

VAI TRÒ CỦA XÉT NGHIỆM TÌM ĐỘT BIẾN GEN EGFR TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ PHỔI KHÔNG TẾ BÀO NHỎ TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Phạm Nguyên Cường¹✉, Phạm Như Hiệp², Nguyễn Thanh Xuân³, Trang Hiếu Hùng¹, Đoàn Phước Thi¹, Nguyễn Đào Thanh Tâm¹

¹Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Trung ương Huế

²Trung tâm Ung bướu, Bệnh viện Trung ương Huế

³Khoa Ngoại Nhi Cấp cứu bụng, Bệnh viện Trung ương Huế

TÓM TẮT

Xét nghiệm đột biến gen EGFR là một xét nghiệm cần thiết trong chẩn đoán ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), vì tính sẵn có của các loại thuốc điều trị và hiệu quả của nó. Hiện nay, xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR trong ung thư phổi đã được Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Trung ương Huế tiếp tục triển khai, nơi phát triển mạnh các phương pháp chẩn đoán gen bệnh lý này theo hướng rộng và sâu đối với các bệnh phẩm mô bệnh học khối u, cả cấp độ tế bào và cấp độ phân tử. Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Trung ương Huế đang xúc tiến xét nghiệm các đột biến gen khác ngoài EGFR như KRAS, NRAS, BRAF trong ung thư vú, ung thư đại trực tràng ... Chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra đột biến gen trên mẫu máu để đưa ra kết quả chính xác và phong phú về đột biến gen, phục vụ mục tiêu điều trị cho bệnh nhân ung thư.

Từ khóa: Ung thư phổi, đột biến gen, EGFR, điều trị đích.

ABSTRACT

THE ROLE OF EGFR GENE MUTATION TEST IN THE DIAGNOSIS OF NON - SMALL CELL LUNG CARCINOMA AT HUE CENTRAL HOSPITAL

Pham Nguyen Cuong¹ ✉, Pham Nhu Hiep², Nguyen Thanh Xuan³, Trang Hieu Hung¹, Doan Phuoc Thi¹, Nguyen Dao Thanh Tam¹

EGFR gene mutation test is an essential test in the diagnosis of non small cell lung carcinoma (NSCLC), because of the availability of therapeutic drugs and its effectiveness. At present, the test for EGFR genetic mutations in lung cancer has been continued by the Department of Pathology, Hue Central Hospital where these pathological gene diagnosis is strongly developed in the wide and deep direction for tumor histopathology specimens, both cell level and molecular level. The Department of Pathology - Hue Central Hospital is promoting testing for other more gene mutations besides EGFR such as KRAS, NRAS, BRAF in the breast cancer, colorectal cancers and so on. We also take the examination for gene mutation on the blood samples to give accurate and rich genetic mutation results, serving targeted treatment for the cancer patients.

Keywords: Lung cancer, genetic mutation, EGFR, targeted treatment.

Ngày nhận bài:

26/6/2022

Ngày chỉnh sửa:

20/7/2022

Chấp thuận đăng:

01/8/2022

Tác giả liên hệ:

Phạm Nguyên Cường

Email: bscuonggp@gmail.com

SĐT: 0914006781

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê mới nhất của tổ chức nghiên cứu ung thư quốc tế IARC (International Agency for Research on Cancer), gánh nặng bệnh ung thư toàn cầu đang ngày càng trầm trọng, với 18,1 triệu ca mới mắc và 9,6 triệu trường hợp tử vong trong năm 2018 [1]. Tại Việt Nam, bệnh ung thư cũng đang là thách thức không nhỏ, số trường hợp mắc mới từ 68.000 ca năm 2000 tăng nhanh tới 165.000 ca trong năm 2018 [2]. Trong số đó, ung thư phổi (UTP) là loại ung thư có tỉ lệ mắc và tỉ lệ tử vong cao hàng đầu. Bệnh thường gặp nhiều hơn ở nam giới với tỉ lệ mắc chuẩn theo tuổi trên 100.000 dân là 35,4 ở nam và 11,1 ở nữ. Ước tính mỗi năm có khoảng 23.000 ca mới mắc và gần 21.000 ca tử vong do ung thư phổi [3].

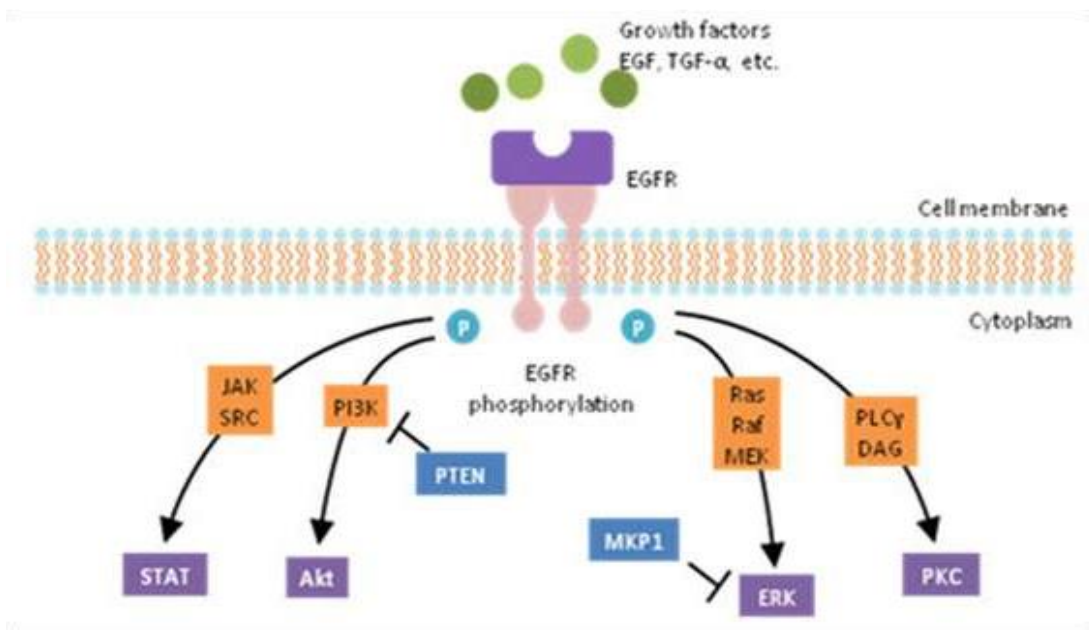
Ung thư phổi được chia thành 2 nhóm lớn, có sự khác biệt quan trọng trong tiên lượng cũng như điều trị là ung thư phổi tế bào nhỏ, chiếm khoảng 20% và ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN) chiếm 80% [4]. Cũng như các loại ung thư khác, tùy từng thể bệnh và giai đoạn bệnh, việc điều trị ung thư phổi phải kết hợp các biện pháp khác nhau như phẫu thuật, hóa trị, xạ trị, điều trị trúng đích, điều trị miễn dịch... với mục tiêu điều trị khác nhau đối với từng giai đoạn bệnh. Cho đến nay hiệu quả điều trị cho các bệnh nhân UTP nói chung còn thấp, tỉ lệ tử vong của ung thư phổi còn ở mức cao do bệnh có xu hướng

di căn sớm và đặc biệt bệnh thường được chẩn đoán ở giai đoạn muộn (60 - 80% số bệnh nhân) [5]. Đối với các trường hợp UTPKTBN giai đoạn tiến triển, các biện pháp điều trị chủ yếu là hoá trị kết hợp xạ trị với mục tiêu làm tăng chất lượng cuộc sống và kéo dài thời gian sống còn cho bệnh nhân [6].

II. VAI TRÒ CỦA XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN EGFR TRONG UNG THƯ PHỔI

Trong những năm gần đây, với sự phát triển mạnh mẽ của sinh học phân tử trong chẩn đoán ung thư nói chung và ung thư phổi nói riêng đã đem lại những hiểu biết mới về các cơ chế phân tử của ung thư, từ đó mở ra các hướng mới trong nghiên cứu thử nghiệm các phương pháp điều trị ung thư đặc hiệu. Một trong số đó là việc phát hiện tình trạng đột biến gen EGFR ứng dụng trong liệu pháp điều trị đích cho bệnh nhân UTPKTBN [7 - 10].

Thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor) là thụ thể trên bề mặt tế bào, có chức năng tiếp nhận tín hiệu từ các yếu tố tăng trưởng để kích thích tế bào sinh trưởng, phân chia, biệt hóa [11, 12]. Protein EGFR có 3 vùng cơ bản, vùng ngoại bào tiếp nhận các kích thích của phối tử, vùng xuyên màng và vùng nội bào có khả năng đáp ứng với các kích thích vào thụ thể ngoại bào, thông qua quá trình phosphoryl hóa vùng tyrosine kinase, từ đó kích hoạt các con đường tín hiệu phụ thuộc EGFR bên trong tế bào [13, 14].



Hình 1: Sơ đồ cấu trúc và cơ chế hoạt động của phân tử EGFR

Gen EGFR gồm 30 exon, trong ung thư phổi không tế bào nhỏ, đột biến gen gây mất kiểm soát [15]. Đó cũng là cơ sở phân tử của liệu pháp điều trị đích cho bệnh nhân UTPKTBN bằng các thuốc ức chế vùng tyrosine kinase của phân tử EGFR (TKI: Thyrosine Kinase Inhibitor) - các thuốc TKI có tác dụng ngăn chặn quá trình EGFR thường xảy ra ở các exon 18 - 21 là vùng mã hoá protein EGFR ở vùng tyrosine kinase [16 - 20]. Khi xảy ra đột biến này, sự phosphoryl hóa protein diễn ra tự động và liên tục mà không phụ thuộc vào các yếu tố kích thích ngoại bào, điều này dẫn tới hậu quả các con đường tín hiệu phụ thuộc EGFR bị kích hoạt liên tục, làm cho tế bào tự phosphoryl hóa của vùng tyrosine kinase, từ đó cắt đứt các con đường tín hiệu xuất nguồn từ EGFR. Các nghiên cứu cho thấy, tần suất xuất hiện đột biến EGFR trên bệnh nhân UTPKTBN ở Việt Nam khoảng 40 - 60%, thường gặp ở bệnh nhân nữ, không hút thuốc và typ có mô bệnh học là ung thư biểu mô tuyến (Adenocarcinoma).

III. CÁC CHỈ ĐỊNH ĐIỀU TRỊ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỘT BIẾN EGFR

3.1. Đối với các trường hợp bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ ở giai đoạn tiến triển

Xét nghiệm đột biến gen EGFR có vai trò trong việc xác định tình trạng đột biến gen của tế bào u, làm căn cứ cho việc lựa chọn phương pháp điều trị đích cho bệnh nhân. Các trường hợp có khối u mang đột biến gen EGFR ở exon 18, 19 và 21 có chỉ định điều trị đích với thuốc TKI; ngược lại, các trường hợp không mang đột biến EGFR hiếm khi đáp ứng với thuốc TKIs [18, 21].

Các thuốc TKI thế hệ I và II như Gefitinib, Erlotinib, Afatinib... đã cho thấy hiệu quả rõ rệt khi điều trị cho các bệnh nhân UTPKTBN có đột biến gen EGFR ở exon 18, 19 và 21, nhất là các trường hợp bệnh ở giai đoạn tiến triển [22, 23].

3.2. Đối với các trường hợp bệnh ung thư phổi có tình trạng kháng thuốc TKI

Nghiên cứu cho thấy, các bệnh nhân UTPKTBN sau một thời gian được điều trị với TKI sẽ xảy ra tình trạng kháng thuốc mà nguyên nhân phần lớn là do xuất hiện tình trạng đột biến thứ phát dạng T790M ở exon 20 gen EGFR, đột biến này dẫn tới sự thay đổi trong cấu trúc của protein EGFR, làm mất hiệu quả của các thuốc TKI thế hệ đầu [24]. Trong những trường hợp này, việc xét nghiệm xác định tình trạng

đột biến thứ phát (T790M) có ý nghĩa trong việc lựa chọn các thuốc TKI thế hệ thứ III (Osimertinib) cho bệnh nhân [25].

IV. SƠ LƯỢC MÁY REAL TIME PCR XÉT NGHIỆM ĐỘT BIẾN GEN TẠI KHOA GIẢI PHẪU BỆNH - BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Máy Real - time PCR EasyPGX (Model gốc AriaDx) cho phân tích di truyền và đột biến gene. Hãng chủ sở hữu: Diatech Pharmacogenetics - Italia. Hãng sản xuất: Agilent - Mỹ. Model : Easy PGX, Xuất xứ: Malaysia. Tiêu chuẩn chất lượng: CE - IVD.

Các thiết bị kèm theo, gồm: Máy Real - time PCR 96 giếng; Máy lắc trộn mẫu; Máy lắc trộn kèm ly tâm lắng mẫu cho ống 1.5 ml; Máy lắc trộn kèm ly tâm lắng mẫu cho dây 8 ống 0.2 ml; Phần mềm điều khiển máy; Phần mềm phân tích và nhận định kết quả tự động cho đột biến gen và di truyền; Bộ máy tính kèm máy in màu (mua trong nước); Bộ kit tách chiết và xác định đột biến gen EGFR: 48 test; Bộ phụ kiện tiêu chuẩn

Giới thiệu hệ thống: Máy Easy PGX là một công cụ định lượng sự khuếch đại, phát hiện và phân tích Nucleic Acid. Hệ thống máy được thiết kế kết hợp giữa bộ phận luân nhiệt, hệ thống quang học với nguồn sáng kích thích LED và phần mềm phân tích.

Máy Easy PGX được chuẩn hóa kèm với kit các kit ở dạng sẵn sàng sử dụng "EasyPGX® ready".

Hệ thống máy đạt tiêu chuẩn chất lượng châu Âu và được sử dụng cho chẩn đoán trên người theo đạo luật trang thiết bị y tế của châu Âu European Directive 98/79/EC 98/79/EC.

Thông số kỹ thuật: Công nghệ sử dụng: Real - time PCR; Bộ phận luân nhiệt: Sử dụng công nghệ luân nhiệt Peltier block; Công suất (số vị trí): 96 giếng; Giải nhiệt độ hoạt động: 25°C - 99°C; Độ đồng nhất nhiệt độ: $\pm 0.25^\circ\text{C}$; Tốc độ tăng nhiệt: $> 6^\circ\text{C/s}$; Tốc độ làm lạnh: $> 2.5^\circ\text{C/s}$; Độ chính xác nhiệt độ: $\pm 0.2^\circ\text{C}$; Thể tích phản ứng: 10 - 30 μl ; Bộ phận quang học sử dụng nguồn sáng kích thích LED; Nguồn sáng kích thích: Sử dụng 8 đèn LED kích thích cho mỗi modul quang học; Bộ phận phát hiện: Sử dụng 8 photodiodes cho mỗi modul quang học; Số modul quang học: 6 modul quang học; Modul quang học cài sẵn: 2 kênh FAM, HEX

IV. CHỈ ĐỊNH XÉT NGHIỆM

Xét nghiệm đột biến gen EGFR được chỉ định lần đầu cho các bệnh nhân được chẩn đoán là ung thư phổi không tế bào nhỏ bằng xét nghiệm mô bệnh học giải phẫu bệnh.

Đối với các bệnh nhân UTPKTBN đã được điều trị đích với TKI có xuất hiện tình trạng kháng thuốc, xét nghiệm đột biến gen EGFR được chỉ định nhằm xác định tình trạng có đột biến thứ phát (T790M) [24, 26].

Bệnh phẩm: Xét nghiệm được thực hiện trên bệnh phẩm là mẫu mô sinh thiết từ khối u nguyên phát ở phổi (sinh thiết bằng kim hoặc qua phẫu thuật), từ các vị trí ung thư di căn, bệnh phẩm khối tế bào (cell - block), chọc hút từ khối u hoặc dịch ác tính từ các khoang cơ thể có đủ số lượng tế bào u (ít nhất 100 tế bào u).

VI. CÁC BƯỚC CƠ BẢN TRONG QUY TRÌNH

1. Chuẩn bị mẫu với EasyPGX® readyDNA Sample preparation kit.
2. Loại paraffin đối với mẫu mô vùi trong paraffin, hoặc mẫu mô gắn trên lam.
3. Tách chiết DNA từ tế bào ung thư trên mẫu mô.
4. Đưa vào máy xử lý cùng loại kit, mỗi phù hợp. Máy sẽ xử lý cho đến khi ra kết quả.

6.1. Chuẩn bị mẫu với DNA Sample preparation kit

Chuẩn bị hóa chất: Pha Enzyme Protease : thêm 4,5ml nước cất vô trùng vào ống proteinase k (PK), trộn đều bằng cách lắc ống 5 - 10 lần, rồi rút 450ul vào các ống 1.5ml lưu trữ ở -20°C. Mỗi mẫu cần 70 ul PK. Pha WBI: thêm 15 ml absoluteethanol, lắc 10 lần trữ ở nhiệt độ 15 - 30°C. Pha WBII: thêm 50 ml absoluteethanol, lắc 10 lần trữ ở nhiệt độ 15 - 30°C

6.2. Loại paraffin (đối với mẫu mô vùi trong paraffin)

Loại paraffin trên mẫu mô gắn trên lame: Ngâm lame trong xylene trong 5 phút; Chuyển qua ethanol ngâm trong 5 phút; Lấy ra khỏi ethanol và làm khô hoàn toàn bằng không khí; Tiến hành chọn vùng tế bào nếu mẫu mô có thành phần tế bào ác tính nhỏ hơn 10%; Hút 180ul DNA TLB và 70ul vào ống 1,5ml; Gạt mẫu mô trên lame vào trong hỗn hợp DNA TLB/PK.

Loại paraffin mẫu mô FFPET không gắn trên lame: Tiến hành chọn vùng tế bào nếu mẫu mô có thành phần tế bào ác tính nhỏ hơn 10%. Cho 500ul xylene vào ống 1,5ml chứa mẫu mô FFPET. Vortex

10 giây. Để yên trong 5 phút ở nhiệt độ 15 - 30°C. Thêm vào 500ul ethanol, vortex 10 giây. Để yên trong 5 phút ở nhiệt độ 15 - 30°C. Ly tâm ở tốc độ 16000 đến 20000 trong 2 phút, đổ bỏ phần chất lỏng. Thêm vào 1 ml ethanol, vortex 10 giây. Ly tâm ở tốc độ 16000 đến 20000 trong 2 phút, đổ bỏ phần chất lỏng. Mở nắp sấy khô ở 56°C trong block nhiệt (5 phút)/Bổ sung 180ul DNA TLB và 70 ul PK.

Đối với mẫu tế bào ác tính trong dịch thì tiến hành thu mẫu tế bào trên lame phết vào ống 1.5ml đã có 180ul DNA TLB và 70 ul PK.

6.3. Tách chiết DNA

Mẫu FFPET sau khi đã loại paraffin và bổ sung hỗn hợp DNA TLB/PK. Vortex 30 giây. Ủ ở 56°C trong block nhiệt 60 phút. Vortex 10 giây. Ủ ở 90°C trong block nhiệt 60 phút. Làm mát ở 15 - 30°C. Ly tâm nhẹ để thu toàn bộ nước bám trên nắp ống. Bổ sung 200ul DNAPBB, pipet 3 lần.

Ủ ở 15 - 30°C trong 10 phút. Thêm 100ul isopropanol, pipet 3 lần. Chuyển qua FT/CT (cột lọc bỏ trong ống ly tâm 2ml). Ly tâm FT/CT 8000 vòng trong 1 phút. Đặt FT vào CT mới. Thêm 500ul WB I đã pha ethanol. Ly tâm FT/CT 8000 vòng trong 1 phút. Đổ bỏ dịch. Thêm 500ul WB II đã pha ethanol. Ly tâm FT/CT 8000 vòng trong 1 phút. Đặt FT vào CT mới.

Ly tâm FT/CT 16000 - 20000 vòng trong 1 phút. Đặt FT vào Ependorf mới đánh số sẵn, bổ sung 100 µl DNA EB. Ủ ở 15 - 30°C trong 5 phút. Ly tâm 8000 trong 1 phút, thu DNA tách chiết, tiến hành đo nồng độ.

6.4. Xử lý trong máy và cho ra kết quả

Kiểm tra các thông tin, các sai số có thể có. Diễn giải kết quả và báo cáo: Phát hiện đột biến gen EGFR; Không phát hiện đột biến gen EGFR

VII. LƯU Ý (CẢNH BÁO)

7.1. Trình độ chuyên môn của người vận hành

Người vận hành phải có kiến thức vững chắc về các hướng dẫn và tiêu chuẩn liên quan cũng như thông tin và quy trình thực hiện có trong tất cả các hướng dẫn sử dụng có liên quan. Không thực hiện việc vận hành hoặc bảo trì nếu chưa được đào tạo chuyên môn. Thực hiện cẩn thận theo quy trình được mô tả trong tất cả các hướng dẫn sử dụng có liên quan để vận hành và bảo trì. Thực hiện theo tiêu chuẩn thực hành phòng xét nghiệm, đặc biệt khi làm việc với các vật liệu sinh học nguy hiểm.

7.2. Sử dụng máy đúng cách và an toàn

Có thiết bị bảo hộ cá nhân: Đảm bảo mang các thiết bị bảo hộ thích hợp, bao gồm, nhưng không giới hạn, kính bảo hộ, áo khoác phòng xét nghiệm chống thấm nước và găng tay dùng một lần. Đeo khẩu trang nếu có nguy cơ bị bắn dung dịch. Độ đúng/độ chính xác của kết quả đo.

Không sử dụng thuốc thử đã quá hạn sử dụng, nếu không kết thu được có thể không chính xác. Với mục đích chẩn đoán, luôn đánh giá kết quả xét nghiệm kèm theo bệnh sử, thăm khám lâm sàng và các phát hiện khác. Mỗi phòng xét nghiệm phải kiểm tra lại hiệu năng của thuốc thử đáp ứng theo tiêu chuẩn đã công bố.

Điều kiện vận hành: Việc vận hành ngoài các khoảng giới hạn quy định, ví dụ với nhiệt độ và/hoặc độ ẩm môi trường quá cao có thể dẫn đến kết quả không đúng hoặc sai chức năng của thiết bị hoặc máy phân tích. Sử dụng thiết bị và máy phân tích theo quy định trong tiêu chuẩn kỹ thuật. Đảm bảo rằng các lỗ thông khí của thiết bị hoặc máy phân tích không bị cản trở. Thực hiện bảo trì theo các khoảng thời gian quy định để duy trì điều kiện vận hành của thiết bị và máy phân tích. Bảo quản tất cả các hướng dẫn sử dụng ở nơi an toàn để đảm bảo nó không bị hỏng và sẵn sàng để sử dụng. Tất cả các hướng dẫn sử dụng phải dễ dàng xem được ở mọi thời điểm.

Các phụ kiện được chấp thuận: Việc sử dụng các phụ kiện hoặc thiết bị chưa được chấp thuận có thể dẫn đến sai chức năng của thiết bị hoặc máy phân tích và làm cho việc bảo hành không còn hiệu lực. Chỉ sử dụng các phụ kiện và thiết bị được đã được chấp thuận.

Phần mềm của bên thứ ba: Việc cài đặt bất kỳ phần mềm của bên thứ ba mà chưa được chấp thuận bởi nơi cung cấp có thể làm cho hệ thống hoặc phần mềm vận hành không chính xác. Không cài đặt bất kỳ phần mềm nào chưa được chấp thuận.

VIII. KẾT LUẬN

Xét nghiệm đột biến gen EGFR đang là một xét nghiệm rất cần thiết trong chẩn đoán UTPKTBN vì tính sẵn có của thuốc điều trị và tính hiệu quả của nó. Ngoài ra, xét nghiệm tìm các đột biến gen trong ung thư đã đặt ra cho Khoa Giải phẫu bệnh một đường hướng phát triển mạnh mẽ trong chẩn đoán giải phẫu bệnh theo hướng rộng và sâu cho

các bệnh phẩm mô bệnh học khối u, từ mức độ tế bào đến mức độ phân tử u. Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh Viện Trung ương Huế đang đẩy mạnh thực hiện xét nghiệm các loại đột biến khác ngoài EGFR như KRAS, NRAS, BRAF trong các loại ung thư vú, ung thư đại trực tràng và các loại ung thư khác, cũng như sẽ thực hiện trên các mẫu máu để đưa ra các kết quả đột biến gen chính xác và phong phú, phục vụ điều trị đích cho bệnh nhân./.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424.
2. Pham T, Bui L, Kim G, Hoang D, Tran T, Hoang M. Cancers in Vietnam-Burden and Control Efforts: A Narrative Scoping Review. *Cancer Control*. 2019;26:1073274819863802.
3. Tran HTT, Nguyen S, Nguyen KK, Pham DX, Nguyen UH, Le AT, et al. Lung Cancer in Vietnam. *J Thorac Oncol*. 2021;16:1443-1448.
4. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol*. 2022;17:362-387.
5. Ahmad AS, Mayya AM. A new tool to predict lung cancer based on risk factors. *Heliyon*. 2020;6:e03402.
6. Sim JA, Kim YA, Kim JH, Lee JM, Kim MS, Shim YM, et al. The major effects of health-related quality of life on 5 - year survival prediction among lung cancer survivors: applications of machine learning. *Sci Rep*. 2020;10:10693.
7. Greillier L, Gauvrit M, Paillaud E, Girard N, Montegut C, Boulahssass R, et al. Targeted Therapy for Older Patients with Non - Small Cell Lung Cancer: Systematic Review and Guidelines from the French Society of Geriatric Oncology (SoFOG) and the French - Language Society of Pulmonology (SPLF)/French - Language Oncology Group (GOLF). *Cancers (Basel)*. 2022;14.
8. Liu SY, Liu SM, Zhong WZ, Wu YL. Targeted Therapy in Early Stage Non - small Cell Lung Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2022.
9. Tian X, Gu T, Lee MH, Dong Z. Challenge and countermeasures for EGFR targeted therapy in non - small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2022;1877:188645.
10. Zhao Y, Guo S, Deng J, Shen J, Du F, Wu X, et al. VEGF/VEGFR-Targeted Therapy and Immunotherapy

- in Non - small Cell Lung Cancer: Targeting the Tumor Microenvironment. *Int J Biol Sci.* 2022;18:3845-3858.
11. Hong CS, Sun EG, Choi JN, Kim DH, Kim JH, Ryu KH, et al. Fibroblast growth factor receptor 4 increases epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling by inducing amphiregulin expression and attenuates response to EGFR inhibitors in colon cancer. *Cancer Sci.* 2020;111:3268-3278.
 12. Shanmugapriya K, Kim H, Kang HW. Epidermal growth factor receptor conjugated fucoidan/alginate loaded hydrogel for activating EGFR/AKT signaling pathways in colon cancer cells during targeted photodynamic therapy. *Int J Biol Macromol.* 2020.
 13. Abu - Yousif AO, Moor AC, Zheng X, Savellano MD, Yu W, Selbo PK, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted photosensitizer selectively inhibits EGFR signaling and induces targeted phototoxicity in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 2012;321:120-7.
 14. Heuckmann JM, Rauh D, Thomas RK. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and covalent EGFR inhibition in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30:3417-20.
 15. Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, Beasley MB, Johnson DH, McShane LM, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non - small - cell lung cancer considering first - line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29:2121-7.
 16. Bironzo P, Reale ML, Sperone T, Tabbo F, Caglio A, Listi A, et al. Clinical and Molecular Features of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutation Positive Non - Small - Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs): Predictive and Prognostic Role of Co-Mutations. *Cancers (Basel).* 2021;13.
 17. Jethwa M, Gangopadhyay A, Saha A. Search for potentially biased epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors through pharmacophore modelling, molecular docking, and molecular dynamics (MD) simulation approaches. *J Biomol Struct Dyn.* 2022;1-9.
 18. Kaufman NEM, Dhingra S, Jois SD, Vicente M. Molecular Targeting of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR). *Molecules.* 2021;26.
 19. Mountzios G, Koumariou A, Bokas A, Mavroudis D, Samantas E, Fergadis EG, et al. A Real-World, Observational, Prospective Study to Assess the Molecular Epidemiology of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations upon Progression on or after First - Line Therapy with a First - or Second - Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor in EGFR Mutation - Positive Locally Advanced or Metastatic Non - Small Cell Lung Cancer: The 'LUNGFUL' Study. *Cancers (Basel).* 2021;13.
 20. Mountzios G, Lampaki S, Koliou GA, Vozikis A, Kontogiorgos I, Papantoniou P, et al. An Observational Study to Assess the Molecular Epidemiology and Direct Medical Costs of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations in Patients with Advanced EGFR Mutation - Positive Non - Small Cell Lung Cancer Treated with Afatinib in Real-World Clinical Settings in Greece. *Lung Cancer (Auckl).* 2021;12:93-102.
 21. Liu Y, Zhang Y, Feng G, Niu Q, Xu S, Yan Y, et al. Comparison of effectiveness and adverse effects of gefitinib, erlotinib and icotinib among patients with non - small cell lung cancer: A network meta - analysis. *Exp Ther Med.* 2017;14:4017-4032.
 22. Jiang H, Zhu M, Li Y, Li Q. Association between EGFR exon 19 or exon 21 mutations and survival rates after first - line EGFR - TKI treatment in patients with non - small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2019;11:301-308.
 23. Krawczyk P, Kowalski DM, Ramlau R, Kalinka-Warzocha E, Winiarczyk K, Stencel K, et al. Comparison of the effectiveness of erlotinib, gefitinib, and afatinib for treatment of non - small cell lung cancer in patients with common and rare EGFR gene mutations. *Oncol Lett.* 2017;13:4433-4444.
 24. Li H, Hu H, Wang R, Pan Y, Wang L, Li Y, et al. Primary concomitant EGFR T790M mutation predicted worse prognosis in non - small cell lung cancer patients. *Oncotargets Ther.* 2014;7:513-24.
 25. Liang H, Pan Z, Wang W, Guo C, Chen D, Zhang J, et al. The alteration of T790M between 19 del and L858R in NSCLC in the course of EGFR-TKIs therapy: a literature - based pooled analysis. *J Thorac Dis.* 2018;10:2311-2320.
 26. Reade CA, Ganti AK. EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: potential role of cetuximab. *Biologics.* 2009;3:215-24.