các gen thuộc nhóm Oncogen bị mất kiểm soát, hoạt động bất thường, kết quả là các tế bào sinh sản vô tổ chức. Một trong những phương thức hoạt động của nhóm gen này là kích thích tế bào đi vào quá trình tự chết (Apoptosis) [1], [2], [29]. Thuộc nhóm gen này có một gen áp chế ung thư đặc biệt mã hóa cho một phân tử protein tên là p53 có khả năng khởi động quá trình tự chết của tế bào. Trong những tế bào mà các phân tử ADN có những hư hỏng nào đó hoặc bị đột biến do

một số tác nhân nhất định, protein p53 sẽ đóng vai trò như một chiếc phanh kìm hãm, chặn đứng sự phát triển và phân chia tế bào. Trong trường hợp các đột biến đó là không thể sửa chữa, protein p53 sẽ kích hoạt để tế bào đi vào quá trình tự chết, nhờ vậy sẽ ngăn chặn được sự di truyền các đột biến này cho thế hệ tế bào con cháu.

- Nhóm gen sửa chữa (ADN repair genes) chịu trách nhiệm điều chỉnh, sửa chữa những sai sót trong hoạt động của hai loại gen nói trên. Nếu đoạn gen này bị tổn thương thì những đột biến của hai loại gen trên sẽ không được khắc phục và sẽ dẫn đến sự sinh sản bất thường của tế bào [43].

1.2.2. Tổng quan về bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ

Ung thư phổi là một trong những ung thư thường gặp nhất ở cả nam và nữ và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trong các bệnh ung thư. Hiện nay tần suất UTP đang có khuynh hướng gia tăng tại các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Theo báo cáo của ủy ban phòng chống ung thư quốc gia Việt Nam tỉ lệ UTP ở nam giới là 30,7 / 100.000 dân và 6,7 / 100.000 dân ở nữ giới. Hằng năm ở Việt Nam có khoảng 21.800 trường hợp ung UTP mới mắc và khoảng 19.500 trường hợp tử vong [15].

Theo Globocan 2012, ước tính trên thế giới có khoảng 1.800.000 trường hợp UTP mới phát hiện và có khoảng 1.600.000 trường hợp tử vong [35]

Về mặt chuẩn đoán, UTP nguyên phát được chia thành 2 nhóm: ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC: non-small cell lung cancer) (chiếm khoảng 80% các trường hợp mắc UTP) và ung thư phổi tế bào nhỏ (SLC: Small cell Lung Cancer) (chiếm khoảng 20% các trường hợp mắc UTP).

1.2.3. Nguyên nhân gây ung thư phổi

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.

Khói thuốc lá, chứa hơn 60 loại chất gây ung thư như notrosamine và benzopyrene, được xác định là nguyên nhân trực tiếp và quan trọng nhất gây nên ung thư phổi. Hút thuốc lá là nguyên nhân của 85 – 90% trong tổng số các trường hợp ung thư phổi trên toàn thế giới [19]. Nguy cơ này phụ thuộc vào số điếu thuốc hút mỗi ngày và hút trong khoảng thời gian bao lâu. Những người hít phải khói thuốc lá cũng làm tăng nguy cơ ung thư phổi.

Ngoài khói thuốc lá, 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 [49]. Khí radon không mùi vị, được tạo ra từ sự phân rã phóng xạ radium vốn xuất phát từ uranium có trong lớp vỏ trái đất. Các sản phẩm phân rã phóng xạ gây nên sự ion hóa các vật chất di truyền, từ đó xuất hiện các đột biến gen và ung thư.

Gần đây có những bằng chứng gợi ý vai trò của virus trong việc gây ra ung thư phổi. Các virus như *human papillomavirus*, *simian virus 40* hay *cytomegalovirus* hiện diện trong mô ung thư phổi, được cho là đã gây nên sự rối loạn chu kỳ tế bào và ức chế quá trình chết tế bào theo lập trình, mở đường cho hiện tượng ung thư phổi xuất hiện. Chi tiết về các cơ chế phân tử mà virus khởi phát trong tế bào ký chủ để tạo nên các dạng ung thư, trong đó có ung thư phổi, là một lĩnh vực đang thu hút được rất nhiều nghiên cứu y sinh học trong thời gian qua. Tỷ lệ HPV dương tính trong mẫu ung thư phổi trung bình là 24,5%, dao động từ 15% ở Châu Âu và Bắc Mỹ cho đến 35,7% ở Châu Á [46].

Thời gian gần đây, nguyên nhân di truyền trong ung thư phổi cả người hút thuốc và không hút thuốc lá đang được chú ý. Tính đa hình thái của các gen có vai trò điều hòa chuyển hóa các chất sinh ung, kiểm soát quá trình sửa sai ADN và chu kỳ tế bào có thể có ảnh hưởng quan trọng vào tính miễn cảm với ung thư phổi. Ví dụ, các nghiên cứu đã tìm ra ít nhất 3 gen trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 15 có liên quan với nguy cơ mắc ung thư phổi, đó là các gen *CHRNA3*,

CHRNA5 và *CHRNA4*, mã hóa cho các tiểu đơn vị cấu trúc của thụ thể nicotinic acetylcholine [20]. Một phân tích gộp của 23 nghiên cứu bao gồm 15.857 đối tượng cho thấy alen Proline tại codon 72 của P53 là một yếu tố nguy cơ ung thư phổi, đặc biệt trên người Châu Á, người da trắng và người hút thuốc lá [48].

Chế độ ăn uống có thể ảnh hưởng tới ung thư phổi. Ở chuột, thức ăn có nhiều gốc phosphate có thể hoạt hóa đường truyền tín hiệu AKT trong tế bào gây nên kích thích quá mức sự tăng sinh tế bào, thúc đẩy tiến triển của ung thư phổi. Một phân tích gộp của 22 nghiên cứu cho thấy trà xanh giúp giảm nguy cơ ung thư phổi [68].

1.2.4. Các giai đoạn bệnh và phân loại giải phẫu bệnh

1.2.4.1. Các giai đoạn bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ

Theo phân loại TNM lần thứ 7 của AJCC (American Joint Committee on Cancer : Ủy ban ung thư Hoa Kỳ) năm 2009 và UICC (Union for International Cancer Control: Hiệp hội kiểm soát Ung thư quốc tế) công nhận bắt đầu vào tháng 1 năm 2010 [58].

T (Tumor): U nguyên phát

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

Tx: Không xác định khối u nguyên phát, hoặc có tế bào UT trong dịch tiết hay dịch rửa phế quản nhưng không nhìn thấy u trên hình ảnh hoặc nội soi phế quản.

Tis: Ung thư 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 2 cm.

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

T2b: Đường kính lớn nhất của khối u lớn hơn 5 cm 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 2 cm 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 IA: T1aN0M0; T1bN0M0

Giai đoạn IB: 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

1.2.4.2. Phân loại giải phẫu bệnh

Dựa theo kết quả giải phẫu bệnh, ung thư phổi được chia thành 2 nhóm lớn với tiên lượng và điều trị khác nhau. Ung thư phổi tế bào nhỏ chiếm khoảng 20%, hầu hết các trường hợp đã có di căn xa vào thời điểm chẩn đoán và có tiên lượng rất xấu. Loại này thường xuất phát từ các khí đạo lớn và có diễn tiến rất nhanh. Ung thư phổi không tế bào nhỏ chiếm khoảng 80%.

Theo bảng phân loại của WHO (Tổ chức Y tế thế giới) năm 2015, mô bệnh học của ung thư phổi không tế bào nhỏ gồm các nhóm sau:

- 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 type tuyến nước bọt

1.2.5. Các triệu chứng của ung thư phổi không tế bào nhỏ

Các triệu chứng lâm sàng của ung thư phổi không hoàn toàn đặc hiệu, có thể cũng gặp trong các bệnh lý lành tính của phổi. Cần lưu ý rằng khoảng 10% trường hợp ung thư phổi không hề có triệu chứng nào khi được chẩn đoán, chỉ được phát hiện tình cờ trên phim phổi khi khám sức khỏe tổng quát.

Trong giai đoạn đầu, UTPKTBN thường không gây ra bất kỳ triệu chứng nào. Ở giai đoạn tiến triển, các triệu chứng có thể xuất hiện bao gồm:

- Ho dai dẳng
- Mệt mỏi
- Đau ngực
- Giảm cân không rõ nguyên nhân
- Khó thở
- Đau xương
- Cơ thể yếu ớt
- Ho ra máu

Các triệu chứng của ung thư phổi không tế bào nhỏ giai đoạn cuối:

- Đau xương hoặc đau vai, đau khớp
- Rủ mí mắt
- Khàn tiếng hoặc thay đổi giọng nói
- Móng tay biến dạng
- Nuốt khó khăn
- Sung mặt

Những triệu chứng của ung thư phổi không tế bào nhỏ thường không đặc hiệu, nó có thể giống với các điều kiện ít nghiêm trọng khác. Do vậy, điều quan trọng là khi gặp các triệu chứng bất thường, người bệnh cần đi khám để tìm ra nguyên nhân.

1.3. Cơ chế phân tử của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ và vai trò của con đường truyền tín hiệu EGFR trong cơ chế bệnh

1.3.1. Cơ chế phân tử của bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ

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 [61].

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 kiểm hãm khối u trong cơ chế bệnh sinh của 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 [59].

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.

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.

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)....

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

1.3.2.1. Gen EGFR

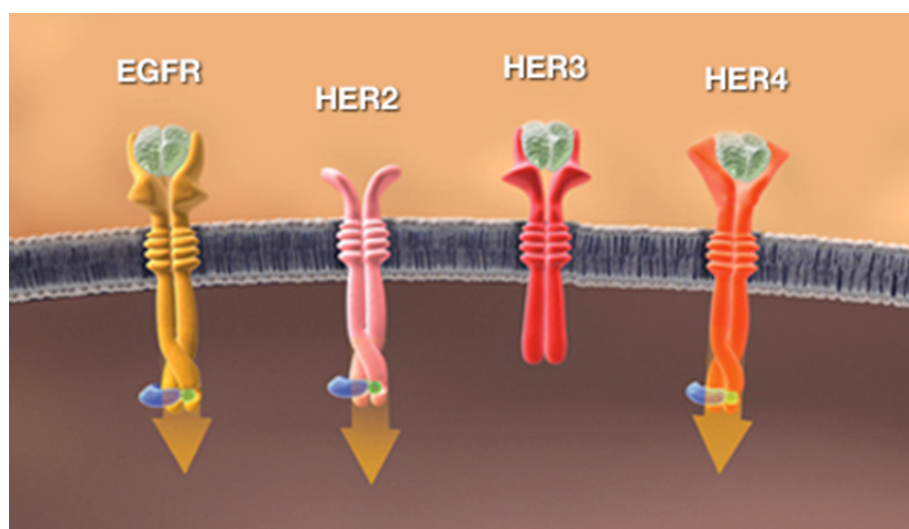
Gen *EGFR* ở người, nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 7, tại locus 7p12, được xếp vào nhóm gen tiền sinh khối u (proto-oncogen), dài 110 kb, gồm

188307 nucleotit và được chia thành 28 exon, mã hóa cho protein có 1210 amino acid.

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

Gen *EGFR* quy định protein EGFR, là một nhóm protein có chức năng thụ thể ở màng tế bào thuộc họ tác nhân tăng trưởng biểu bì (EGF – family) của các tín hiệu ngoại bào, được phát hiện lần đầu tiên bởi Carpenter và cộng sự năm 1978 [45], 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.

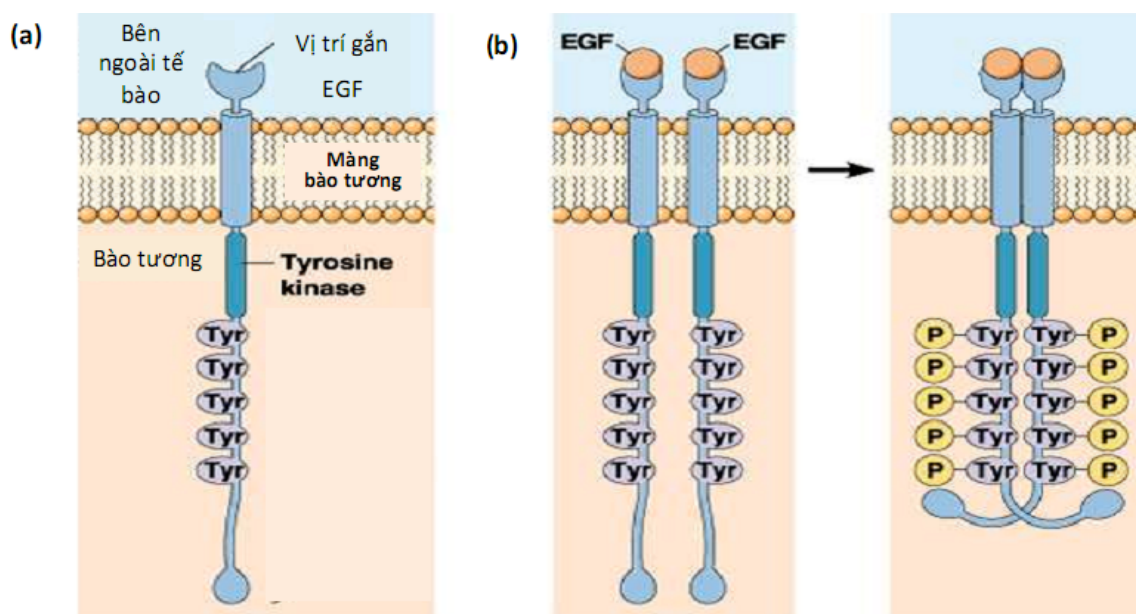
Cấu trúc của thụ thể EGFR:



Hình 1.2. Cấu trúc thụ thể phát triển biểu bì (EGFR)[76]

Thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì nằm trên bề mặt tế bào, đây là một glycoprotein xuyên màng, phần nằm bên trong tế bào của thụ thể này gắn với một tyrosine kinase. Tyrosine kinase này được hoạt hóa khi EGF đến gắn với thụ thể này. Thụ thể này do một gen nằm trong tế bào quy định, đó là một tiền – gen sinh ung thư. Sự đột biến, thay đổi trong gen, hoặc sự khuếch đại gen này sẽ làm thay đổi thụ thể này và có thể gây gia tăng nguy cơ ung thư.

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 1.3.(a) Cấu trúc thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR);(b) Sự hoạt hóa của EGFR [49]

Chức năng của thụ thể EGFR:

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, ngoài ra còn có Src tyrosine kinase, PLC γ , PKC và STAT [48], [49]. 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 [47], [49].

Gen quy định *EGFR* và thụ thể EGFR đã được tìm thấy ở mô tuyến vú bình thường và nhiều loại mô khác. 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.

Trong quá trình sinh bệnh ở người:

Bệnh ung thư : Các đột biến gen *EGFR* đã dẫn đến sự biểu hiện quá mức EGFR, được biết như quá trình điều hòa tăng hoặc sự hoạt hóa 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*. 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, u não nguyên phát, UTPKTBN, ung thư đại trực tràng, ung thư tụy và ung thư vú.

Bệnh do viêm nhiễm: Tín hiệu EGFR bất thường có liên quan đến các bệnh như vẩy nến, bệnh eczema và xơ vữa động mạch. Tuy nhiên vai trò trong từng trường hợp rất khó xác định.

Ngoài ra, cũng do vị trí quan trọng này nên EGFR còn trở thành đích nhắm tiềm năng cho các thể hệ thuốc mới điều trị ung thư.

1.3.3. Đột biến gen *EGFR*

Đột biến *EGFR* trong UTPKTBN được báo cáo lần đầu tiên năm 2004 trên những bệnh nhân có đáp ứng với gefitinib [50] [58]. 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

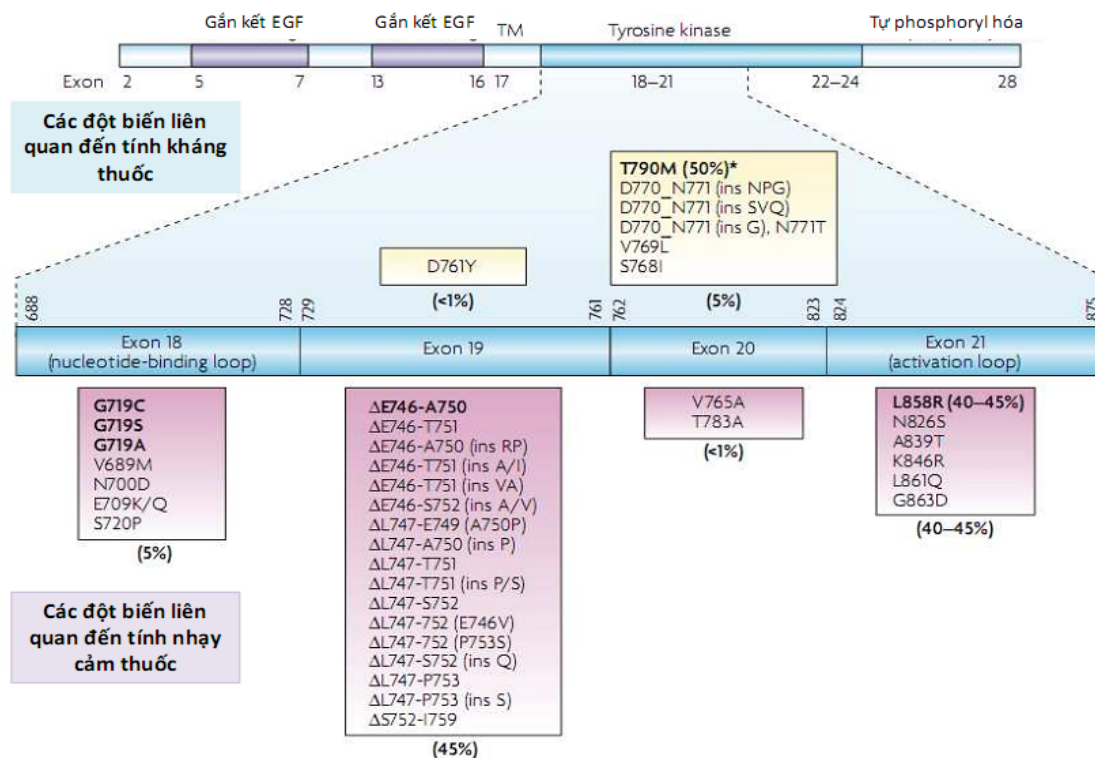
tyrosine kinase, cũng đồng thời là vị trí tương tác của các loại thuốc ức chế tyrosine kinase của EGFR (EGFR TKI).

Trong UTPKTN các đột biến xảy ra tại 4 exon 18-21 của gen *EGFR*, 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 TKI. Những đột biến này được chia làm ba nhóm, các đột biến làm tăng tính nhạy cảm của khối u với thuốc điều trị trúng đích EGFR TKI chủ yếu thuộc hai nhóm I và II.

- Nhóm I: gồm các đột biến xóa đoạn ở exon – bảo tồn khung đọc 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 Nucleotit 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 (G719X), 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 đoạn 12 Nucleotit (tương ứng 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 [73].



Hình 1.4. Các dạng đột biến gen EGFR quyết định tính đáp ứng với EGFR TKI [63]

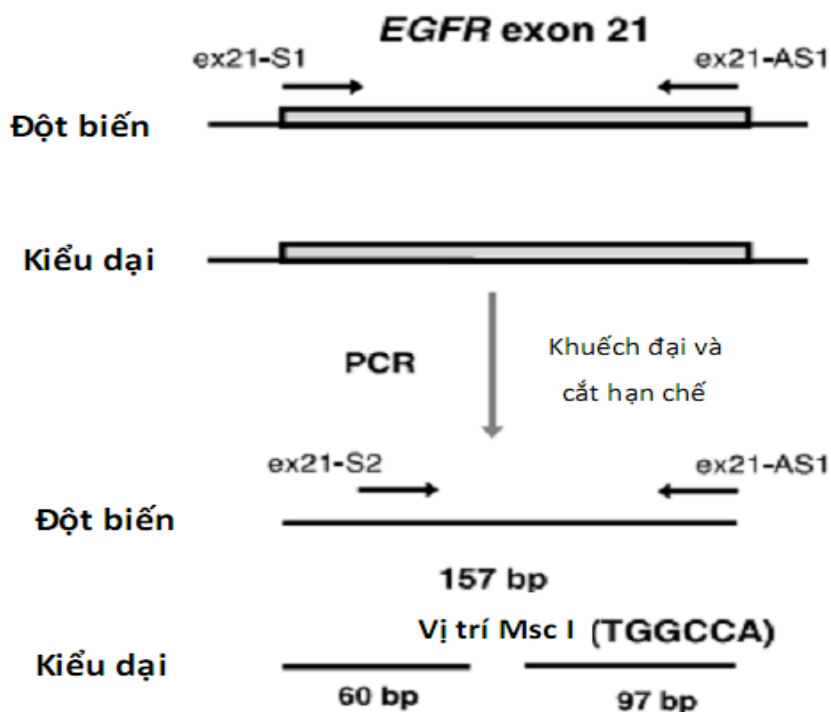
Mỗi kiểu đột biến tạo ra bất thường trong dòng tín hiệu nội bào khác nhau, nhưng hầu hết các đột biến đều ảnh hưởng lên khe gắn ATP của thụ thể, là nơi mà các thuốc ức chế tyrosine kinase phát huy tác dụng bằng việc cạnh tranh với ATP. Các đột biến phổ biến nhất nằm ở exon 19 và 21. Có hơn 20 loại đột biến mất đoạn – bảo tồn khung đọc của exon 19, trong số đó thường thấy nhất là các đột biến delE746_A750, delL747_T751insS và delL747_P753insS. Tại exon 21 thì đột biến L858R là thường gặp nhất, bên cạnh đó cũng có các đột biến khác như L861Q hay L861R. Các đột biến trên exon 18 bao gồm G719C, G719X, G719A và S720F. Các đột biến trên exon 20 thường không có đáp ứng với thuốc ức chế EGFR, bao gồm đột biến chèn đoạn D770_N771insNPG, D770_N771insSVQ, D770_N771insG và các đột biến điểm như T790M, V769L và N771T. Đột biến quan trọng nhất của exon 20 chính là T790M, gặp trong một tỷ lệ nhỏ các trường hợp ung thư biểu mô tuyến đề kháng nguyên phát với thuốc ức chế EGFR và xuất

hiện trong hơn 50% các trường hợp đề kháng mắc phải trong quá trình điều trị với các thuốc này.

1.4. Phương pháp phát hiện đột biến gen *EGFR*

1.4.1. Kỹ thuật PCR - RFLP

Nguyên tắc của phản ứng PCR dựa vào hoạt tính của các ADN polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch ADN mới từ mạch ADN khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotit. 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 ADN khuôn. Sau mỗi chu kỳ các chuỗi đôi ADN mới tạo thành sẽ tiếp tục được dùng để làm các phân tử ADN nền để tổng hợp các ADN mới trong chu kỳ tiếp theo. Sản phẩm cuối của phản ứng PCR là đoạn ADN 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 1.5. Phát hiện đột biến exon 21 gen *EGFR* bằng kỹ thuật RFLP [24]

Sau khi kết thúc phản ứng, sản phẩm PCR đặc hiệu sẽ được tinh sạch và xử lý với enzym cắt hạn chế đã được lựa chọn nhằm tạo ra những phân đoạn ADN nhỏ hơn. Sau khi được điện di trên gel agarose, số lượng và chiều dài các đoạn ADN 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 dại 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 [23]. 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.

1.4.2. Kỹ thuật giải trình tự gen

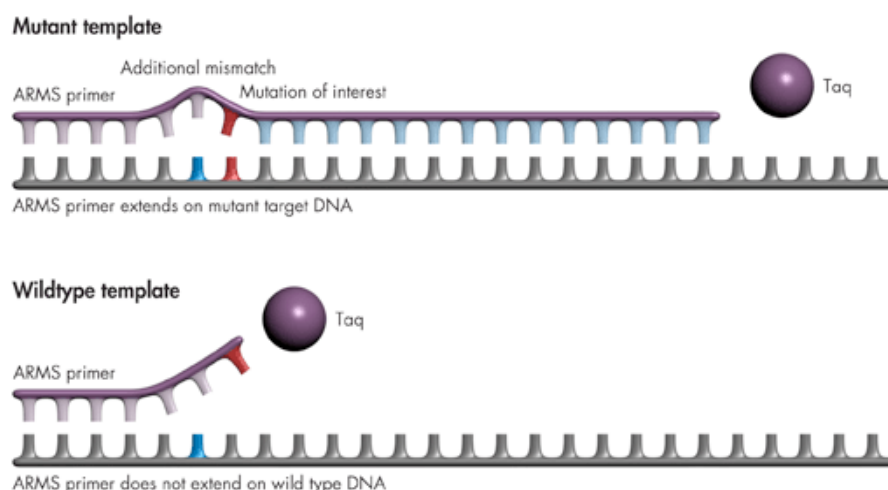
Đoạn ADN cần được giải trình tự được sử dụng như trình tự mẫu cho phản ứng giải trình tự bắt đầu từ vị trí gắn môi. Hỗn hợp của deoxy- và dideoxynucleotit được sử dụng trong phản ứng với nồng độ sao cho các dideoxynucleotit sẽ gắn vào mỗi vị trí mà các deoxynucleotit thường gắn trên đoạn ADN đang được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

1.4.3. Kỹ thuật Scorpion ARMS

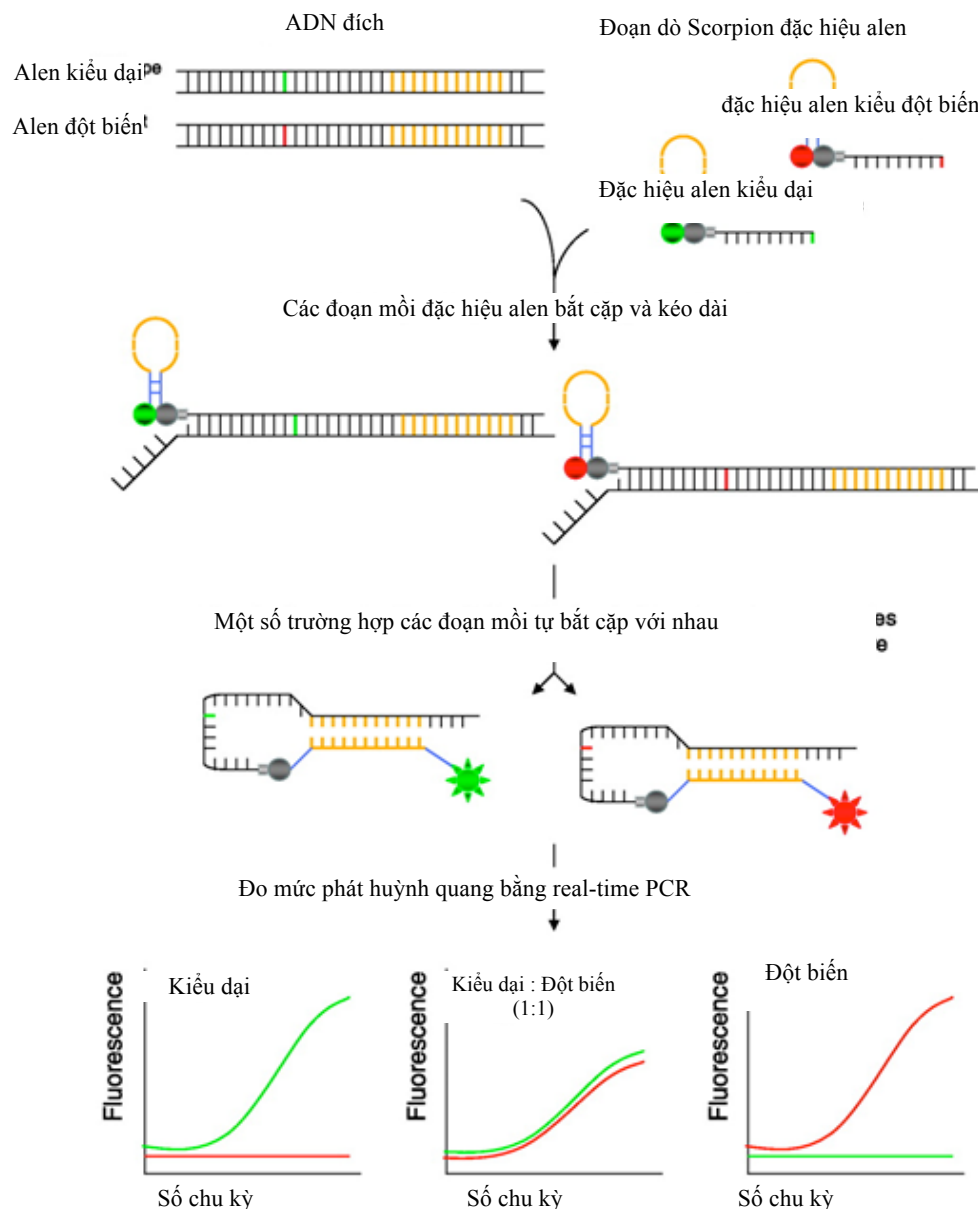
Kỹ thuật Scorpion ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpions trong phản ứng Real-time PCR để phát hiện các đột biến. Nguyên lý của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến là dựa vào đặc tính của Taq ADN polymerase chỉ khuếch đại hoàn chỉnh một phân tử ADN một đầu 3' của mồi và sợi khuôn bổ sung hoàn toàn với nhau. Khi đầu 3' của mồi 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 ADN khuôn.



Hình 1.6. Nguyên lý của kỹ thuật Scorpion ARMS [76]

Scorpion là phân tử có cấu tạo một đầu mang trình tự của đoạn mồi 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 G719X (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)



Hình 1.7. Cơ chế của kỹ thuật Scorpion ARMS [73]

1.4.4. 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*. Nguyên lý cơ bản của kỹ thuật này là: **Khuếch đại ADN = 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 mồi 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 mồi và khuôn (Taq MutS) ngăn không cho phức hợp mồi-khuôn được khuếch đại trong phản ứng kéo dài chuỗi. Chỉ những phức hợp mồi-khuôn ADN ghép cặp hoàn mới được khuếch đại nhờ ADN polymerase, tín hiệu của sản phẩm khuếch đại đặc hiệu đột biến được phát hiện trong hệ thống máy real-time PCR [39].

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 ADN = 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

Đối tượng nghiên cứu là gen *EGFR* của bệnh nhân UTPKTBN tại bệnh viện ung bướu Nghệ An.

- Tiêu chuẩn lựa chọn:

+ Bệnh nhân được chẩn đoán giải phẫu bệnh là UTPKTBN.

+ Giai đoạn bệnh muộn, không thể phẫu thuật triệt căn.

+ Không có bệnh nội khoa phối hợp có chống chỉ định hóa chất.

- Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Không còn mô trong khối nén.

2.2. Khách thể nghiên cứu

Bệnh nhân UTPKTBN điều trị tại bệnh viện Ung bướu Nghệ An.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Bệnh viện Ung bướu Nghệ An – thành phố Vinh – Nghệ An.

- Thời gian: tháng 10 năm 2016 đến tháng 6 năm 2017.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, hồi tiến cứu.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

Có nhiều phương pháp làm xét nghiệm phân tích gen *EGFR*, với điều kiện nghiên cứu ở khoa Giải phẫu bệnh, bệnh viện Ung bướu Nghệ An, chúng tôi tiến hành 2 kỹ thuật phân tích đột biến gen *EGFR* đó là: kỹ thuật Scorpion ARMS thực hiện trên máy Real-time PCR và kỹ thuật giải trình tự gen thực hiện trên máy giải trình tự gen.

2.5.1. Thiết bị nghiên cứu

Bảng 2.1: Các trang thiết bị phục vụ nghiên cứu

Tên thiết bị	Hãng sản xuất
Máy vùi bệnh phẩm	Thermo Scientific Histostar – Anh
Tủ an toàn sinh học cấp 2	ESCO - Singapore
Tủ âm sâu (-30°C, -80°C)	ESCO - Singapore
Máy đo nồng độ and	Thermo Scientific Histostar Anh
Máy cắt tiêu bản (dao cắt thích hợp để cắt được khối paraffin phải cắt được những mảnh kích thước 5 ~ 10 µm)	Thermo Scientific Histostar Anh
Máy ly tâm nhỏ - Microcentrifuge	Eppendorf – Đức
Máy ly tâm lắng mẫu nhanh	Eppendorf – Đức
Máy ủ nhiệt (điều chỉnh được từ 37- 90°C)	Thermo Scientific Histostar Anh
Máy vortex	Stuart (Bibby) – Anh
Buồng thao tác PCR	ESCO - Singapore
Máy Realtime-PCR 7500 fast	ABI – Mỹ
Máy giải trình tự ADN ABI 3130	ABI – Mỹ
Pipett chuyên dụng cho sinh học phân tử	Eppendorf – Đức
Hệ thống điện di, máng đổ gel, lược tạo giếng	Mupid - Nhật Bản
Máy đo quang phổ (định nồng độ ADN, RNA)	Thermo Electron Corporation (Biomate) – Anh
Máy luân nhiệt	Gene Amp PCR System 9700 – Mỹ
Lò vi sóng	Panasonic – Nhật Bản
Máy soi và chụp ảnh tự động gel agarose đã điện di	Dolphin Chemic Wealtec – Mỹ

2.5.2. Hóa chất phục vụ nghiên cứu

- Hóa chất tách chiết ADN 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 ADN:

- 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, Mg^{2+} , nước cất.
- Các cặp mồi đặc hiệu (xuôi và ngược)

- Hóa chất điện di sản phẩm PCR:

- Agarose, dung dịch TBE (boric acid EDTA),
- Ethidium bromide, loading dye, thước đo ADN.

- 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.

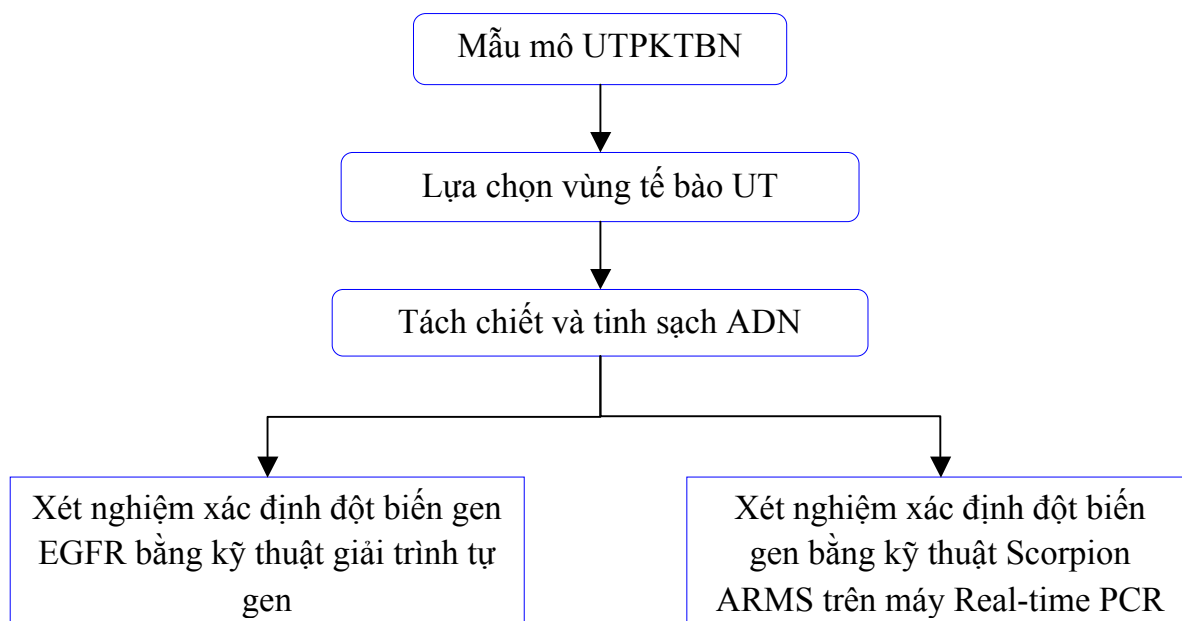
- Hóa chất giải trình tự gen: BigDye Terminator version 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) gồm:

- 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 của hãng Qiagen, gồm:

- Dung dịch đệm (có chứa hỗn hợp dNTP), Mg^{2+} , nước cất
- Các hỗn hợp đoạn mồi Scorpions
- Taq ADN polymerase
- Dung dịch chứng

2.6. Các bước tiến hành phân tích đột biến gen EGFR



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu xác định đột biến gen EGFR

2.6.1. Phương pháp lấy mẫu mô tế bào ung thư

Mẫu mô bệnh phẩm được sinh thiết hoặc phẫu thuật cắt từ khối u bệnh nhân, sau đó được chuyển vào khối nén. Có thể thay thế bằng mẫu mô sinh thiết lõi kim (corebiopsy) hoặc tế bào học hạch di căn, dịch màng phổi, dịch rửa phế quản và chải phế quản... Tuy nhiên, số lượng của mô hiện diện trong các mẫu này có thể làm giảm tỷ lệ thành công của xét nghiệm.

2.6.2. Quy trình xử lý mẫu bệnh phẩm

Xử lý mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp mô học

- Bước 1: Cố định bệnh phẩm (BP)

Mục đích giúp lưu giữ mẫu bền vững, lâu ngày. Mẫu không bị tiêu hủy bởi các men có sẵn bên trong tế bào hay bởi các vi khuẩn và bảo vệ cấu trúc nguyên vẹn ở mức độ phân tử.

+ Mẫu được cho vào dung dịch có chất cố định là Formaldehyt 10%.

+ Yêu cầu: BP cố định ngay sau khi lấy, không được làm dập nát, không được cắt bệnh phẩm quá dày, không để một mặt BP dính vào lọ đựng, đủ dung dịch cố định cần thiết, thời gian cố định thích hợp.

- Bước 2: Xử lý bệnh phẩm

Khử nước bằng dung dịch cồn; khử cồn bằng xylem và vùi trong paraffin để loại xylem bằng máy xử lý mô trong 3 giờ.

- Bước 3: Cắt và dán

Mẫu bệnh phẩm sau khi xử lý, được đúc vào khối parafin, làm lạnh và cắt bằng máy cắt Microtome (2-3 μ m), cố định mẫu trên lam kính, dùng xyleme để tẩy parafin, qua các bể dung dịch ethanol (70%, 90% và 100%) để tẩy paraffin và rửa sạch bằng nước cất trong 5 phút.

- Bước 4: Nhuộm Hematoxylin-Eosin

Cố định mẫu trên lam kính, nhuộm nhân bằng dung dịch hematoxylin trong 3-5 phút và rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 5-10 phút. Kiểm tra màu sắc của nhân qua kính hiển vi (nếu đậm rửa bằng cồn axit). Làm xanh trong dung dịch Lithium cacbonat bão hòa trong 1 phút. Rửa lại dưới vòi nước chảy (1 phút). Tiếp tục nhuộm bào tương bằng eosin 10% trong 1-2 phút, sau đó rửa lại dưới vòi nước chảy (1 phút), cho qua hai bể dung dịch ethanol (90%, 100%) mỗi bể nhúng 15 lần để tẩy eosin. Cuối cùng làm trong tiêu bản bằng xylem 5-10 phút. Trước khi kiểm tra dưới kính hiển vi, mẫu được cố định bằng lamen và dán keo Boume Canada.

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 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). Cạo bệnh phẩm có chứa các tế bào ung thư 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 thu toàn bộ vào tube ly tâm. Sử dụng vùng mô này để tách chiết, tinh sạch ADN bộ gen.

2.6.3. Quy trình tách chiết và tinh sạch ADN

2.6.3.1. Quy trình xử lý mẫu mô UTP trong paraffin:

1. Sau khi xác định vùng tập trung tế bào ung thư của mẫu mô, cắt 10-20 lát mô (7 - 10 μm) cho vào ống eppendorf 1,5 ml.
2. Thêm vào 1200 μl dung dịch xylene, ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút rồi trộn đều bằng máy Vortex.
3. Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 15000 vòng/phút trong 5 phút, đổ bỏ phần dung dịch phía trên, giữ lại phần cặn lắng.
4. Thêm vào ống 1200 μl ethanol 100%, trộn đều bằng máy vortex và ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút.
5. Ly tâm hỗn hợp với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 5 phút, bỏ phần dung dịch phía trên, giữ lại phần cặn lắng.
6. Lặp lại bước 4 và 5.

Mẫu sau khi được chuẩn bị, tiếp tục:

7. Thêm 500 μl Lysis buffer vào ống chứa hỗn hợp ở trên.
8. Thêm 25 μl dung dịch SDS 10%.
9. Thêm 20 μl dung dịch proteinase K (nồng độ 1 mg/ ml).
10. Ủ ống hỗn hợp trên ở 56°C trong 15 phút.

2.6.3.2. Quy trình tách chiết genomic ADN

1. Bổ sung 1m80 μl đệm DTL và 20 μl dung dịch proteinase K, trộn bằng máy vortex.

2. Ủ ở 56°C trong 1 giờ để ly giải mẫu mô. Nếu mẫu mô không ly giải hoàn toàn, hoặc cần nồng độ ADN cao hơn, ủ với thời gian lâu hơn hoặc qua đêm.
3. Thêm, 10 µl đệm DES. Chuyển ống ly tâm sang máy ủ nhiệt orbital và ủ ở 90°C trong vòng 1 giờ.
4. Ly tâm nhanh trong 5 -10 giây. Nếu yêu cầu ADN không có RNA, đưa mẫu về nhiệt độ phòng và thêm 2 µl RNase A (100 mg/ ml) và ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
5. Thêm 200 µl đệm DTB và 200 µl ethanol (96~100%) trộn bằng máy vortex.
6. Ly tâm nhanh 5-10 giây.
7. Chuyển toàn bộ phần ly giải sang cột ADN Spin Column (trong ống thu 2 ml). Không làm ướt viên, đóng nắp và ly tâm 10000 x g trong 1 phút.
8. Bỏ phần dung dịch trong ống thu.
9. Thêm 600 µl đệm DW1 và ADN spin Column, ly tâm 10000 x g trong 1 phút.
10. Bỏ phần dung dịch trong ống thu.
11. Thêm 600 µl đệm DW1 và ADN spin Column, ly tâm 10000 x g trong 1 phút.
12. Bỏ ống thu.
13. Đặt cột ADN Spin Column vào ống thứ 2 ml mới, ly tâm 13000 x g trong 3 phút.
14. Bỏ ống hút.
15. Đặt cột ADN Spin Column vào ống thu 1,5 ml mới.
16. Thêm 30-100 µl đệm DTE vào tâm của màng. Không chạm vào màng.
17. Ủ ở nhiệt độ phòng (15-25°C) trong vòng 1-5 phút.
18. Ly tâm 13000 x g trong 1 phút.

ADN tách chiết có thể sử dụng ngay hoặc bảo quản ở -20°C.

2.6.4. Phương pháp phân tích đột biến gen EGFR

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng 2 phương pháp phân tích đột biến gen đó là: Scorpion ARMS thực hiện trên máy Realtime PCR 7500 Fast của hãng ABI và giải trình tự gen tự động thực hiện trên máy giải trình tự ABI 3130.

2.6.4.1. Quy trình phân tích đột biến gen bằng kỹ thuật Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR

Bước 1:

- Chuẩn bị các ống Eppendorf 0.2 ml tương ứng với số lượng mẫu
- Rã đông EGFR mixed standard ở nhiệt độ phòng, trộn đều bằng cách đảo ống 10 lần (chú ý: không sử dụng máy vortex để trộn đều hỗn hợp này). Ly tâm nhẹ.

- Rã đông EGFR taq ADN polymerase ở nhiệt độ phòng, trộn đều bằng pipet hoặc búng nhẹ (chú ý: không sử dụng máy vortex). Ly tâm nhẹ.

Bước 2: Chuẩn bị các ống phản ứng như sau:

+ Ống mẫu: Hút 42.3 μ l ADN mẫu (đã tách chiết ở trên).

+ Ống chứng (+): Hút 42.3 μ l EGFR mixed standard

+ Ống chứng (-): Hút 42.3 μ l mẫu đối chứng âm

Bước 3: Bổ sung 2 μ l EGFR taq ADN polymerase vào 3 ống trên

Bước 4: Lấy 3 strip (8 ống phản ứng/strip) master mix EGFR mutation có sẵn. Ký hiệu tên để phân biệt.

Lần lượt hút 5 μ l từ ống chứng (-), chứng (+) và ống mẫu vào tương ứng với strip 1,2,3.

Chú ý: Cho vào sát thành ống sát trên lớp hỗn hợp ở các ống trong strip.

Bước 4: Ly tâm nhẹ

Bước 5: Đặt các strip phản ứng vào khay để mẫu của máy real-time 7500 fast và cài đặt chương trình trên phần mềm 7500 sorftware v3.2.

Bước 6: Đọc kết quả trên phần mềm 7500 sorftware v3.2.

Bảng 2.2: Các dạng đột biến exon 18-21 gen EGFR được phát hiện bằng kỹ thuật Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR

Đột biến	Exon	Biến đổi Nucleotit	Cosmic ID [75]
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
G719X	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

2.6.4.2. Quy trình phân tích đột biến gen bằng kỹ thuật giải trình tự ADN

Khuếch đại các exon 18 -21 của gen EGFR bằng PCR:

ADN 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*.

Bảng 2.3: Các đoạn mồi dùng để khuếch đại exon 18 – 21

TÊN MỒI	TRÌNH TỰ 5' ---3'	EXON KHUẾCH ĐẠI ĐƯỢC	KÍCH THƯỚC (bp)
EGFR-18F	AGGGCTGAGGTGACCCTTGT	18	245
EGFR-18R	CTTGCAAGGACTCTGGGCT		
EGFR-19F	ACCATCTCACAATTGCCAGTTAAC	19	208
EGFR-19R	GAGAAAAGGTGGGCCTGAGG		
EGFR-20F	ACCTGGAAGGGGTCCATGTG	20	318
EGFR-20R	CATGTGAGGATCCTGGCTCC		
EGFR-21F	TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTT	21	212
EGFR-21R	ATGCTGGCTGACCTAAAGCC		

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose

❖ Chuẩn bị gel agarose 1,5%

- Cân 1,5g agarose hòa tan trong 10 ml 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 µl	
Sản phẩm PCR	-	9 µl
Dung dịch đệm 10X	-	1 µl
Tổng số	10 µl	10 µl

- 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 µl/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.

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 1,5 ml, thêm vào 10 µl 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 ADN 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 µl 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 nước cất không chứa enzyme phân giải axit nucleic (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 ADN đích đã được tinh sạch. Tiếp tục thực hiện các kỹ thuật hoặc trữ ống ở -20°C.

Thực hiện giải trình tự chuỗi ADN:

Đoạn ADN 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 ABI 3130.

❖ **Quy trình PCR khuếch đại gen EGFR** thực hiện tuần 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
<i>Tổng thể tích</i>	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.

❖ **Quy trình tinh sạch sản phẩm sau PCR sử dụng BigDye kit**

Thực hiện tuần 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.
1. Ly tâm ống với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 15 phút.
2. Đổ bỏ phần dung dịch, giữ lại phần cặn lắng ở đáy ống.
3. Thêm vào ống 250 μl ethanol 70%, trộn đều.
4. Ly tâm ống với tốc độ 15 000 vòng/phút trong 10 phút.
5. Đổ bỏ phần dung dịch, giữ lại phần cặn lắng ở đáy ống.
6. Để mảnh sản phẩm PCR khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.
7. Lập tức sử dụng kết tủa của sản phẩm PCR này để thực hiện bước tiếp theo là đọc trình tự gen.

❖ Quy trình giải trình tự xác định đột biến gen EGFR

Ngay sau khi lấy mảnh ADN khô vừa tinh sạch bằng côn 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 ADN.
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 3130 (Applied Biosystems).
7. So sánh kết quả giải trình tự gen với trình tự gen chuẩn tương ứng của GenBank.

Trình tự gen *EGFR* của bệnh nhân sẽ được đối chiếu và so sánh với trình tự GenBank (gen *EGFR*: NG_007726, National Center for Biotechnology Information) và phân tích theo phần mềm Seqscape (Applied Biosystems).

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

- Phân tích kết quả giải trình tự gen trên phần mềm SeqScape.
- Phân tích kết quả xác định đột biến gen *EGFR* bằng Scorpion ARMS trên phần mềm 7500 software v3.2.
- Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê sinh học, sử dụng phần mềm Excel 2010 và phần mềm SPSS 16.0.

2.8. Vấn đề đạo đức y sinh trong nghiên cứu

- Nghiên cứu này được sự cho phép của Bệnh viện ung bướu Nghệ An.
- Tất cả các bệnh nhân đều được tư vấn và tự nguyện tham gia nghiên cứu.
- Các thông tin cá nhân của bệnh nhân được giữ bí mật.
- Đề tài chỉ nhằm phục vụ cho mục đích nghiên cứu, không phục vụ cho bất kì lợi ích nào của người nghiên cứu.

CHƯƠNG 3

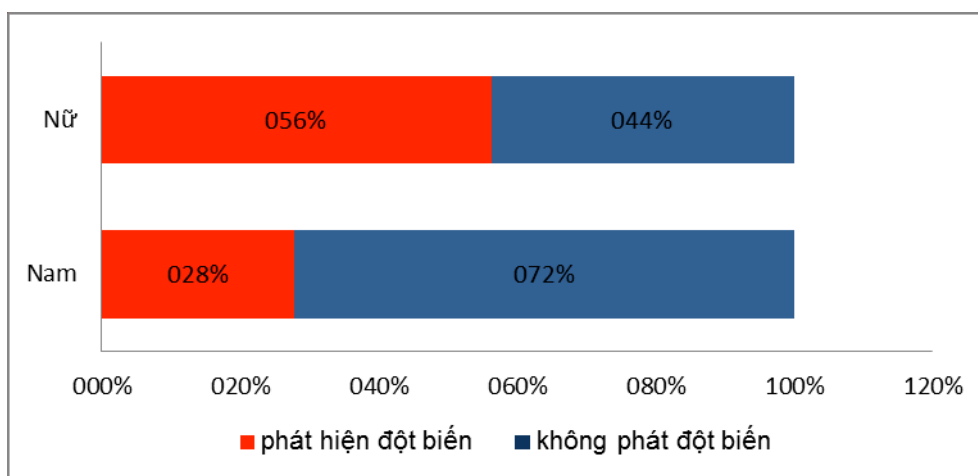
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân UTPKTBN

3.1.1. Tỷ lệ đột biến theo giới tính

Bảng 3.1. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo giới tính

Đặc điểm bệnh nhân		UTPKTBN		Phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến		P
		N	%	n	%	n	%	
Giới Tính	Nam	61	55.96	17	27.87	44	72.13	0,0027
	Nữ	48	44.04	27	56.25	21	43.75	



Hình 3.1. Biểu đồ tỷ lệ đột biến gen EGFR theo giới tính

Trong nghiên cứu này, 109 bệnh nhân UTPKTBN có 61 bệnh nhân nam (chiếm 55,69%), có 48 bệnh nhân nữ (chiếm 44,04%). Tỷ lệ nam/nữ mắc UTPKTBN của chúng tôi là 1,26 thấp hơn các nghiên cứu trước đây của Hoàng Anh Vũ (2014), Phạm Văn Luận (2016) [18], [10]. Nhìn chung, các kết quả trong và ngoài nước đều cho thấy rằng nam giới có tỷ lệ hút thuốc là gấp nhiều lần nữ giới nên tỷ lệ mắc ung thư phổi cũng cao hơn. Tuy nhiên từ những

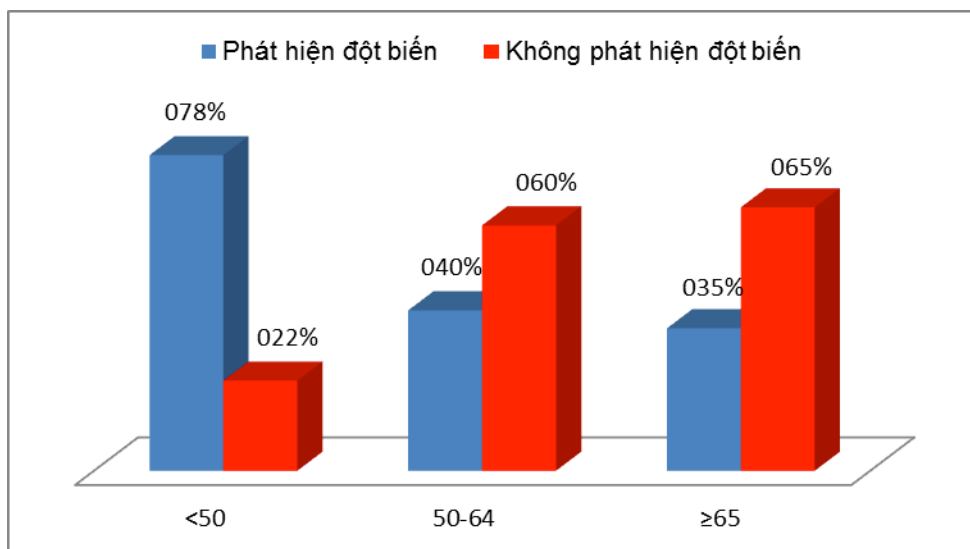
năm cuối thập niên 1990 thì tỷ lệ hút thuốc lá ở nam giới có chiều hướng giảm, trong khi đó nền công nghiệp phát triển kéo theo ô nhiễm môi trường, hóa chất độc hại... Vì vậy các yếu tố này góp phần làm thay đổi tỷ lệ nam/nữ trong ung thư phổi.

Xét sự tương quan giữa đột biến gen *EGFR* và giới tính, có sự khác biệt rõ rệt giữa nam và nữ, tỷ lệ dương tính ở nữ (27/48; 56,25%) cao gấp 2,01 lần ở nam (17/44; 27,87%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu trước đây của Mai Trọng Khoa và cộng sự tại bệnh viện Bạch Mai, có tỷ lệ đột biến gen ở nữ là 55,2% và cao gấp 1,7 lần ở nam [9]. Trong nghiên cứu của tác giả Phạm Văn Luận cũng cho tỷ lệ đột biến gen *EGFR* ở nữ là 55,2% cao hơn ở nam 35,8% [10]. Hơn nữa, các nghiên cứu trên thế giới cũng cho thấy đột biến gen *EGFR* thường gặp ở bệnh nhân nữ nhiều hơn bệnh nhân nam [63].

3.1.2. Đột biến gen *EGFR* theo nhóm tuổi

Bảng 3.2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR theo độ tuổi

Đặc điểm bệnh nhân		Bệnh UTPKTBN		Phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến		p	r
		n	%	n	%	n	%		
Tuổi	<50	9	8,26	7	77,78	2	22,22	0,19	0,99
	50-64	43	39,45	17	39,53	26	60,47		
	≥65	57	52,29	20	35,09	37	64,91		
	Trung bình	63,8 ± 10,6							



Hình 3.2. Biểu đồ tương quan giữa đột biến gen *EGFR* và độ tuổi

- Trong nghiên cứu này, bệnh nhân có độ tuổi phân bố từ 33 tuổi đến 83 tuổi, tuổi trung bình của bệnh nhân UTPKTBN là $63,8 \pm 10,6$ tuổi. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Phạm Văn Luận và cộng sự, độ tuổi trung bình mắc UTPKTBN là $61,66 \pm 10,57$ và nghiên cứu của Nguyễn Minh Hải và cộng sự năm 2013 nhóm bệnh nhân UTPKTBN có độ tuổi trung bình là 64,4 tuổi [10], [5]. Kết quả này thấp hơn một số nghiên cứu khác đã công bố như của Nguyễn Ngọc Quang có độ tuổi trung bình là 57,8 tuổi, Hoàng Anh Vũ (2011) là 59 tuổi. [18], [14].

- Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ở độ tuổi ≥ 65 tỷ lệ bệnh nhân mắc bệnh chiếm tỷ lệ cao nhất, 52,29%, độ tuổi 50-64 chiếm 39,45%, thấp nhất là độ tuổi dưới 50 chiếm 8,26%. Như vậy tỷ lệ mắc bệnh UTPKTBN liên quan thuận chặt với độ tuổi, với $r = 0,99$. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước, tuổi càng cao nguy cơ mắc ung thư phổi càng lớn.

- Xét sự tương quan giữa đột biến gen *EGFR* với tuổi mắc bệnh, cho thấy tỷ lệ bệnh nhân UTPKTBN mang đột biến gen chiếm tỷ lệ cao nhất ở nhóm tuổi dưới 50 (chiếm 77,78%), thấp nhất là độ tuổi ≥ 65 (chiếm 35,1%).

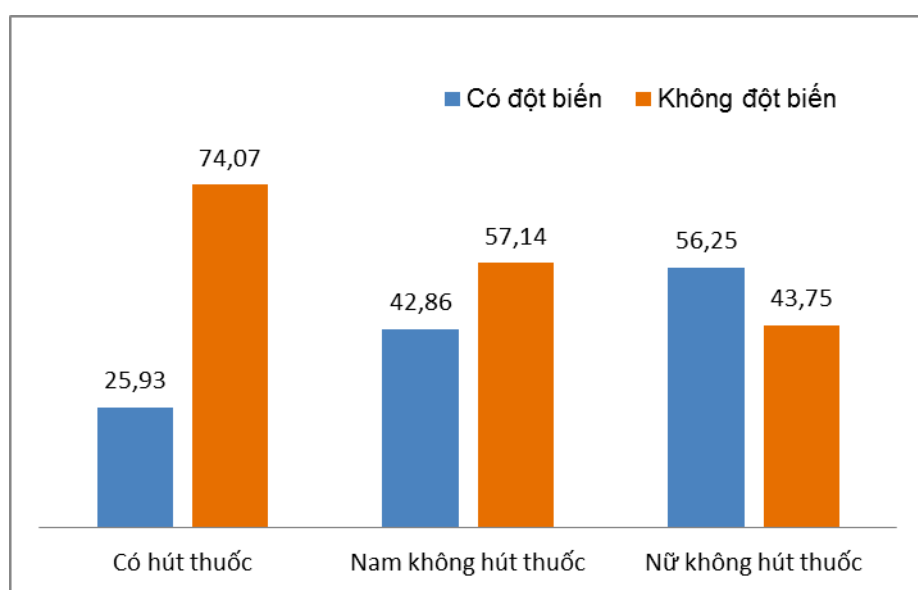
Như vậy, diễn biến đột biến gen *EGFR* trên bệnh nhân UTPKTBN ở người trẻ tuổi thường là do lỗi trong cấu trúc ADN. Trong khi đó ở những bệnh nhân lớn tuổi ung thư cao song nguyên nhân do đột biến thấp. Kết quả này cũng hoàn

toàn phù hợp cơ chế sinh bệnh, bởi UTPKTBN phụ thuộc rất nhiều vào sự thay đổi trong cấu trúc di truyền và độ ổn định trong quá trình phân bào. Ở những bệnh nhân trẻ, sự kế thừa các yếu tố nguy cơ (mang gen đột biến) từ bố mẹ, khi gặp các yếu tố kích hoạt, các gen này sẽ được hoạt hóa và biểu hiện. Ở đối tượng này các gen dễ bị tác động bởi các yếu tố môi trường, do sự tích lũy trong quá trình sống, dẫn đến các prooncogen sẽ chuyển sang trạng thái oncogen, các gen sẽ khuếch đại, tạo nên sự sinh sản bất thường của các tế bào, hình thành khối u. Trong khi đó những bệnh nhân lớn tuổi các yếu tố nguy cơ là sự già hóa của tế bào, kèm theo sự suy giảm hệ miễn dịch tạo kẽ hở cho các tế bào ung thư phát triển.

3.1.3. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* theo thói quen hút thuốc lá

Bảng 3.3. Tỷ lệ đột biến theo đặc điểm bệnh nhân có/không hút thuốc

Đặc điểm bệnh nhân			UTPKTBN		Phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến		p
			n	%	n	%	n	%	
Hút Thuốc	Có hút thuốc		54	49,54	14	25,93	40	74,07	0,24
	Không hút thuốc	Nam	7	6,42	3	42,86	4	57,14	
		Nữ	48	44,04	27	56,25	21	43,75	



Hình 3.3. Biểu đồ tỷ lệ đột biến theo đặc điểm bệnh nhân có/không hút thuốc

Nhận xét:

- Tỷ lệ bệnh nhân UTP có hút thuốc lá là 49,54%, tất cả là đối tượng nam. Trong đó mang gen đột biến chiếm 25,29%.
- Tỷ lệ bệnh nhân nam không hút thuốc mắc ung thư phổi không liên quan đến hút thuốc lá chỉ chiếm 6,42%, mang gen đột biến chiếm 42,86%. Nữ UTP chiếm 44,04% nhưng tỷ lệ mang gen đột biến chiếm 56,25%.

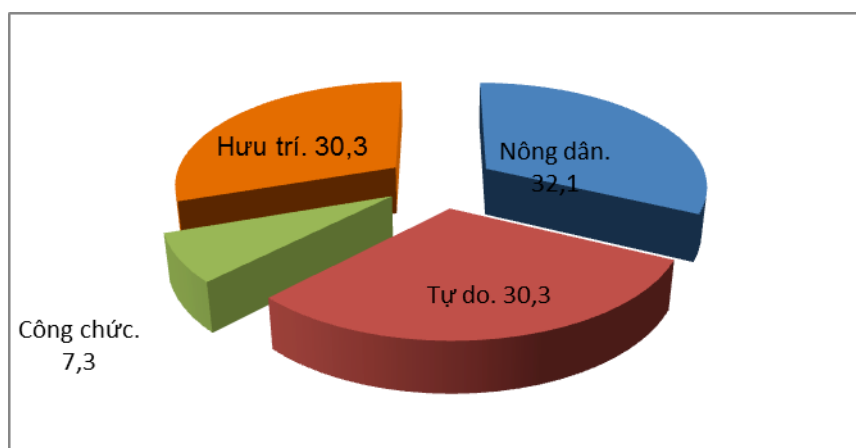
Đối chiếu kết quả nghiên cứu này với các công trình nghiên cứu khác cho thấy tỷ lệ bệnh nhân có hút thuốc mắc UTP trong nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu của Phạm Văn Luận và cộng sự (2016) là 61,9 % và nghiên cứu Mai Trọng Khoa và cộng sự là 57,1% [9][10]. Như vậy, các nghiên cứu đều cho dữ liệu nhóm hút thuốc lá có tỷ lệ UTPKTBN cao hơn nhóm không hút thuốc. Các nghiên cứu dịch tễ học nhận thấy trong khói thuốc lá có trên 50 hợp chất gây ung thư. Nên sau 20 năm hút thuốc lá sẽ xuất hiện nguy cơ tăng tỷ lệ ung thư lên theo thời gian hút thuốc. Theo thống kê của WHO tỷ lệ nam giới hút thuốc ở nước ta là 56,4%, do đó, ở nam giới có tỷ lệ ung thư phổi cao hơn nữ.

Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng tỷ lệ bệnh nhân có đột biến gen *EGFR* ở nhóm không hút thuốc lá lại rất cao nam chiếm 42,86%, nữ chiếm 56,25% trong nhóm không hút thuốc lá. Kết quả nghiên cứu này cũng đã được đề cập trong các công trình nghiên cứu của PIONEER, của Mai Trọng Khoa và cộng sự (2014) [9], [64]. Điều này gợi ra rằng, những bệnh nhân UTPKTBN không có tiền sử hút thuốc lá, khi phát hiện ra ung thư phổi cần phải có chỉ định làm xét nghiệm gen *EGFR* để định hướng cho điều trị.

3.1.4. Đặc điểm nghề nghiệp, địa bàn cư trú của bệnh nhân UTPKTBN

Bảng 3.4. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* theo nghề nghiệp

Nghề nghiệp	UTPKTBN		Có phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến	
	n	%	n	%	n	%
Nông nghiệp	35	32.1	20	57,14	15	42,86
Tự do	33	30.3	10	30,3	23	69,7
Công chức	8	7,3	3	37,5	5	37,5
Hưu trí	33	30.3	11	33,33	22	66,67



Hình 3.4. Biểu đồ tỷ lệ nghề nghiệp của bệnh nhân UTPKTBN

Nhận xét:

- Tỷ lệ mắc UTPKTBN cao nhất ở những bệnh nhân làm nông nghiệp (32,1%) và kế đến là lao động tự do và hưu trí (đều chiếm tỷ lệ 30,3%), nhóm công chức mắc UTPKTBN thấp nhất (chiếm 7,3%).

- Nhóm có tỷ lệ bệnh nhân dương tính với đột biến gen *EGFR* cao là nhóm làm nông nghiệp chiếm tỷ lệ 57,14 (20/35 bệnh nhân) và tỷ lệ này thấp nhất ở nhóm nghề lao động tự do có tỷ lệ 30,3% (10/33 bệnh nhân).

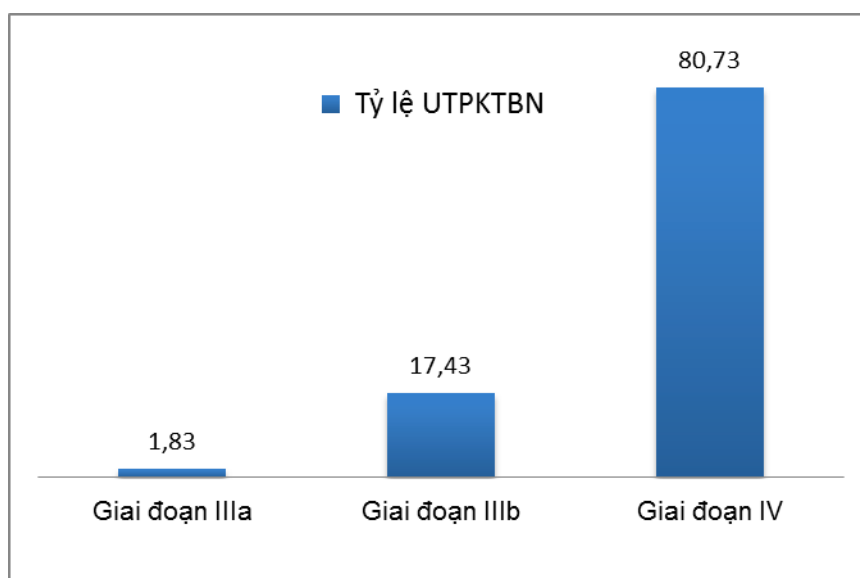
Điều này có thể suy luận đến tính chất nghề nghiệp có ảnh hưởng đến bệnh ung thư. Kết quả này cũng đã được khẳng định trong các công trình nghiên cứu

khác. Trong nghiên cứu này, có thể do những bệnh nhân làm nông nghiệp nhận thức thấp, ý thức bảo vệ sức khỏe bản thân kém và thường xuyên tiếp xúc trực tiếp với các yếu tố gây ung thư như thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, diệt chuột... nên ở nhóm này có nguy cơ mắc UTP và đột biến gen cao hơn.

3.1.5. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* theo giai đoạn bệnh

Bảng 3.5. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* theo giai đoạn bệnh

Đặc điểm bệnh nhân		UTPKTBN		Phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến		P
		n	%	n	%	n	%	
Giai đoạn	IIIa	2	1,83	1	50	1	50	0,166
	IIIb	19	17,43	4	21,05	15	78,95	
	IV	88	80,73	39	44,32	49	55,68	



Hình 3.5. Biểu đồ tỷ lệ giai đoạn bệnh của UTPKTBN

Nhận xét:

- Bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn IV chiếm tỷ lệ cao nhất 80%, trong đó mang gen đột biến 44,32%.

- Bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn IIIa chiếm tỷ lệ thấp nhất 1,83% trong đó mang gen đột biến chiếm 50%.

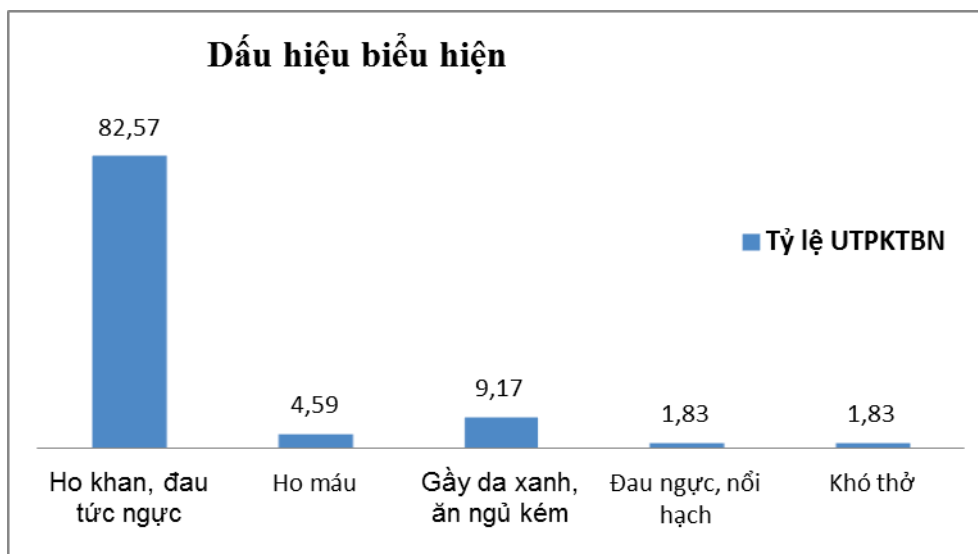
Giai đoạn bệnh trong ung thư phổi là để đánh giá khối u đang ở tại chỗ, tại vùng hay đã xâm lấn, di căn. Ở Việt Nam, sự phát hiện ung thư nói chung và UTPKTBN nói riêng thường được phát hiện ở giai đoạn muộn (giai đoạn IV). Ở giai đoạn này các tế bào ung thư đã bung ra khỏi các khối u, chúng sẽ theo mạch máu hoặc tĩnh mạch bạch huyết di căn sang các vị trí khác.

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam [9], [10], [18]. Giai đoạn bệnh là yếu tố rất quan trọng trong chỉ định điều trị và là yếu tố độc lập trong tiên lượng bệnh. Tiên lượng UTP phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giai đoạn phát hiện, kích thước, mức độ khu trú khối u, loại ung thư và thể trạng của bệnh nhân. UTPKTBN có tiên lượng tốt nếu được phát hiện sớm khi còn khả năng phẫu thuật để loại bỏ hoàn toàn khối u và kết hợp với các liệu pháp điều trị 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 bệnh.

3.1.6. Dấu hiệu biểu hiện của bệnh nhân UTPKTBN

Bảng 3.6. Dấu hiệu biểu hiện của bệnh UTPKTBN

Đặc điểm		n	Tỷ lệ (%)
Dấu hiệu biểu hiện	Ho khan, đau tức ngực	90	82,57
	Ho máu	5	4,59
	Gầy da xanh, ăn ngủ kém	10	9,17
	Đau ngực, nổi hạch	2	1.83
	Khó thở	2	1,83



Hình 3.6. Biểu đồ các dấu hiệu biểu hiện của bệnh UTPKTBN

Nhận xét:

Dấu hiệu thường gặp nhất ở bệnh nhân UTPKTBN là ho khan, đau tức ngực chiếm tới 82,57% (90/109 bệnh nhân). Dấu hiệu biểu hiện cận ung thư như đau ngực kèm nổi hạch, khó thở ít gặp đều chiếm tỷ lệ 1,83% (2/109 bệnh nhân), ho máu (5/109; 4,59%). Nghiên cứu của tác giả Phạm Văn Luận cũng cho kết quả tương tự triệu chứng ho khan đau ngực chiếm chủ yếu với tỉ lệ tương ứng là 58,8% và 66,2% [10]. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy bệnh nhân đến viện vì lý do ho khan và đau ngực.

Ung thư phổi có diễn tiến âm thầm, thường không biểu hiện triệu chứng ở giai đoạn đầu của bệnh vì phổi có ít thần kinh cảm giác đau và nhờ khả năng dự trữ hô hấp khá lớn của cả hai phổi. Các triệu chứng lâm sàng của ung thư phổi không hoàn toàn đặc hiệu, có thể cũng gặp trong các bệnh lý lành tính của phổi. Cần lưu ý rằng khoảng 10% trường hợp ung thư phổi không hề có triệu chứng nào khi được chẩn đoán, chỉ được phát hiện tình cờ trên phim phổi khi khám sức khỏe tổng quát. Khối u có thể phát triển bên trong khí đạo, gây khó thở do tắc nghẽn. Sự tắc nghẽn cũng làm ứ đọng các chất tiết, tạo điều kiện cho viêm phổi xuất hiện. Các khối u thường có hệ thống mạch máu cung cấp rất phong phú

nhưng lại dễ vỡ, gây nên triệu chứng ho ra máu. Qua nghiên cứu cho thấy phần lớn là những triệu chứng không đặc trưng cho UTPKTBN mà có thể nhầm lẫn các bệnh lành tính. Vì vậy cần lưu ý đến việc thăm khám phát hiện và tầm soát UTP.

3.1.7. Tỷ lệ đột biến theo phân loại giải phẫu bệnh

Bảng 3.7. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* theo đặc điểm giải phẫu bệnh

Đặc điểm bệnh nhân		UTPKTBN		Phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến		p
		n	%	n	%	n	%	
Phân loại giải phẫu bệnh	Biểu mô tuyến	105	96,33	61	55,96	44	40,37	0,42
	Biểu mô vảy	3	2,75	0	0,00	3	100	
	Biểu mô tuyến - vảy	1	0,92	1	100	0	0	
	Biểu mô tế bào lớn	1	0,92	0	0	1	100	

Nhận xét:

- UTPKTBN chủ yếu ở thể ung thư biểu mô tuyến chiếm 96,33%, tỷ lệ đột biến gen *EGFR* chiếm 55,96%.

- Tỷ lệ UTPKTBN thể ung thư biểu mô tế bào tuyến – vảy, ung thư biểu mô tế bào lớn chiếm 0,92% mỗi loại và còn lại 2,75% là ung thư biểu mô vảy.

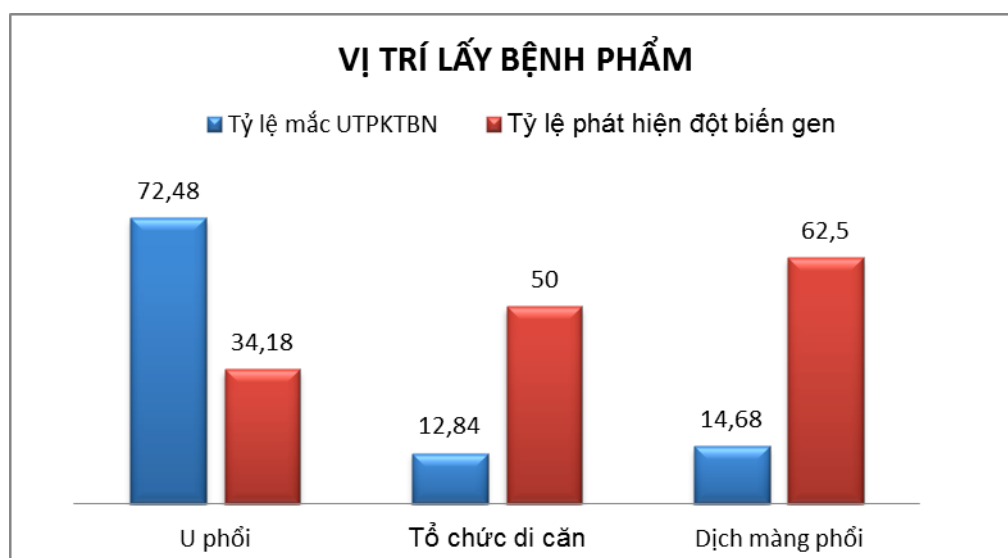
Đặc điểm mô bệnh học là yếu tố quan trọng trong chỉ định điều trị và tiên lượng của bệnh ung thư phổi. Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận ung thư biểu mô tuyến chiếm tỷ lệ cao nhất [9],[10], [18]. Điều đáng chú ý trong nghiên cứu này, chúng tôi đã bắt gặp 03 mẫu ung thư biểu mô vảy đều dương tính với đột biến gen *EGFR*. Trong các nghiên cứu trước đây đã cho rằng ung thư biểu mô vảy không mang đột biến gen. Vấn đề này cần có các nghiên cứu sâu hơn và với số lượng mẫu lớn hơn.

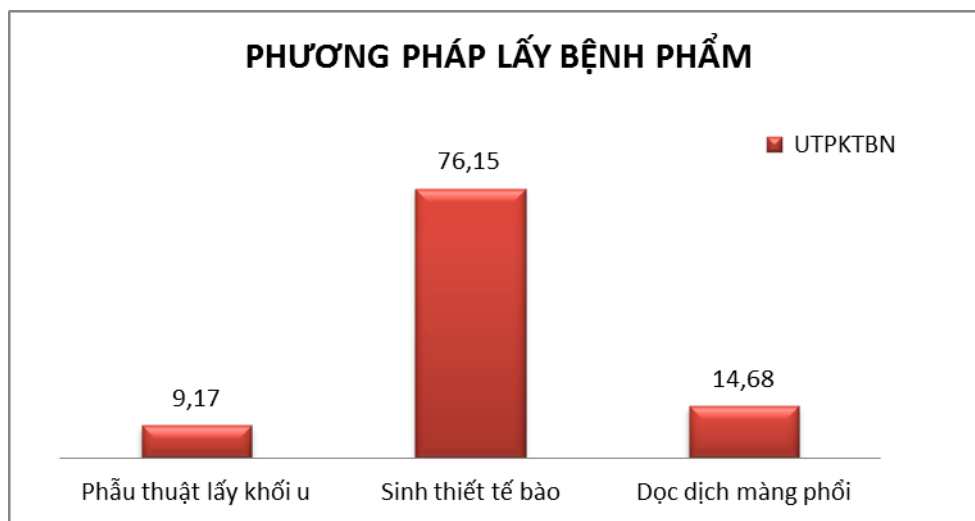
3.1.8. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* theo vị trí và phương pháp lấy bệnh phẩm

Có nhiều vị trí có thể lấy bệnh phẩm và làm xét nghiệm đột biến *EGFR* như vị trí u nguyên phát hoặc tổ chức di căn (hạch, dịch màng phổi, màng tim...).

Bảng 3.8. Tỷ lệ đột biến theo vị trí lấy bệnh phẩm và phương pháp lấy bệnh phẩm

Đặc điểm bệnh nhân		UTPKTBN		Phát hiện đột biến		Không phát hiện đột biến	
		n	%	n	%	n	%
Vị trí lấy mẫu	U phổi	79	72,48	27	34,18	52	65,82
	Tổ chức di căn	14	12,84	7	50	7	50
	Dịch màng phổi	16	14,68	10	62,5	6	37,5
Phương pháp lấy mẫu	Phẫu thuật lấy khối U	10	9,17	60	5,50	40	3,67
	Sinh thiết tế bào	83	76,15	28	33,73	66,27	50,46
	Chọc dịch màng phổi	16	14,68	10	62,5	6	37,5

**Hình 3.7.** Biểu đồ tỷ lệ đột biến gen EGFR trong UTPKTBN theo vị trí lấy mẫu



Hình 3.8. Biểu đồ tỷ lệ UTPKTBN theo phương pháp lấy mẫu

Nhận xét:

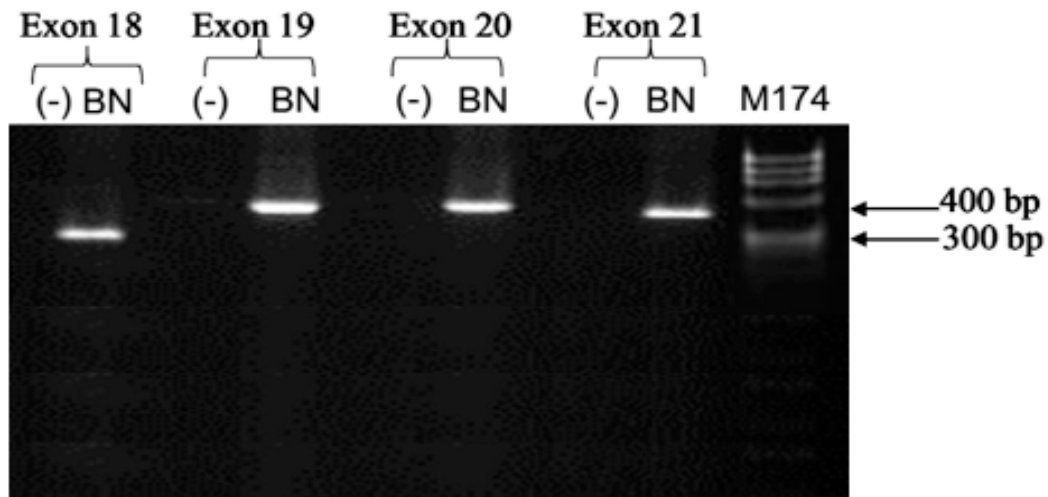
- Đa số bệnh phẩm được lấy tại vị trí u nguyên phát, chiếm 72,48% (70/109 bệnh phẩm), ngoài ra còn lấy bệnh phẩm ở các tổ chức di căn và dịch màng phổi.
- Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* cao hơn khi lấy mẫu bệnh phẩm ở các tổ chức (50%) và dịch màng phổi (62,5%) so với lấy mẫu ở vị trí u phổi (34,1%).
- Phương pháp lấy mẫu thích hợp trong UTPKTBN là sinh thiết tế bào chiếm 76,15% (83/109 mẫu).

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy rằng tỷ lệ bệnh nhân UTPKTBN và đột biến gen *EGFR* có thể bị liên quan đến vị trí và phương pháp lấy mẫu. Trong nghiên cứu này, đa số bệnh nhân được lấy mẫu bằng phương pháp sinh thiết (76,15%) tế bào tại vị trí khối U (72,48%). Tuy tế bào ung thư được phát hiện tại trong dịch màng phổi thấp (14,68%), song tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến gen *EGFR* trong nhóm nghiên cứu này lên đến (62,5%), cao hơn nhiều so với phân tích gen ở bệnh phẩm lấy từ vị trí khối U (34,18%). Kết quả nghiên cứu này có khác với nghiên cứu của Mai Trọng Khoa (2016) khi nghiên cứu đột biến ở vị trí khối U là 43,7%, trong khi đó vị trí màng phổi chỉ 35,5% [9]. Chứng tỏ rằng tỷ lệ bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của này, các tế bào ung thư đã di căn ra màng phổi chiếm tỷ lệ rất cao.

3.2. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen

3.2.1. Kết quả khuếch đại các exon 18 – 21 của gen EGFR

Để giải trình tự gen cần thông qua nhiều giai đoạn. Trước tiên cần khuếch đại các exon 18 – 21 của gen *EGFR* và điện di trên gel agarose để kiểm tra sản phẩm PCR. Kết quả thu được như hình 3.9.



Hình 3.9. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các exon 18,19,20 và 21 gen *EGFR*

Nhận xét:

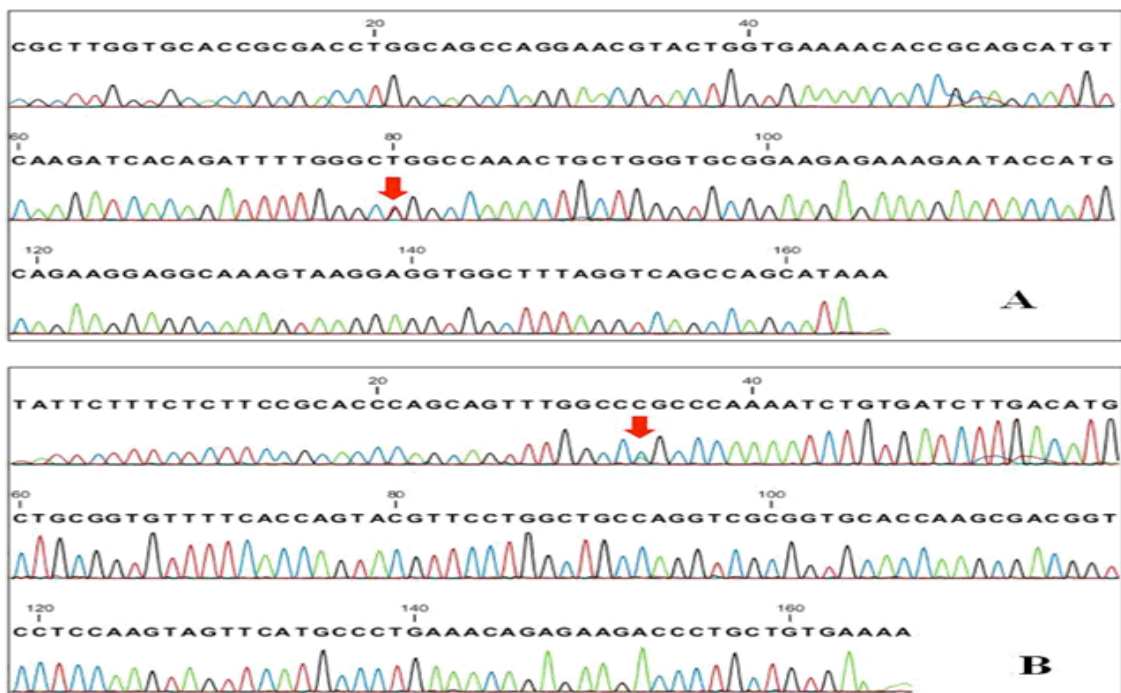
Sản phẩm PCR của quá trình khuếch đại exon 18 đến exon 21 trên gen *EGFR* cho gồm một băng đặc hiệu (chiều dài sản phẩm khuếch đại của exon 18, 19, 20 và 21 gen *EGFR* lần lượt là 349 bp, 397 bp, 408 bp và 374 bp). Các băng có độ sáng đồng nhất bờ đều, sắc gọn, không có sản phẩm phụ, đảm bảo đủ tiêu chuẩn cho kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến. Các mẫu đối chứng âm là mẫu nước cất cho kết quả âm tính.

Sau phản ứng khuếch đại, chất lượng AND quyết định thành công cho bước giải trình tự gen. Nếu chất lượng AND không tốt không tốt, bị đứt gãy hay tạp nhiễm thì băng điện di trên gel agarose sẽ xuất hiện các băng phụ [15], [16]. Trong nghiên cứu này, sau khi khuếch đại các exon 18 đến 21 của gen *EGFR*. Kết quả này được tiến hành quy trình giải trình tự xác định đột biến gen. Đồng thời, kết quả tốt của sản phẩm này sẽ góp phần tối ưu của giai đoạn tách chiết và tinh sạch ADN trước đó.

Sản phẩm PCR từ gel được tinh sạch để thu nhận sản phẩm PCR tinh khiết, đây là bước quan trọng trước khi tiến hành kỹ thuật giải trình tự gen. Chất lượng của sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được thể hiện qua kết quả giải trình tự để tìm đột biến gen *EGFR*. Có nhiều phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR từ gel hoặc trực tiếp từ dung dịch sau phản ứng PCR. Nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp dùng cột lọc được thiết kế trên nguyên tắc ứng dụng khả năng bám màng silica của ADN trong môi trường muối, nhờ đó có thể tách chiết và tinh sạch những đoạn ADN có kích thước từ 100 bp đến 10 kb từ gel agarose hoặc trực tiếp từ sản phẩm sau phản ứng PCR. Phương pháp này cho ADN có độ tinh khiết cao, giữ được gần như toàn bộ ADN trong mảnh gel và thời gian thực hiện kỹ thuật nhanh chóng.

3.2.2. Kết quả xác định đột biến gen *EGFR* bằng phương pháp giải trình tự gen

Các sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch và kiểm tra lại bằng điện di trên thạch agarose 1,5%. Việc giải trình tự gen được đọc theo 2 chiều xuôi và ngược cho mỗi exon. Sử dụng trình tự chuỗi ADN của gen *EGFR* được tìm kiếm trong GenBank và trình tự của mẫu mô lành tính để 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*.



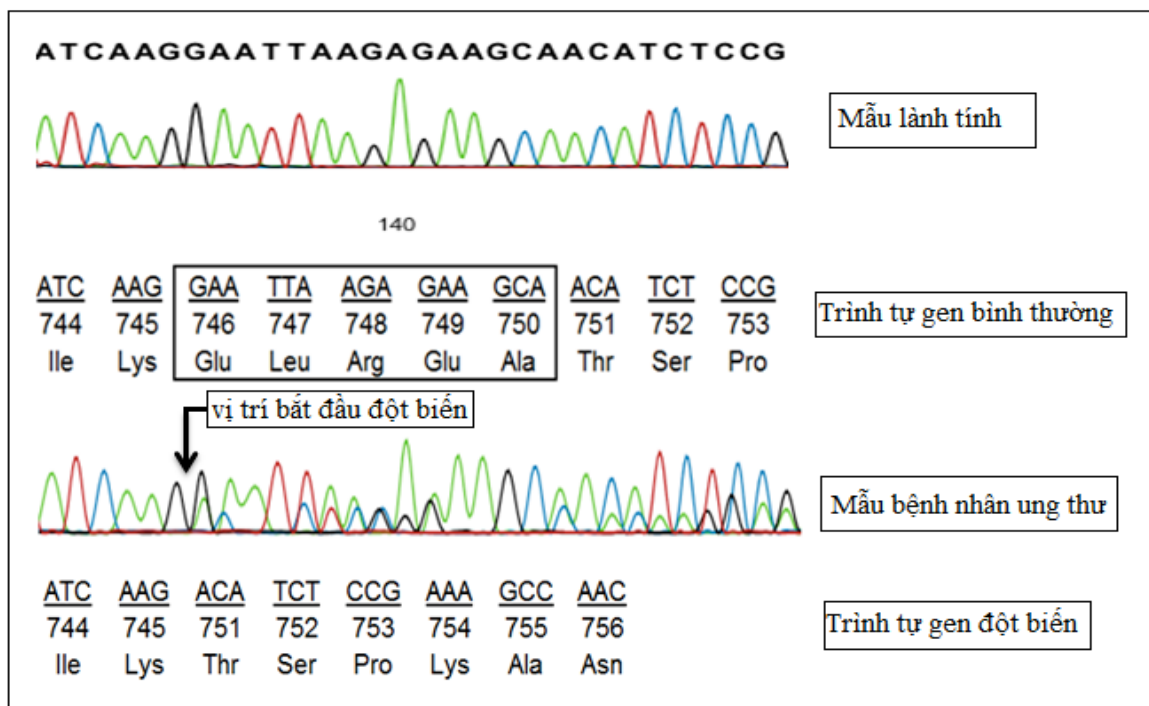
Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự chuỗi ADN của exon 21 theo hai chiều xuôi (A) và ngược (B). Mũi tên chỉ vị trí đột biến.

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen, phân, tích trên phần mềm Seqscape nghiên cứu đã phát hiện, kết quả phát hiện thể hiện ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kết quả phân tích đột biến gen EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự gen

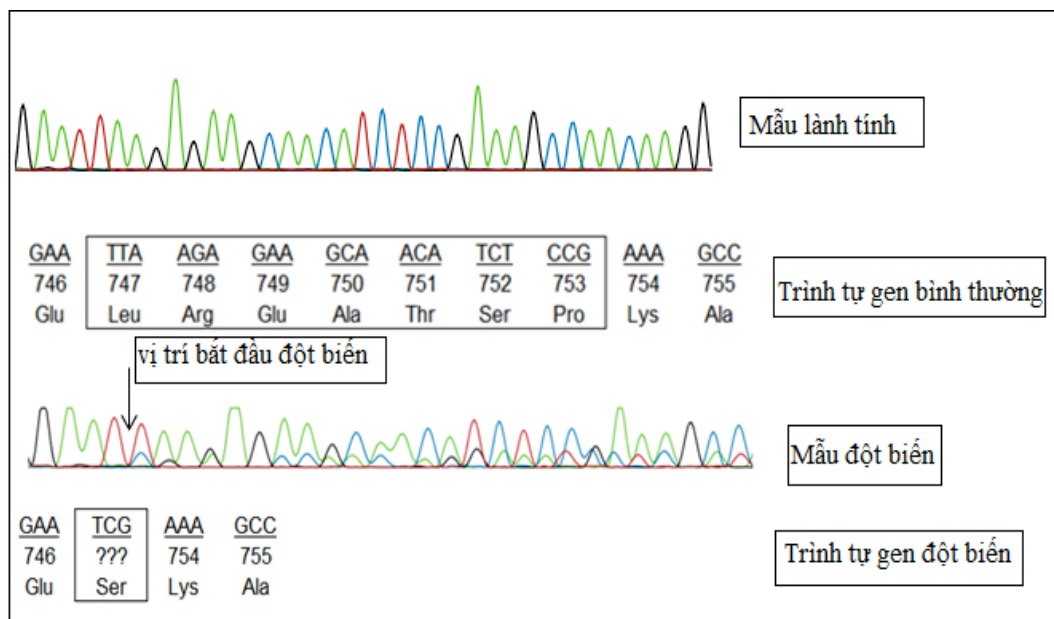
Loại đột biến	Kỹ thuật giải trình tự
LREA, L747-P753 delinsS (exon 19)	18
INS (exon 20)	3
G719X (exon 18) và S768I (exon 20)	1
L858R (exon 21)	10
Del (Exon 19) và Ins (exon E20)	2
T790M (exon 20) + L858R (exon 21)	1
Tổng số đột biến	35
Tỷ lệ	$35/109 = 33,02\%$

Hình ảnh một số đột biến được thể hiện trong các hình 3.11, 3.12, 3.13, 3.14



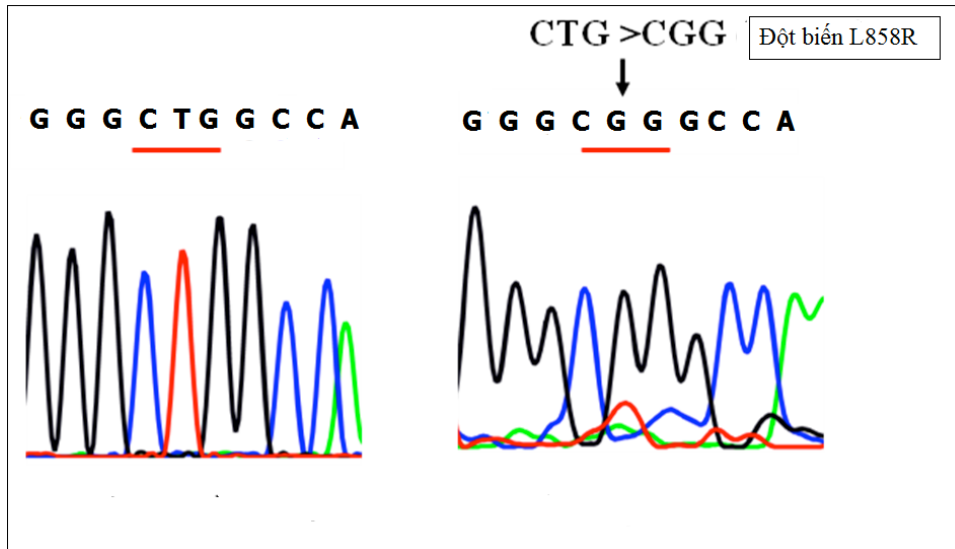
Hình 3.11: Hình ảnh giải trình tự gen (theo chiều xuôi) phát hiện đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 của gen EGFR (mã số mẫu E1235)

Nhận xét: Hình 3.11 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến xóa đoạn LREA tại exon 19 của bệnh nhân UTPKTBN (có mã số mẫu E1235). So sánh với trình tự ADN lành tính, xuất hiện tượng xóa đoạn 15 Nucleotit trên exon 19 (mũi tên chỉ vị trí bắt đầu có đột biến xóa đoạn), làm cho các acid amin glutamic (E) – Leucine (L) – Ariginine (R) – acid glutamic (E) – Alanine (A) tại các codon từ 746 đến 750, do đó đột biến này có tên là đột biến delE746-A750 hay LREA.



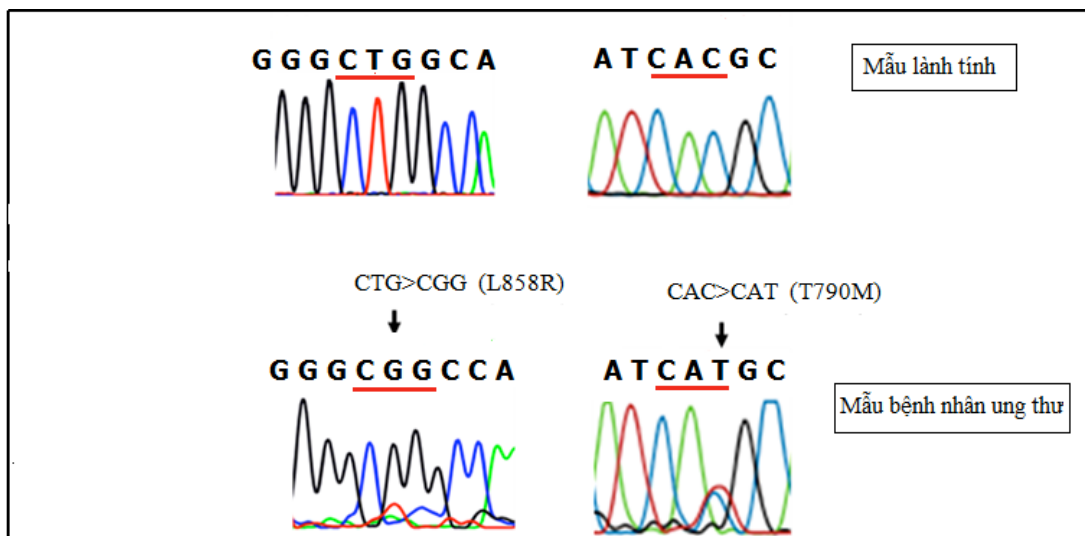
Hình 3.12: Hình ảnh giải trình tự gen theo chiều xuôi phát hiện đột biến L747-P753delinsS (mã số mẫu SM 0888)

Nhận xét: Hình 3.12 là hình ảnh đột biến L747 - P753delinsS trên exon 19 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu là SM 0888). So sánh với trình tự ADN lành tính, xuất hiện hiện tượng xóa đoạn 21 Nucleotit (mũi tên chỉ vị trí bắt đầu đột biến) từ codon 747 (quy định acid amin Leucine) đến codon 753 (quy định acid amin Proline) bị mất, đồng thời chèn thêm 3 nucleotit TCG quy định acid amin Serine (S) vào giữa đoạn bị mất, do đó đột biến này có tên L747-P753delinsS.



Hình 3.13: Hình ảnh giải trình tự (theo chiều xuôi) phát hiện đột biến L858R trên exon 21 của gen EGFR (mã số mẫu B5390)

Nhận xét: Hình 3.13 là hình ảnh đại diện cho kết quả đột biến L858R tại exon 21 của bệnh nhân ung thư phổi (có mã số mẫu B5390) bằng kỹ thuật giải trình tự gen. So sánh với trình tự ADN lành tính, tại vị trí nucleotit 2537 trên exon 21, xuất hiện 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 3.14: Hình ảnh giải trình tự gen (theo chiều xuôi) 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 B3562)

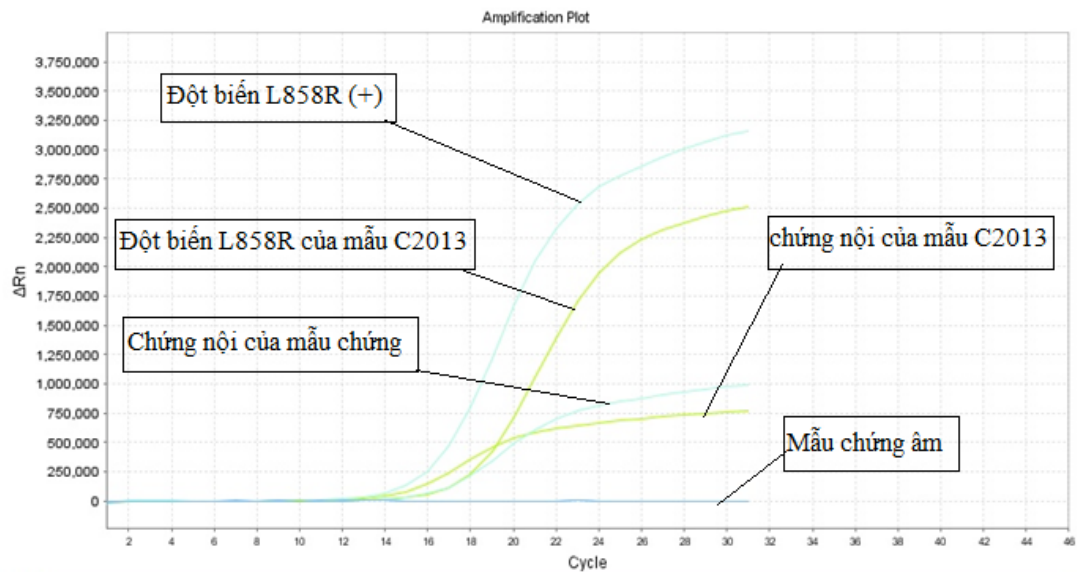
Nhận xét: Hình 3.14 là hình đại diện cho kết quả phát hiện đồng thời 2 đột biến trên cùng một bệnh nhân (có mã số mẫu B3562), đột biến T790M trên exon 20 và đột biến L858R trên exon 21 gen *EGFR* bằng kỹ thuật giải trình tự. So sánh với trình tự ADN lành tính, tại vị trí nucleotit 2369 trên exon 20, xuất hiện thêm một đỉnh C bị biến đổi thành T, làm cho acid amin Threonine (T) tại codon 790 bị biến đổi thành acid amin Methionine (M), gây nên đột biến T790M. Đồng thời, tại vị trí Nucleotit 2537 trên exon 21, xuất hiện 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.

3.2.3. Kết quả xác định đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật *Scorpion ARMS* trên máy *Real-time PCR*

Bằng kỹ thuật *Scorpion ARMS* thực hiện máy *Real-time PCR* 7500 Fast, nghiên cứu đã xác định 43 đột biến gen *EGFR*, kết quả cụ thể được trình bày ở bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kết quả phân tích đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật *Scorpion ARMS*

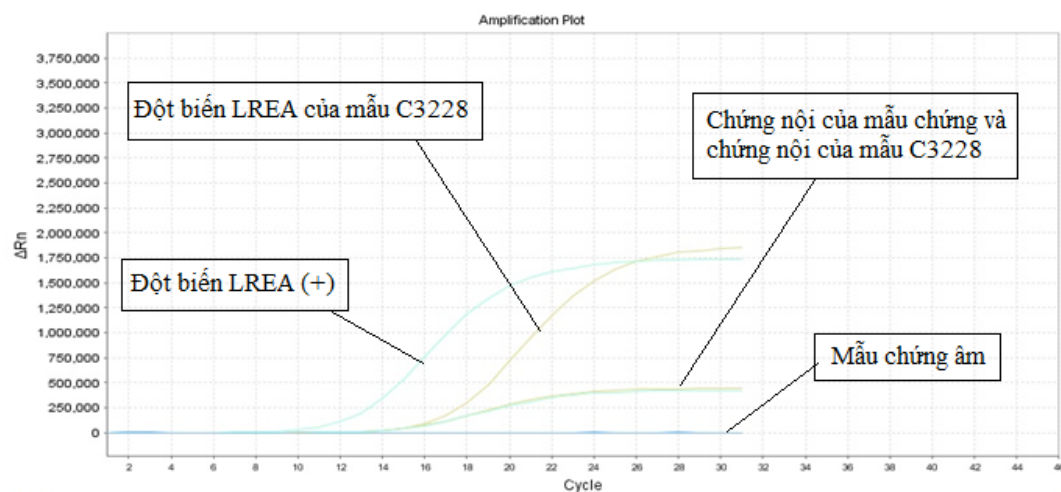
Loại đột biến	Kỹ thuật <i>Scorpion ARMS</i>
LREA, L747-P753 delinsS (exon 19)	22
INS (exon 20)	3
G719X (exon 18) và S768I (exon 20)	1
L858R (exon 21)	13
Del (Exon 19) và Ins (exon E20)	2
T790M (exon 20) + L858R (exon 21)	1
Tổng số đột biến	43
Tỷ lệ đột biến	43/109 = 39,45%



Hình 3.15. Kết quả xác định đột biến L585R của gen *EGFR* bằng kỹ thuật *Scorpion ARMS* trên máy *Real-time PCR* (mã số mẫu C2013)

Nhận xét:

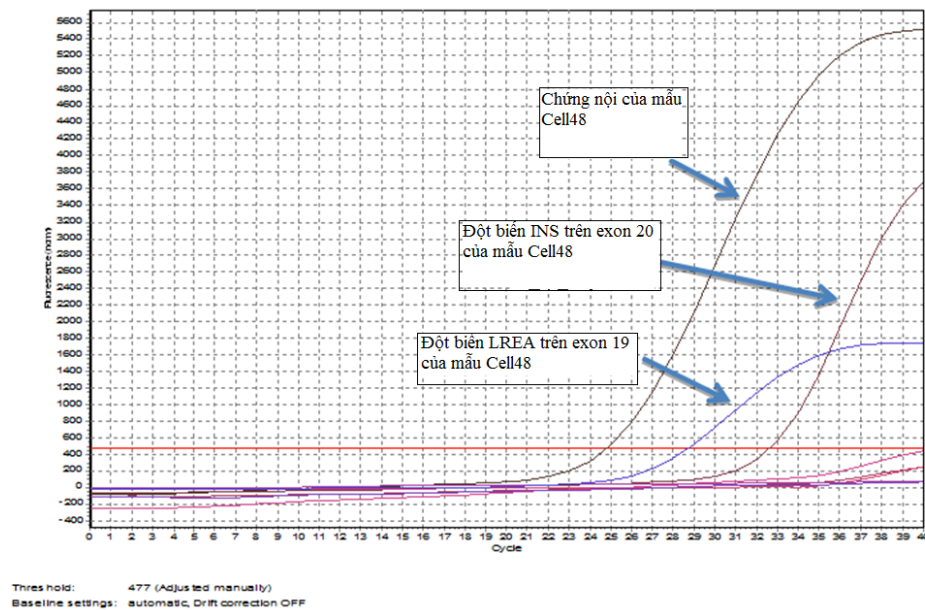
Khi phân tích mẫu ADN (có mã số mẫu C2013) này bằng kỹ thuật *Scorpion ARMS*, đường cong tín hiệu đột biến L585R của mẫu C2013 bên cạnh đường cong tín hiệu nội chuẩn của đột biến L585R (+). Như vậy, có thể khẳng định đây là mẫu ADN mang đột biến L585R trên exon 21 của gen *EGFR*.



Hình 3.16. Kết quả xác định đột biến xóa đoạn LREA của gen *EGFR* bằng phương pháp *Scorpion ARMS* trên máy *Real-time PCR* (mã số mẫu C3228)

Nhận xét:

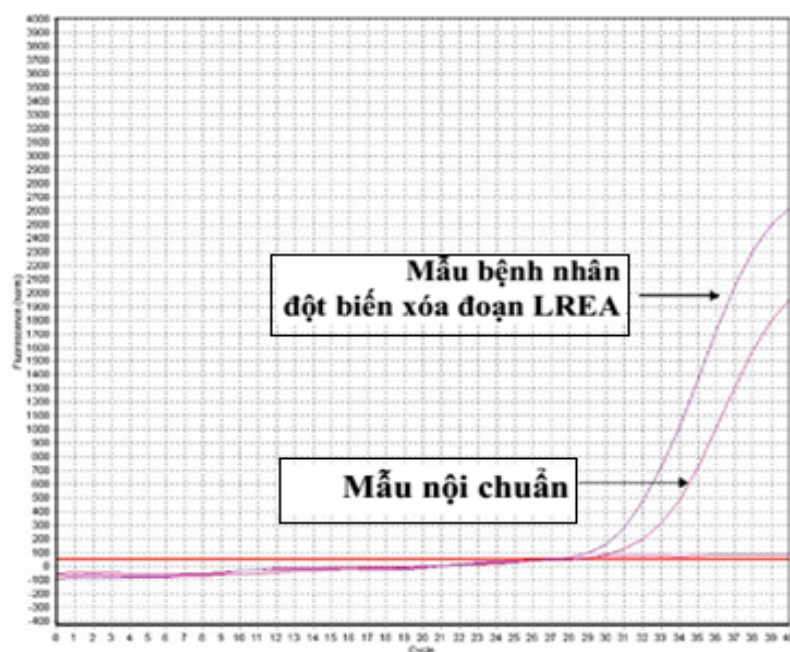
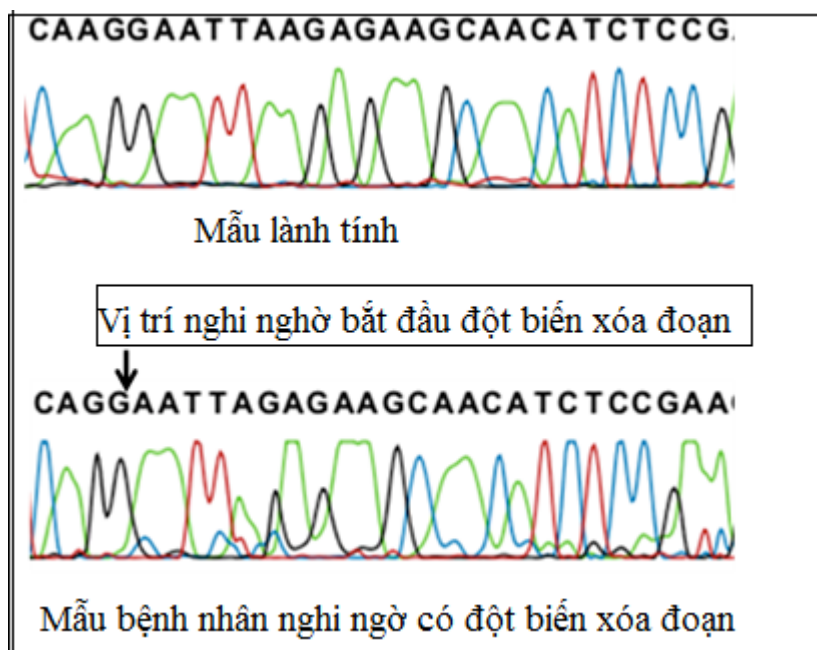
Kết quả hình 3.16, khi phân tích mẫu ADN có mã số C3228 bằng kỹ thuật Scorpion ARMS trên máy Real-time PCR, xuất hiện đường cong tín hiệu của đột biến LREA của mẫu C3228 bên cạnh đường cong tín hiệu nội chuẩn đột biến LREA (+). Như vậy khẳng định đây là một mẫu ADN mang đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 gen EGFR.



Hình 3.17: Hình ảnh xác định đột biến kép là đột biến xóa đoạn LREA trên exon 19 và đột biến INS trên exon 20 của cùng một mẫu bệnh nhân (có mã số mẫu Cell48) bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

Nhận xét:

Kết quả hình 3.17 cho thấy xuất hiện đường cong tín hiệu tương ứng với đột biến LREA exon 19 và đột biến INS exon 20 chứng tỏ mẫu ADN của bệnh nhân ung thư (có mã số mẫu Cell48) mang cả 2 loại đột biến trên.



Hình 3.18: Hình ảnh kết quả khẳng định đột biến LREA trên exon 19 của gen *EGFR* bằng kỹ thuật Scorpion ARMS (mã số mẫu E1810)

Nhận xét:

Ở mẫu ADN này (mã số E1810), 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

hiệu của tín hiệu nền. Khi phân tích mẫu ADN 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 ADN mang đột biến xóa đoạn LREA exon 19 gen *EGFR*.

3.2.4. Kết quả so sánh hai kỹ thuật phân tích trình tự gen *EGFR*

Khi thực hiện hai kỹ thuật giải trình tự gen và kỹ thuật Real time PCR để xác định đột biến exon 18, 19, 20 và 21 gen *EGFR* trên 109 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 3.9). Hầu hết các bệnh nhân đều mang 1 loại đột biến, có 4 bệnh nhân mang đột biến kép. Trong nghiên cứu chúng tôi các đột biến phát hiện được đều là đột biến đã được công bố; có 4 loại đột biến kháng thuốc là INS exon20, S768I exon20, T790M exon20.

Bảng 3.11. Tỷ lệ phân tích đột biến gen *EGFR* bằng 2 kỹ thuật giải trình tự và Scorpion ARMS

Loại đột biến	Kỹ thuật giải trình tự	Kỹ thuật Scorpion ARMS	Tổng hợp 2 kỹ thuật
LREA, L747-P753 delinsS (exon 19)	18	23	24 (54,55%)
INS (exon 20)	3	3	3 (6,82%)
G719X (exon 18) và S768I (exon 20)	1	1	1 (2,27%)
L858R (exon 21)	10	13	13 (29,55%)
Del (Exon 19) và Ins (exon E20)	2	2	2 (4,55%)
T790M (exon 20) + L858R (exon 21)	1	1	1 (2,27%)
Tổng số đột biến	35	43	44 (100%)
Tỷ lệ đột biến	35/109 = 33,02%	43/109 = 39,45%	44/109 = 40,37%

Nhận xét:

Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen đã giúp phát hiện được 35/109 (39,45%) bệnh nhân mang đột biến, trong khi đó bằng kỹ thuật Scorpion trên máy Real – time PCR đã phát hiện được 43/109 (39,45%) bệnh nhân mang đột biến khi làm bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Như vậy, sử dụng cả hai kỹ thuật này giúp phát hiện tổng cộng 44 bệnh nhân đột biến gen *EGFR* trên 109 bệnh nhân, chiếm tỷ lệ 40,37%.

Vì kỹ thuật giải trình tự gen có độ nhạy kỹ thuật thấp hơn kỹ thuật Scorpion ARMS, khi xác định đột biến gen bằng kỹ thuật giải trình tự yêu cầu trong hỗn hợp phải có ít nhất 25% là tế bào ung thư. Tuy trong nghiên cứu này bệnh phẩm chủ yếu được lấy bằng phương pháp sinh thiết bằng kim nhỏ nên tỷ lệ tế bào ác tính có thể thấp dưới 25% nên dẫn đến hiện tượng âm tính giả trong xét nghiệm bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

So sánh hai kỹ thuật xác định đột biến gen

❖ Giải trình tự xác định đột biến gen *EGFR*

Kỹ thuật giải trình tự gen (sequencing) giúp xác định trình tự các nucleotit trên phân tử AND. Từ đó, có thể phát hiện những thay đổi có khả năng dẫn đến các bệnh lý. Kỹ thuật giải trình tự gen chỉ mới được hoàn thiện trong những năm gần đây, như phương pháp Sanger (1977), Maxam & Gilbert (1977), kỹ thuật này đã 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.

Các exon gen *EGFR* được xác định bằng cách tinh sạch sản phẩm PCR, 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. Sản phẩm tinh sạch quyết định chủ yếu cho sản phẩm của trình tự gen.

Trình tự gen của mẫu nghiên cứu sẽ được đối chiếu với trình tự GenBank

trên ngân hàng gen thể giới và được phân tích để xác định vùng hoặc điểm đột biến.

Tuy kỹ thuật giải trình tự gen cho phép phát hiện tất cả các loại đột biến, 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*). 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% [26], [72]. Do đó, xét nghiệm tìm đột biến gen *EGFR* bằng kỹ thuật này 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 ADN 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 nucleotit 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 [5].

Kỹ thuật giải trình tự gen còn có một số hạn chế như:

- + Kỹ thuật tiến hành giải trình tự gen phải qua nhiều bước (tách chiết ADN, phản ứng PCR, tinh sạch sản phẩm, giải trình tự và phân tích trình tự), do đó, sau 3-4 ngày mới có kết quả (tính từ lúc có mẫu mô).

- +/- Hình ảnh của trình tự gen phụ thuộc rất nhiều vào sản phẩm PCR và sản phẩm tinh sạch PCR.

- + Các đột biến điểm khó phát hiện, do đôi lúc có tín hiệu nhiễu, thường phải được khẳng định bằng kỹ thuật giải trình tự cả hai chiều. Các đột biến điểm và xóa đoạn được phát hiện dựa vào các đỉnh và đoạn nucleotit của các gen, do vậy nếu xuất hiện tín hiệu nhiễu sẽ khó phân biệt. Vì vậy, việc phân tích đột biến gen

EGFR bằng kỹ thuật giải trình tự cần kinh nghiệm của người thực hiện xét nghiệm phải có máy giải trình tự.

Tuy còn nhiều hạn chế nhưng do đặc điểm đột biến gen *EGFR* trên exon 18 - 21 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 [24], [51], [40], [27].

❖ *Kỹ thuật Real time PCR (Scorpion ARMS) xác định đột biến gen EGFR*

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 ADN.

Kỹ thuật Scorpion ARMS dùng phát hiện đột biến gen *EGFR* 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*. 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 [45]. 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 (hình 3.9). Nếu không được khảo sát lại bằng kỹ thuật Scorpion ARMS, nghiên cứu sẽ bỏ sót 5 đột biến xóa đoạn LREA (exon 19), 3 đột biến điểm L858R (exon 21) trên gen *EGFR*. 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 [4].

Với ưu điểm độ nhạy cao, kỹ thuật Scorpion ARMS đã trở thành kỹ thuật tìm đột biến *EGFR* [44]. Tuy nhiên, kỹ thuật này được thiết kế dạng môi 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 môi đặc hiệu trong hỗn hợp phản ứng. Do đó, đối với những đột biến mới, chưa được công bố thì không thể có môi đặc hiệu được thiết kế sẵn thì kỹ thuật Scorpion ARMS không thể phát hiện ra, sẽ cho kết quả âm tính giả..

Theo các nghiên cứu cho thấy, mỗi điểm đột biến trên gen *EGFR* lại có ý nghĩa cho việc định hướng điều trị riêng. Khi có đột biến xóa đoạn LREA (exon 19), L858R và L861Q (exon 21) sẽ làm tăng tính nhạy cảm với thuốc điều trị đích. Ngược lại đột biến T790M và S786I (exon 20) là đột biến kháng thuốc điều trị đích. Hầu hết các đột biến còn lại khác đều được xác định dưới dạng nhóm. Đột biến điểm G719X, G719A và G719C ở exon 18 được xác định chung là đột biến G719X. Có thể nhận thấy, kỹ thuật Scorpion ARMS được thiết kế để xác định những đột biến exon 18-21 gen *EGFR* 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 môi đặc hiệu cho những đột biến quan tâm [4].

❖ Sự kết hợp các kỹ thuật xác định đột biến gen *EGFR*

Nhờ nỗ lực của các nhà khoa học 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* trong bệnh UTPKTBN đã giúp định hướng cho việc quyết định loại phác đồ điều trị, giúp lựa chọn bệnh nhân vào những nhánh đặc hiệu của các thử nghiệm lâm sàng.

Bảng 3.12. So sánh kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS [4]

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

Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS mỗi kỹ thuật đều có những ưu và khuyết điểm riêng (bảng 3.12). Tỷ lệ phát hiện đột biến gen *EGFR* bằng hai kỹ thuật này lần lượt là 32,11% (35/109) và 39,45% (43/109). Như vậy, tỷ lệ phát hiện đột biến gen *EGFR* 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 thấp hơn nhưng quy trình, kỹ thuật phức tạp hơn và thời gian trả kết quả lâu hơn, trong khi đó kỹ thuật Scorpion ARMS có giá thành cao nên khó áp dụng trên số lượng lớn bệnh nhân. Do vậy, nghiên cứu đã kết hợp 2 kỹ thuật trên để bổ khuyết cho nhau. 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

[32]. Do đó, lựa chọn sử dụng kỹ thuật nào để xác định đột biến gen *EGFR* phải phụ thuộc vào mục đích, bản chất mẫu xét nghiệm, trang thiết bị và tay nghề kỹ thuật viên.

3.3.4. Kết quả xác định tỷ lệ đột biến gen *EGFR*

Khi thực hiện hai kỹ thuật giải trình tự gen và kỹ thuật Real time PCR để xác định đột biến exon 18, 19, 20 và 21 gen *EGFR* trên 109 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 3.9). Hầu hết các bệnh nhân đều mang 1 loại đột biến, có 4 bệnh nhân mang đột biến đôi. Phân bố các loại đột biến theo exon của gen *EGFR* được trình bày ở bảng 3.16.

Bảng 3.13. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen *EGFR*

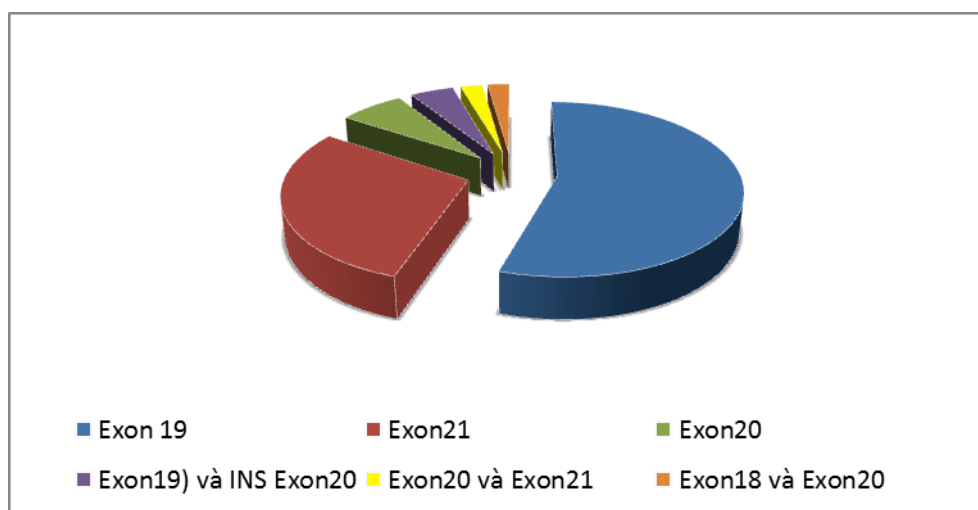
ĐẶC ĐIỂM	n	%
Có đột biến	44	40.37
Không đột biến	65	59.63
Tổng số	109	100

Nhận xét: Trong 109 bệnh nhân được làm xét nghiệm gen *EGFR* có 44 bệnh nhân dương tính với đột biến gen *EGFR* chiếm tỷ lệ 40,37%.

Bảng 3.14. Vị trí đột biến gen *EGFR*

Vị trí	Dạng đột biến	n	Tỷ lệ (%)
19	LREA, L474-P753 delinsS	23	54.55
	L477-P753 delinsS	1	
20	INS	3	6.82
21	L585R	13	29.55
18 + 20	G179X(exon18) + S768I (exon20)	1	2.27
19 + 20	LREA (exon19) + INS (exon20)	2	4.55
18 + 21	T790M (exon18) +L858R (exon21)	1	2.27

Tổng số	44	100
----------------	----	-----



Hình 3.19. Biểu đồ tỷ lệ đột biến trên các exon 18 – 21 gen *EGFR*

Nhận xét:

+ Đột biến tại exon 19 và 21 chiếm đa số với tỷ lệ lần lượt là 54,55% (24/ 44 trường hợp đột biến) và 29,55% (13/ 44 trường hợp đột biến). Có 3 trường hợp mang đột biến tại exon 20, chiếm tỷ lệ 6,82%. Trong đó loại đột biến xóa đoạn LREA ở exon 19 gặp nhiều nhất (23/44; 52,27%).

+ Đặc biệt cùng trên gen *EGFR* đột biến tại nhiều exon khác nhau: 1 trường hợp đột biến kép G179S exon 18 + S768I exon 20, 1 trường hợp đột biến kép T790M exon 20 + L858R exon 21 chiếm tỷ lệ 2,27% mỗi loại; 2 trường hợp đột biến kép LREA exon 19 + và INS exon 20 chiếm tỷ lệ 4,55%.

Bảng 3.15. Tỷ lệ bệnh nhân theo số lượng đột biến/bệnh nhân

Bệnh nhân	Số lượng (Tỷ lệ)
Mang 1 đột biến gen <i>EGFR</i>	40 (90,91%)
Mang 2 đột biến gen <i>EGFR</i>	4 (9,09%)
Tổng số	44 (100%)

Nhận xét: Chiếm đa số trường hợp là các đột biến đơn độc (90,91%), chỉ

có 4 trường hợp mang đột biến đôi (9,09%).

Bảng 3.16: Tỷ lệ đột biến theo tính kháng thuốc TKI

Tính đáp ứng thuốc	Loại đột biến	Số lượng		Tỷ lệ (%)
Tăng tính nhạy cảm thuốc	LREA	23	37	84.1
	L747-P753 delinsS	1		
	L858R	13		
Kháng thuốc	INS	3	7	15.9
	G179S (exon18) + S768I (exon20)	1		
	LREA (exon19) + INS (exon20)	2		
	T790M (exon18) + L858R (exon21)	1		

Nhận xét: Trong 44 trường hợp phát hiện đột biến gen *EGFR* trong nghiên cứu, đột biến kháng thuốc chiếm 7 trường hợp (15,9%) gồm đột biến INS ở exon 20, G179S (exon18) + S768I (exon20), LREA (exon19) + INS (exon20), T790M (exon18) + L858R (exon21), so với đột biến tăng tính nhạy cảm với thuốc là 84,1%.

Đột biến gen *EGFR* được chia thành 2 nhóm: liên quan đến tính nhạy thuốc và kháng thuốc TKI. Thường gặp nhất gồm xóa đoạn trên exon 19 (54,55%) và L858R trên exon 21 (29,55%), đều liên quan đến sự đáp ứng tốt với TKI. Đột biến liên quan đến kháng thuốc thường gặp nhất là đột biến chèn đoạn ở exon 20 (INS exon 20) chiếm 3/44 (6,82%) trường hợp có đột biến gen, đột biến T790M (exon 20) và S768I (exon20) đều có tỷ lệ 1/44 (2,27%). Trong nghiên cứu này tất cả các đột biến kháng thuốc đều nằm trên exon 20 của gen *EGFR*. Đột biến gen được phát hiện ở 44/109 bệnh nhân chiếm tỷ lệ 40,37%. Trong đó đột biến chủ yếu xảy ra ở vị trí exon 19 và 21 với tỷ lệ 54,55% (24/44 trường hợp bị đột biến) và 29.55% (13/44 trường hợp bị đột biến). Tỷ lệ này tương đương với nhiều nghiên cứu tại Việt Nam như nghiên cứu Mai trọng Khoa và cộng sự (2016),

nghiên cứu của Phạm Văn Luận và cộng sự năm (2016) [9][10]. Tỷ lệ trong nghiên cứu này thấp hơn tỷ lệ nghiên cứu của PIONEER cho kết quả tỷ lệ đột biến của chủng tộc Kinh người Việt Nam là 64,2%, và cũng thấp hơn tỷ lệ nghiên cứu của Mok và cộng sự trên người châu Á là 59,7%, có thể vì lý do trong 2 nghiên cứu của PIONEER và Mok, toàn bộ bệnh nhân thuộc nhóm ung thư biểu mô tuyến và không có tiền căn hút thuốc lá, vốn là những yếu tố làm gia tăng cơ hội có đột biến gen *EGFR* trong mẫu nghiên cứu và nghiên cứu của PIONEER toàn bộ mẫu bệnh phẩm được đều được phân tích đột biến bằng kỹ thuật Scorpion ARMS có độ nhạy tốt nên tỷ lệ đột biến cao. Cùng khảo sát đột biến gen *EGFR* tại Việt Nam nhưng tỷ lệ đột biến của nghiên cứu này cao hơn nghiên cứu của Hoàng Anh Vũ năm 2011 vì lý do khác biệt về kỹ thuật xác định đột biến [17], [55], [64]. Kết quả so sánh tỷ lệ đột biến gen *EGFR* trong nghiên cứu của chúng tôi với các nghiên cứu trước đây ở trên thế giới và ở Việt Nam được trình bày cụ thể ở bảng 3.15.

Các nghiên cứu trước đây đều cho thấy đột biến gen *EGFR* liên quan đến tính đáp ứng thuốc EGFR TKI trong UTPKTN tập trung tại 4 exon 18 – 21, vùng mã hóa tyrosine kinase [53]. Khoảng 90% là các đột biến xóa đoạn nhỏ liên quan đến 5 acid amin từ codon 746-750 exon 19 (đột biến LREA hay delE746-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 [74], [53], [50].

Bảng 3.17. Tỷ lệ đột biến gen EGFR trong bệnh UTPKTBN ở một số nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam

Tác giả	Chủng tộc	Cỡ mẫu	Kỹ thuật	Tỷ lệ đột biến chung
Eberhard (2005) [31]	Da trắng	228	Giải trình tự	12,7%
Shigematsu (2005) [65]	Da trắng	158	Giải trình tự	8%
	Đông Á	361	Giải trình tự	30%
Boch (2013) [27]	Da trắng	552	Pyrosequencing	4,9%
Huang (2004) [40]	Đài Loan	101	Giải trình tự	38,6%
Sonobe (2005) [66]	Nhật Bản	154	Giải trình tự	39%
Sriuranpong (2006) [67]	Thái Lan	61	Giải trình tự	57,4%
Bae (2007) [25]	Triều Tiên	-	Giải trình tự	36,4%
Mok (2009) [55]	Trung Quốc, Đài Loan, Triều Tiên	437	Giải trình tự	59,7%
Hoàng Anh Vũ (2011) [17]	Việt Nam	71	Pyrosequencing	42%
Phạm Văn Luận (2016) [10]	Việt Nam	160	Scorpion ARMS	40,6%
Mai Trọng Khoa (2016) [9]	Việt Nam	511	Lai đầu dò phân tử	40,1%
Nghiên cứu Nguyễn Thủy Lê	Việt Nam	109	Giải trình tự và Scorpion ARMS	40,37%

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi 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 (bảng 3.14). Trong 44 đột biến được xác định, chiếm ưu thế là đột biến mất đoạn ở exon 19 (54,55%) gấp 1,7 lần đột biến ở exon 21 (29,55%) gồm chủ yếu các đột biến điểm; exon 20 tập trung đột biến gồm đột biến điểm (T790M, S768I) và đột biến chèn đoạn. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Mai Trọng Khoa và cộng sự, Nguyễn Ngọc Quang và cộng sự, Phạm Văn Luận và cộng sự [9][10][13]. Nhưng khác với một số nghiên cứu trên thế giới, tỷ lệ đột biến xóa đoạn exon 19 và L858R exon 21 khoảng 1,1 [64]. Nghiên cứu của Huang tại Đài Loan và Hoàng Anh Vũ tại Việt Nam, 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 [17], [40].

Bảng 3.18. Phân bố đột biến gen *EGFR* trên exon 18-21 theo một số nghiên cứu

Nghiên cứu	Số đột biến	Exon 19	Exon 20	Exon 21
Huang (2004) [134]	46	28,3%	10,9%	50,0%
Mitsudomi (2006) [154]	569	48,2%	3,7%	42,7%
Ellison (2010) [139]	27	51,9%	0	40,7%
Hoàng Anh Vũ (2011) [111]	28	25,0%	3,6%	57,1%
Phạm Văn Luận (2016)[8]	160	58,5%	1,5%	33,8%
Mai Trọng Khoa (2016)[7]	511	56,4%	1,9%	37,4%
Nghiên cứu này	44	54,55%	6,82%	29,55%

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 (23/44 trường hợp, 52,27%), kế đến là đột biến L858R exon 21 (13/44 trường hợp, 29,55%), đột biến INS exon 20 (3/109 trường hợp, 6,82%), đột biến L474-P753 delinsS exon 19

(1/44 trường hợp, 2,27%), không có đột biến đơn độc trên exon 18. Kết quả này tương đối phù hợp với đa số nghiên cứu trước đây 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 (2011) 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 [17].

Chúng tôi gặp 4 trường hợp bệnh nhân đột biến kép (chiếm tỷ 9,09%) gồm: 2 bệnh nhân đột biến kép xóa đoạn LREA exon 19 và INS exon 20, 1 bệnh nhân đột biến kép T790M exon20 và L858R exon 21, 1 bệnh nhân đột biến kép G179X exon 18 và S768I exon 20, đây là những trường hợp đột biến đôi phức tạp khi mang đồng thời đột biến gây kháng và tăng nhạy cảm với thuốc điều trị nhắm đích EGFR TKI.

Đặc biệt trong nghiên cứu này, tỷ lệ bệnh nhân mắc đột biến kháng thuốc TKI là 15,9% cao hơn so với các nghiên cứu trước đây, theo nghiên cứu của Inukai và cộng sự tỷ lệ kháng thuốc là 3,6%; theo nghiên cứu POINEER tỷ lệ đột biến gen kháng thuốc là 2,9%, có sự kết hợp giữa đột biến tăng nhạy và kháng thuốc là 2,3% [40], [63]. Nghiên cứu của Mai Trọng Khoa và cộng sự thì tỷ lệ này 1,9%; nghiên cứu của Hoàng Anh Vũ (2014) tỷ lệ kháng thuốc là 1,3% [8], [17]. Và trong các nghiên cứu trước đột biến kháng thuốc thường gặp là đột biến thay T790M ở exon 20, tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi đột biến kháng thuốc điều trị đích thường gặp là đột biến thêm đoạn INS exon 20 (với 3/44 trường hợp đột biến đơn độc INS exon 20 và 2 trường hợp đột biến kép INS20 và LREA exon19), chúng tôi gặp 1 trường hợp đột biến kép T790M exon 20 + L858R exon 21 (trong đó đột biến T790M là đột biến kháng thuốc), 1 trường hợp đột biến G719X exon18 + S768I exon 20 (trong đó có đột biến S768I là đột biến kháng thuốc). Tuy nhiên số trường hợp đột biến kháng thuốc TKI ít so với tổng số đột biến (7/44), nên chúng tôi chưa thể kết luận điều gì.

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 gen *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. 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.

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 ADN tổng số và AND ung thư tách chiết được. Mẫu mô tươi được lấy từ khối u sau phẫu thuật là tốt nhất. Trong nghiên cứu này mẫu mô được lấy từ khối mô đúc nên do vậy trong quá trình xử lý khối nén, AND có thể bị biến tính, vì thế ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của sản phẩm. 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. Do đó, để đạt kết quả chính xác, chúng tôi đã lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư của mẫu mô dưới kính hiển vi để thu được lượng tế bào tốt nhất cho việc xác định đột biến gen EGFR bằng sự kết hợp hai kỹ thuật giải trình tự và Scorpion ARMS.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Qua nghiên cứu 109 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ thực hiện xét nghiệm đột biến *EGFR* tại bệnh viện Ung bướu Nghệ An cho thấy: Tỷ lệ có đột biến gen *EGFR* là 44/109 bệnh nhân chiếm 40,37%. Trong đó tỷ lệ bệnh nhân nam là 55,96% cao hơn tỷ lệ bệnh nhân nữ là 44,04%; chủ yếu gặp độ tuổi trên 65 tuổi chiếm 52,29%. Đa số bệnh nhân thuộc loại ung thư biểu mô tuyến chiếm 96,33%. Vị trí lấy bệnh phẩm chủ yếu là từ u nguyên phát, với phương pháp lấy mẫu phổ biến là sinh thiết tế bào.

2. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* ở nhóm không hút thuốc cao hơn nhóm không hút thuốc (bệnh nhân nam không hút thuốc chiếm 42,86%, bệnh nhân nữ không hút thuốc chiếm tỷ lệ 56,25%)

3. Trong số 44 bệnh nhân được phát hiện, đột biến xóa đoạn LREA exon 19 và đột biến L858R exon 21 chiếm đa số với tỷ lệ lần lượt là 52,27% và 29,55%. Có 4 trường hợp mang đột biến kép chiếm tỷ lệ 9,09%. Đột biến kháng thuốc điều trị trúng đích *EGFR* TKI chiếm 15,9%.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu có các kiến nghị sau:

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

2. Tiếp tục nghiên cứu sự đột biến gen *EGFR* với số lượng mẫu nhiều hơn theo từng nhóm bệnh và theo từng dạng đột biến khác nhau để có những kết luận mang tính khách quan hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân, 1995. *Hỏi và đáp về bệnh ung thư*. NXB Y học, Hà Nội.
2. Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân, Đái Thị Ngân Hà, Đái Thị Hằng Nga, 2000). *Phòng bệnh ung thư*. NXB Y học, Hà Nội.
3. Đỗ Văn Bằng, Nguyễn Hoàng, Vũ Đoan Trang, Nguyễn Thị Thu Hằng, 1997). “Bước đầu nghiên cứu cây Trinh nữ hoàng cung (*Crium latifolium* L.) cây thuốc có khả năng chữa một số bệnh ung thư”, *Tạp chí Dược học*, số 2, tr. 7-9
4. Nguyễn Minh Hà, 2014. *Xác định đột biến gen EGFR quyết định tính đáp ứng thuốc trong điều trị bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ*. Luận án tiến sĩ Y khoa, Trường Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
5. Nguyễn Minh Hải, 2013. “Nghiên cứu giá trị định hướng chuẩn đoán của TPS trong ung thư phổi không tế bào nhỏ”, *Tạp chí y dược lâm sàng* 108, tập 8, tr. 141 - 145.
6. Hiệp hội quốc tế chống ung thư UICC, 1997. *Ung thư học lâm sàng*, NXB Y học, Hà Nội
7. Nguyễn Chấn Hùng, 1994. *Tìm hiểu bệnh ung thư*. NXB Thành phố Hồ Chí Minh
8. Trần Văn Khánh, Tạ Minh Hiếu và Trần Huy Thịnh, 2011. Đột biến gen EGFR, KRAS trong ung thư và liệu pháp điều trị đích. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, tr. 138-148.
9. Mai Trọng Khoa, Trần Đình Hà, Phạm Cẩm Phương và Hoàng Thị Hà, 2016. “Xác định đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ tại bệnh viện Bạch Mai”, *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, số 4 –

2016, trang 274-277.

10. Phạm Văn Luận, Nguyễn Đình Tiến và Nguyễn Minh Hải, 2016. “Đánh giá tỉ lệ đột biến gen EGFR ở bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ điều trị tại bệnh viện trung ương quân đội 108”, *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, số 4-2016, trang 178-182.
11. 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).
12. Nguyễn Thiện Nhân, Nguyễn Sơn Lam, Nguyễn Trần Phùng. “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 bằng erlotinib”. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*. 2010;14(4), tr.379-85
13. Nguyễn Ngọc Quang, Vương Diệu Linh, Lương Viết Hưng, Nguyễn Phi Hùng (2014). “Nghiên cứu tần suất và một số yếu tố liên quan đến đột biến gen EGFR tại exon 19 và exon 21 trong carcinoma tuyến của phổi”. *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, số 4, trang 96 -101.
14. Đỗ Kim Quế (2016), “Vai trò phẫu thuật nạo hạch trong điều trị Ung thư phổi không tế bào nhỏ”, *Tạp chí Ung thư học Việt Nam*, số 4-2016, 547-552.
15. 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.
16. Tạ Thành Văn (2010). *PCR và một số kỹ thuật Y Sinh học phân tử*. NXB Y Học Hà Nội, tr. 81-82.
17. Hoàng Anh Vũ, Cao Văn Động, Ngô Thị Tuyết Hạnh, Phan Thị Xinh và Hứa Thị Ngọc Hà, 2011. “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*, tập 14, phụ bản số 4, tr.166-172.
18. Hoàng Anh Vũ, Ngô Thị Tuyết Hạnh, (2014). "Đặc điểm đột biến gen trên

332 bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ". *Tạp chí y dược học lâm sàng* 108, 4, 58-64.

19. 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

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

20. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice.
21. Alberti.M, Granziano. D, C. Falco (2006), “High quality of peripheral blood progenitor cells collected by a continuous flow blood cell separator and a dual stage separation chamber”, *Vox Sanguinis* 91; Suppl 3. P-523
22. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):616-22.
23. Anh PT, Duc NB. The situation with cancer control in Vietnam. *Jpn J Clin Oncol.* 2002 Mar;32 Suppl:S92-7
24. 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
25. 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.
26. 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.
27. Boch C., Kollmeier J., Roth A. et al (2013). The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer : routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open*, **3**, 34 -40.

28. Carpenter G., King L.Jr. and Cohen S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, **276**, 409–410.
29. Croce C. M., Erikson J., Ar-rushdi A., Aden A., Nishikura K. (1984). “Translocated c-myc oncogen of Burkitt Lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3170-3174
30. Darnell J., Losdish H., Baltimore D. (1990). Molecular cell biology, *Scientific American Books*, 2nd Edition, Chapter 24, pp. 151-186
31. 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.
32. Ellison G., Donald E., McWalter G. et al (2010). A comparison of ARMS and ADNsequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *J Exp Clin Cancer Res.*, **29**, 132.
33. Ellison G., Zhu G., Moulis A. et al (2012). EGFR muatation testing in lung cancer: a review of available methods and their use fo analysis of tumor tissue and cytology samples. *J Clin Pathol.*, **0**, 1-11.
34. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. Dec 15;127(12):2893-917.
35. Globocan (2012)
36. 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.
37. Hanahan D., Weinberg R. A., (2000), “The hallmarks of cancer”, *Cell*, 100(1), pp. 57-70.
38. Herbst R.S., Heymach J.V. and Lippman S.M. (2008). Lung cancer. *N*

- Engl J Med*, **359**, 1367–1380.
39. 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.
 40. 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.
 41. Inukai M., Toyooka S., Ito S. et al (2006). Presence of epidermal growth factor receptor gen T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 66 (16), pp 7854-8.
 42. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Dec 3;100(23):1672-94.
 43. Jin H, Xu CX, Lim HT, Park SJ, Shin JY, Chung YS, et al. High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters Akt signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jan 1;179(1):59-68.
 44. Kikkawa U., Takai Y., Miyake R., Nishizuka Y. (1983), “Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters”, *J. Biol. Chem.* 258, pp. 11442-11445.
 45. 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.
 46. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 Jul;65(1):13-8.
 47. 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.

48. Li Y, Qiu LX, Shen XK, Lv XJ, Qian XP, Song Y. A meta-analysis of TP53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk: evidence from 15,857 subjects. *Lung Cancer*. 2009 Oct;66(1):15-21
49. Lurje G. and Lenz H.J (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*, **77**(6), 400-10.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Mohamed R., Massouda B., Akila D., et al., (2001). “Prediction of Peripheral Blood Progenitor Cell Collection by Measurement of CD34+ cells in the Preapheresis Blood”, *Medscape Hematology Oncology Journal*.4.
55. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert., Yang C.H., Chu D.T., Saijo N. et al (2009), “Gefitinib or carboplatin- paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma”. *N.Engl. J. Med.*, 361(10), pp. 947-57
56. 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

57. *Non small cell lung cancer*. 7. (2009).
58. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
59. Riely G.J., Marks J. and Pao W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc AmThorac Soc*, **6**, 201–205.
60. Sanders J. E., Hoffmeister P. A., Woolfrey AE, et al. (2009). “Thyroid function following hematopoietic cell transplantation in children: 30 years' experience”. *Blood* 113 (2): 306-8.
61. 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.
62. Shanakar S, Thanasekaran V, Dhanasekar T, Duvooru P (2014). Clinipathological and immunohistochemical profile of non small cell lung carcinoma in a tertiary care medical centre in South India. *Lung India*, 31, 23-8.
63. 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.
64. 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.
65. 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
66. 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
67. 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.

68. Tang N, Wu Y, Zhou B, Wang B, Yu R. Green tea, black tea consumption and risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2009 Sep;65(3):274-83.
69. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187), 638-42.
70. Toyooka S., Matsuo K., Shigematsu H. et al (2007), “The impact of sex and smoking status on the mutational spectrum of epidermal growth factor receptor gene in non small cell lung cancer”, *Clin. Cancer Res.*, pp. 5763-8
71. Wheeler D.L. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab : role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, **27**, 3944-3956.
72. 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.
73. 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.
74. 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.

TÀI LIỆU TỪ INTERNET

- 75 <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>
- 76 http://www.sabiosciences.com/qbiomarker_product/HT ML/SMH-014A.ht ml
- 77 https://www.slideshare.net/calius_bio/protooncogene

PHỤ LỤC

Phụ lục 1

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

Mã số khám chữa bệnh:.....

1.THÔNG TIN CHUNG

Họ và tên:.....

Tuổi:.....Giới tính: Nam/ nữ

Nghề nghiệp:.....

Địa chỉ:.....

Điện thoại liên lạc:.....

Ngày vào viện:.....

Ngày ra viện:.....

2. LÝ DO VÀO VIỆN

.....
.....

3. TIỀN CĂN

Hút thuốc lá: ☐ không hút thuốc

☐ có hút thuốc

☐ không rõ

Bệnh lý đi kèm:.....

.....

Tiền sử gia đình:.....
.....

3. ĐẶC ĐIỂM BỆNH UNG THƯ PHỔI

Chẩn đoán lâm sàng:.....

Giai đoạn bệnh:

- ☐ Giai đoạn 0
- ☐ Giai đoạn IA ☐ Giai đoạn IB
- ☐ Giai đoạn IIA ☐ Giai đoạn IIB
- ☐ Giai đoạn IIIA ☐ Giai đoạn IIIB
- ☐ Giai đoạn IV

Giải phẫu bệnh:

Mã số giải phẫu bệnh:.....

- ☐ Carcinom tế bào vảy ☐ Carcinom tế bào tuyến vảy
- ☐ Carcinom tế bào lớn ☐ Carcinom tế bào tuyến

Tình trạng di căn: T.....N.....M.....

Phương pháp đã điều trị: ☐ Phẫu thuật ☐ Hóa trị ☐ Xạ trị

Điều trị tại khoa:.....

4.XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN EGFR

Ngày nhận mẫu:.....

Ngày làm xét nghiệm:.....

Phương pháp lấy bệnh phẩm:

☐ Sinh thiết kim khối u

☐ Phẫu thuật

☐ Chọc dịch

Vị trí lấy bệnh phẩm:

☐ Khối u nguyên phát

☐ Màng phổi

☐ Tổ chức di căn

Kết quả xét nghiệm đột biến gen EGFR:

☐ Không đột biến

☐ Có đột biến: Exon..... - Loại đột biến:.....

Phụ lục 2

Danh sách bệnh nhân tham gia nghiên cứu

(sắp xếp theo thời gia vào viện)

STT	Họ và tên	Tuổi	Giới tính	Địa chỉ	Mã số hồ sơ	Ngày vào viện	Ngày ra viện
1	Đặng Thị T	60	Nữ	TP Vinh	1500010450	15/01/2015	25/01/2015
2	Trần Đình N	73	Nam	TP Vinh	1500001986	19/01/2015	12/02/2015
3	Đinh Văn Đ	70	Nam	Quỳnh Lưu	1500002310	21/01/2015	20/02/2015
4	Trần Thị M	54	Nữ	TP Vinh	1500002470	21/01/2015	21/02/2015
5	Thái Thị H	67	Nữ	Đô Lương	1500094823	03/02/2015	20/02/2015
6	Đường Xuân T	66	Nam	TP Vinh	1500007469	10/02/2015	22/02/2015
7	Cao Hồng K	70	Nam	Diễn Châu	1500004592	10/02/2015	12/03/2015
8	Nguyễn Thị Mai H	77	Nữ	TP Vinh	1500020804	24/02/2015	12/03/2015
9	Nguyễn Bá H	71	Nam	Đô Lương	1500006340	02/03/2015	12/03/2015
10	Phan Văn L	80	Nam	Diễn Châu	1500003886	12/03/2015	16/04/2015

11	Nguyễn Bá T	71	Nam	TP Vinh	1500009592	18/03/2015	07/04/2015
12	Đặng Bá L	82	Nam	Anh Sơn	1500022696	19/03/2015	20/04/2015
13	Lê Bá H	54	Nam	TP Vinh	1500002031	23/03/2015	08/04/2015
14	Cao Thị Bích H	43	Nữ	Nghĩa Đàn	15000154289	24/03/2015	10/04/2015
15	Phan Thị B	67	Nữ	Quỳ Châu	1500010347	24/03/2015	23/05/2015
16	Nguyễn Đức C	74	Nam	TP Vinh	1500010643	25/03/2015	14/04/2015
17	Thái Thị T	57	Nữ	Đức Thọ- HT	1500011006	27/03/2015	21/04/2015
18	Lê Thị T	58	Nữ	Nam Đàn	1500011330	30/03/2015	02/06/2015
19	Thái Văn V	74	Nam	Đô Lương	1500011989	03/04/2015	21/04/2015
20	Đặng Thị T	61	Nữ	TP Vinh	1500009578	08/04/2015	30/04/2015
21	Nguyễn Hữu T	73	Nam	TP Vinh	1500013595	13/04/2015	25/04/2015
22	Phan Văn C	75	Nam	Hung Nguyên	1500043564	13/04/2015	13/05/2015
23	Trần Xuân H	59	Nam	Diễn Châu	1500014811	20/04/2015	05/05/2015
24	Lê Thanh T	72	Nam	TP Vinh	1500006918	03/05/2015	18/05/2015

25	Nguyễn Đình D	53	Nam	Con Cuông	1500018100	11/05/2015	12/07/2015
26	Nguyễn Thị H	76	Nữ	Yên Thành	1500003283	12/05/2015	28/05/2015
27	Võ Thị N	57	Nữ	Con Cuông	1500018238	22/05/2015	16/06/2015
28	Thái Xuân T	62	Nam	Yên Thành	1500021208	02/06/2015	07/07/2017
29	Nguyễn Trung N	62	Nam	TP Vinh	1500021155	02/06/2015	25/06/2015
30	Nguyễn Xuân G	47	Nam	TP Vinh	1500022154	08/06/2015	19/06/2015
31	Nguyễn Thị K	82	Nữ	TP Vinh	1500024067	15/06/2015	04/07/2015
32	Võ Văn P	56	Nam	TP Vinh	1500025121	23/06/2015	21/07/2015
33	Dương Văn K	64	Nam	TP Vinh	1500025101	23/06/2015	31/07/2015
34	Trần Thị C	82	Nữ	Nam Đàn	1500026536	30/06/2015	31/07/2015
35	Hoàng Thị N	42	Nữ	Nam Đàn	1500026558	30/06/2015	30/07/2015
36	Đậu Thị L	69	Nữ	Cửa Lò	1500027825	07/07/2015	27/07/2015
37	Trần Xuân M	70	Nam	Quỳ Hợp	1500036934	08/07/2015	30/07/2015
38	Phạm Văn B	74	Nam	TP Vinh	1500028739	10/07/2015	04/08/2015

39	Nguyễn Bá B	50	Nam	Thanh Chương	1500041989	19/07/2015	20/09/2015
40	Phan Thị T	67	Nữ	Hung Nguyên	1500034971	11/08/2015	10/09/2015
41	Nguyễn Văn H	56	Nam	Đô Lương	1500041065	12/08/2015	04/09/2015
42	Hồ Nghĩa T	56	Nam	Quỳ Châu	1500042780	01/09/2015	17/10/2015
43	Nguyễn Thị T	44	Nữ	Nam Đàn	1500041051	14/09/2015	20/11/2015
44	Nguyễn Thị K	68	Nữ	Diễn Châu	1500041434	19/09/2015	14/10/2015
45	Nguyễn Thị V	60	Nữ	Hung Nguyên	1500042800	22/09/2015	20/10/2015
46	Nguyễn Thị T	60	Nữ	Nghĩa Đàn	1500012945	28/09/2015	20/10/2015
47	Hồ Công X	50	Nam	Quỳnh Lưu	1500058122	13/10/2015	14/11/2015
48	Lê Đình T	58	Nam	Đô Lương	1500086023	19/10/2015	20/11/2015
49	Phan Thị C	70	Nữ	Thanh Chương	1500052862	10/11/2015	30/11/2015
50	Nguyễn Đình M	70	Nam	Quỳ Hợp	1500053806	16/11/2015	30/12/2015
51	Lê Thị Th	81	Nữ	TP Vinh	1500028782	01/12/2015	14/12/2015
52	Phạm Thị D	77	Nữ	TP Vinh	1500050706	04/12/2015	20/12/2015

53	Lê Thị L	79	Nữ	Nghi Lộc	1500058389	07/12/2015	16/12/2015
54	Ngô Xuân T	75	Nam	Diễn Châu	1500059061	09/12/2015	25/12/2015
55	Nguyễn Thị H	68	Nữ	Nghĩa Đàn	1500058853	09/12/2015	29/12/2015
56	Nguyễn Văn T	51	Nam	Hung Nguyên	1500061353	21/12/2015	15/01/2016
57	Nguyễn Trọng N	68	Nam	Quỳnh Lưu	1600000649	06/01/2016	12/08/2016
58	Trần Văn K	62	Nam	Quỳnh Lưu	1600000966	10/01/2016	23/02/2016
59	Lê Thị L	52	Nữ	Nam Đàn	1600007784	10/01/2016	12/03/2016
60	Phạm Thị S	56	Nữ	Thanh Chương	1600000907	13/01/2016	24/02/2016
61	Trương Đ	65	Nam	TP Vinh	1600002185	14/01/2016	30/01/2016
62	Bùi Đình C	57	Nam	Đô Lương	1600003015	19/01/2016	28/03/2016
63	Nguyễn Hữu P	77	Nam	Thanh Chương	1600003637	22/01/2016	15/02/2016
64	Hoàng Trung M	75	Nam	Quỳnh Lưu	1600003756	25/01/2016	29/04/2016
65	Nguyễn Trọng T	67	Nam	Nghi Lộc	1600000820	01/02/2016	15/02/2016
66	Nguyễn Thị T	58	Nữ	Hung Nguyên	1600008347	13/02/2016	02/03/2016
67	Cao Thị T	65	Nữ	TP Vinh	1600005638	16/02/2016	02/03/2016

68	Phan Văn L	59	Nam	Thanh Chương	1600007462	24/02/2016	15/03/2016
69	Hà Ngọc C	58	Nam	Yên Thành	1600012787	21/03/2016	22/04/2016
70	Phạm Thị T	54	Nữ	Nghệ An	1600015385	30/03/2016	27/05/2016
71	Mai Thị T	72	Nữ	Nghi Xuân - Hà Tĩnh	1600081065	04/04/2016	22/04/2016
72	Đặng Thị L	74	Nữ	Đô Lương	1600084230	08/04/2016	10/06/2016
73	Thái Thị B	68	Nữ	Đô Lương	1600005389	19/04/2016	05/05/2016
74	Nguyễn Văn X	68	Nam	TP Vinh	1600067206	01/05/2016	18/05/2016
75	Chu Khánh L	33	Nam	Nghĩa Đàn	1600024758	10/05/2016	27/05/2016
76	Bùi Thị Hoài T	39	Nữ	Nghĩa Đàn	1600025615	12/05/2016	15/06/2016
77	Đậu Thị Q	73	Nữ	TP Vinh	1600026290	16/05/2016	02/07/2016
78	Bùi Ngọc X	68	Nam	Quỳnh Lưu	1600027073	19/05/2016	06/06/2016
79	Nguyễn Thị H	52	Nữ	Nam Đàn	1600027861	23/05/2016	29/06/2016
80	Phạm Văn D	80	Nam	Diễn Yên- Diễn Châu	1600028488	25/05/2016	27/06/2016
81	Trần Công H	64	Nam	Quỳ Hợp	1600031089	06/06/2016	03/07/2016
82	Đặng Thị H	65	Nữ	Nghi Lộc	1600035646	24/06/2016	12/07/2016

83	Cao Văn T	70	Nam	Hung Nguyên	1600037401	30/06/2016	15/08/2016
84	Trương Hoàng G	60	Nam	Anh Sơn	1600005682	04/08/2016	27/08/2016
85	Nguyễn Thị C	72	Nữ	Nghĩa Đàn	1600002875	24/08/2016	30/09/2016
86	Hồ Xuân N	57	Nam	Yên Thành	1600039671	29/08/2016	15/09/2016
87	Lê T	54	Nam	Diễn Châu	1600060751	30/09/2016	21/09/2016
88	Nguyễn Tiến C	57	Nam	Anh Sơn	1600001563	09/10/2016	10/11/2016
89	Nguyễn Thị L	68	Nữ	Nam Đàn	1600059023	19/10/2016	05/11/2016
90	Lê Xuân Đ	72	Nam	Quỳ Hợp	1600067472	20/10/2016	17/11/2016
91	Nguyễn Đình M	70	Nam	Quỳ Hợp	1600065985	21/10/2016	07/11/2016
92	Nguyễn Văn H	56	Nam	Nam Đàn	1600034098	10/11/2016	12/12/2016
93	Bạch Thị L	66	Nữ	Thanh Chương	1600002946	27/11/2016	29/12/2016
94	Đặng Thị H	55	Nữ	Diễn Châu	1600087231	12/12/2016	30/01/2017
95	Lê Đức T	45	Nam	TP Vinh	1600072301	12/12/2016	03/02/2017
96	Lê Thị Lương N	68	Nữ	Thanh Chương	1700002985	07/01/2017	21/01/2017

97	Nguyễn Văn M	69	Nam	TP Vinh	1700048332	12/01/2017	15/02/2017
98	Nguyễn Thị T	57	Nữ	Nghi Lộc	1700003071	17/01/2017	13/02/2017
99	Võ Thị T	59	Nữ	TP Vinh	1700011458	17/01/2017	
100	Nguyễn Thượng B	69	Nam	Diễn Phúc - Diễn Châu	1700006088	08/02/2017	24/02/2017
101	Lê Đăng S	82	Nam	Quỳnh Lưu	1700011312	27/02/2017	04/04/2017
102	Võ Thị L	59	Nữ	Nghệ An	1700014749	13/03/2017	11/04/2017
103	Lê Viết T	67	Nam	Hà Tĩnh	1700056209	03/05/2017	30/05/2017
104	Phan Văn H	52	Nam	Hà Tĩnh	1700012988	11/06/2017	19/07/2017
105	Nguyễn Văn C	60	Nam	Nam Đàn	1700030094	07/07/2017	27/07/2017
106	Phạm Thị M	82	Nữ	Yên Thành	1700029706	29/08/2017	26/09/2017
107	Nguyễn Trọng S	64	Nam	Hà Tĩnh	1700066027	13/09/2017	02/10/2017
108	Hoàng Thị B	41	Nữ	Quỳnh Lưu	1500035631	15/12/2015	30/12/2015
109	Tạ Thị P	49	Nữ	Thanh Chương	1500033432	25/02/2015	13/03/2015