

MIEJSCE PATOMORFOLOGII W TERAPII CELOWANEJ RAKA PŁUCA

ANNA SZUMERA-CIEĆKIEWICZ, WŁODZIMIERZ T. OLSZEWSKI

1. Ocena czynników predykcyjnych w raku płuca

Postęp w zakresie onkologii klinicznej, w tym w terapii raka niedrobnokomórkowego płuca (NDRP), zapoczątkował poszukiwania czynników predykcyjnych pomocnych w identyfikacji grupy pacjentów mogących odnieść korzyści z leczenia inhibitorami receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR). W terapii celowanej zaawansowanego NDRP, zgodnie z aktualnymi zaleceniami ASCO 2010, można zastosować inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR (EGFR-TKI) – erlotynib lub gefitynib – natomiast w raku nieplaskonabłonkowym – bewacyzumab lub pemetreksed. Pomimo obiecujących wyników badań z przeciwciałem monoklonalnym przeciw EGFR (największe badanie FLEX) [1, 2] – cetuksymabem – w chwili obecnej leczenie to nie zyskało rekomendacji [3, 4].

Poniższe wytyczne odnoszą się do najważniejszych czynników predykcyjnych w NDRP:

- dokładnego określenia typu histologicznego NDRP zarówno w materiale histologicznym, jak i cytologicznym,
- oceny ekspresji białka EGFR,
- określenia liczby kopii genu *EGFR*,
- stwierdzenia mutacji genu *EGFR*,
- wykrycia mutacji genu *KRAS*.

Do dokładnie poznanych czynników predykcyjnych zalicza się również cechy kliniczne – lepszą odpowiedź na leczenie EGFR-TKI stwierdza się u kobiet, osób niepalących i chorych rasy azjatyckiej. Analiza w wyżej wymienionych podgrupach wykazała pośród nich częstsze występowanie gruczolakoraków oraz niemal trzykrotnie zwiększoną liczbę mutacji genu *EGFR*. Fakt ten uzasadnia znamienne lepszą odpowiedź na leczenie u tych pacjentów.

2. Ocena typu histologicznego raka płuca

Przez ostatnie kilkadziesiąt lat w diagnostyce raka płuca wystarczające było stwierdzenie, czy dany nowotwór płuca ma charakter pierwotny czy też przerzutowy, oraz określenie, czy jest to rak drobnokomórkowy czy niedrobnokomórkowy. Terapia NDRP była jednakowa bez względu na typ histologiczny raka płuca. Na wybór leczenia wpływ miał przede wszystkim stopień zaawansowania nowotworu, decydujący o jego operacyjności, natomiast chemioterapia i radioterapia były podobne.

Wprowadzenie terapii celowanej i różnice w odpowiedzi na leczenie (27% w gruczolakorakach *vs* 7% w pozostających

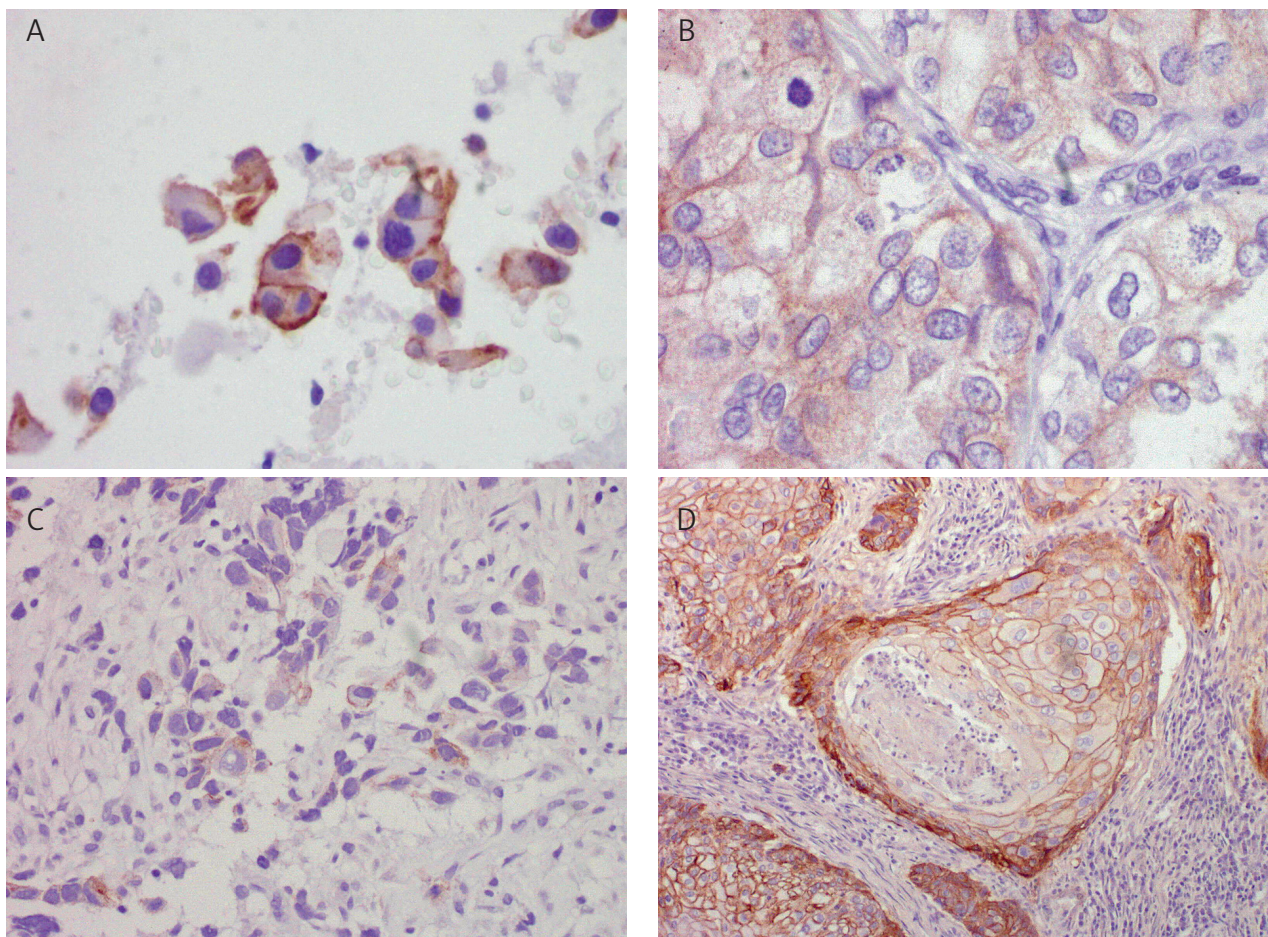
NDRP) [5–7] w poszczególnych typach histologicznych spowodowały konieczność ich dokładnego określenia zarówno w materiale tkankowym, jak i cytologicznym. Ocena typu histologicznego na podstawie wycinków tkankowych, pomimo heterogenności utkania nowotworowego, w zdecydowanej większości jest możliwa. Szczegółowe kryteria oceny przedstawiono w rozdziale *Klasyfikacja histopatologiczna raka płuca*.

Materiał cytologiczny stwarza większe trudności diagnostyczne. Do jego oceny konieczna jest dokładna znajomość kryteriów oraz wykorzystanie immunohistochemii. Zagadnienia te omówiono w rozdziale *Diagnostyka cytologiczna raka płuca*.

3. Ekspresja naskórkowego czynnika wzrostu

Ekspresja białka EGFR oceniana metodą immunohistochemiczną (IHC) była uważana za pierwszy czynnik predykcyjny odpowiedzi na leczenie inhibitorami EGFR. Sukces terapii celowanej w raku piersi, uwzględniającej określony za pomocą IHC status receptorów steroidowych oraz HER2, stał się wzorcem do przeniesienia metody w odniesieniu do ekspresji EGFR w raku jelita grubego i NDRP. Wyniki większości badań nie wykazały jednak ścisłego związku pomiędzy nadekspresją EGFR a kliniczną aktywnością inhibitorów EGFR. Próby ustalenia jednolitej skali oceny ekspresji EGFR, w tym wprowadzenie skali Hybrid-score uwzględniającej intensywność odczynu (0–4) i odsetek wybarwionych komórek (0–100%), jak również dokładne określenie progów odcięcia, nie miały istotnego wpływu na wyodrębnienie grupy pacjentów w kwalifikacji do leczenia [8]. W raku jelita grubego cetuksymab wykazywał aktywność u pacjentów również z immunohistochemicznie EGFR-ujemnym nowotworem [9]. Podobnie w badaniach prospektywnych II fazy z panitumumabem odpowiedź na leczenie nie różniła się znamienne statystycznie w grupach pacjentów z ekspresją wysoką, umiarkowaną lub brakiem ekspresji EGFR [10, 11].

W NDRP nadekspresja EGFR miała niewielki wpływ na różnice w przebiegu leczenia zarówno w badaniu BR.21 (HR = 0,68, *p* = 0,02) [12, 13], jak i w badaniu ISEL z gefitynibem (HR = 0,77, *p* = 0,13) [14]. W badaniu europejskim FLEX [2] u pacjentów z immunohistochemicznie EGFR-dodatnim wynikiem, u których stosowano chemioterapię w połączeniu z cetuksymabem, uzyskano dłuższe przeżycia, natomiast w lustrzanym badaniu na populacji amerykańskiej (BMS/Imclone 099) nie odnotowano różnic w odpowiedzi na leczenie w zależności od poziomu ekspresji EGFR [15].



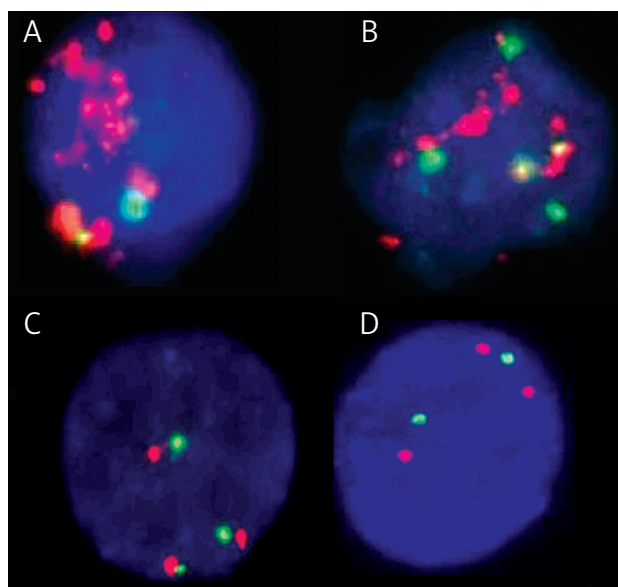
Rycina 1. Immunohistochemiczne oznaczenie EGFR. A – gruczolakorak, cytologia, 3+, 400×; B – gruczolakorak, materiał pooperacyjny, 2+, 400×; C – NDRP NOS, materiał oligobiopsyjny, 2+, 200×; D – płaskonabłonkowy, materiał pooperacyjny, 3+, 200×

Ograniczenia oznaczeń immunohistochemicznych wynikają zarówno z rodzaju, jak i sposobu pobierania materiału [16, 17]. Większość stanowi materiał cytologiczny, który niejednokrotnie jest jedynym dostępnym materiałem pobieranym w celu weryfikacji rozpoznania klinicznego. W trakcie biopsji aspiracyjnej oraz podczas wykonywania rozmazu zwykle błony komórkowe ulegają częściowemu uszkodzeniu. Z tej przyczyny niemożliwa jest wiarygodna ocena ekspresji błonowego odczynu EGFR, a wyniki ujemne mogą być w znacznym odsetku niemiarodajne i w rzeczywistości błędnie ujemne (ryc. 1).

Podsumowując – zgodnie z aktualnymi wynikami zakończonych badań klinicznych w raku jelita grubego oraz płuca immunohistochemiczna ocena EGFR nie jest optymalną metodą identyfikacji chorych, którzy mogą odnieść korzyści z terapii anty-EGFR.

4. Liczba kopii genu *EGFR*

Gen *EGFR* stosunkowo rzadko ulega amplifikacji i metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* – FISH) zwiększoną liczbę kopii genu wraz z polisomią (wynik FISH-dodatni) wykrywa się u 25–40% pacjentów z NDRP, płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi oraz rakiem jelita grubego. Pierwsze obiecujące wyniki uzyskano w badaniu II fazy z gefityni-



Rycina 2. Ocena liczby kopii genu *EGFR* (A, B – wynik dodatni, C, D – wynik ujemny)

bem w zaawansowanym NDRP – u pacjentów z dodatnimi wynikami FISH w porównaniu z chorymi z ujemnymi FISH stwierdzono odpowiednio znacznie wyższe odsetki odpowiedzi na leczenie (36 *vs* 3%), dłuższy czas do progresji choroby (9,0 *vs* 2,5 miesiąca) oraz dłuższe

średnie całkowite przeżycie (18,7 vs 7,0 miesiąca) [18]. W badaniach z randomizacją porównujących wyniki leczenia z zastosowaniem EGFR-TKI lub placebo – BR.21 i ISEL – uzyskano znamienne wyższe odsetki odpowiedzi na leczenie w grupach pacjentów z guzami FISH-dodatnimi, odpowiednio 20 vs 2% oraz 16 vs 3% [14, 17]. W leczeniu przeciwciałem monoklonalnym przeciw EGFR – cetuksymabem – różnice w osiągniętych średnich całkowitych przeżyciach w zależności od wyniku FISH wynoszą 7 vs 15 miesięcy (SWOG) [16]. Mniej spektakularne różnice w całkowitych przeżyciach zaobserwowano podczas chemioterapii zaawansowanego NDRP, w której dodawano lub nie cetuksymab (BMS 099, FLEX) [2, 7, 15]. Bez względu na sposób leczenia w kilku badaniach stwierdzono, że zwiększona liczba kopii genu *EGFR* ma niezależną niekorzystną wartość predykcyjną przebiegu choroby.

Złożonym zagadnieniem jest sposób oceny liczby kopii genu. Wiele sprzeczności w wynikach badań klinicznych było związanych z różnicami w kryteriach oceny i kwalifikacji wyniku jako dodatniego. Obecnie przyjęto kryteria Colorado (*University of Colorado Cancer Center*) (ryc. 2.). Uwzględniają one sześć kategorii bazujących na zwiększającej się liczbie kopii genu *EGFR*. Za wyniki dodatnie przyjmuje się te z: dużą liczbą kopii genu (≥ 4 kopie genu na komórkę w $\geq 40\%$ komórek), amplifikacją genu (skupiska kopii genu i stosunek liczby sygnałów gen/chromosom ≥ 2 na komórkę lub ≥ 15 kopii genu na komórkę w $\geq 10\%$ komórek), natomiast za ujemne: z brakiem lub małą liczbą dodatkowych kopii genu (≥ 4 kopie genu na komórkę w $< 40\%$ komórek) [19, 20].

Ocena liczby kopii genu metodą FISH możliwa jest z materiału pooperacyjnego, oligobiopsji lub cytologii po odwirowaniu i zatopieniu w parafinie (*cell-block*). Na jakość oceny metodą FISH wpływają etapy wstępnej obróbki materiału, m.in. utrwalanie materiału w roztworze zbuforowanej formaliny przez 24–48 godz. Do badań wykorzystywane są niebarwione skrawki parafinowe o grubości 4 μm , naniesione na dodatnio naładowane (silanizowane) szkiełka podstawowe. Tak przygotowane preparaty umieszczane są na noc w cieplarni w temperaturze 65°C w celu mocniejszego przytwierdzenia skrawka do podłoża. Do identyfikacji obszarów roboczych na preparatach używa się skrawków zabarwionych hematoxyliną-eozyną (HE). Kolejne etapy są przeprowadzane zgodnie z zaleceniami producenta zestawu do oznaczania genu *EGFR*, a kryteria oceny wyników zgodne z rekomendacjami Colorado.

5. Ocena statusu genu *EGFR*

Aktualnie leczenie ukierunkowane na EGFR stosuje się u pacjentów z zaawansowanym i przerzutowym niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Odkrycie mutacji *EGFR* miało duży wpływ na podjęcie intensywnych badań nad rolą tych mutacji w patogenezie choroby, rokowaniu i wrażliwości na leczenie. Dotychczas wyodrębniono szereg mutacji somatycznych w domenie kinazowej *EGFR*, lecz ponad 90% z nich dotyczy eksonów 18, 19, 20 i 21 [21]. W kilku niezależnych grupach

badawczych potwierdzono, że częstość występowania mutacji *EGFR* pozostaje w ścisłym związku z takimi cechami klinicznymi, jak rasa (10–20% u pacjentów ze Stanów Zjednoczonych i Europy vs 30–60% z Azji), płeć żeńska, niepalenie tytoniu i typ histologiczny (najczęstsze w gruczolakorakach) [22, 23]. Występowanie powyższych cech w wielu badaniach klinicznych było silnie związane z wrażliwością na EGFR-TKI, gefitynib i erlotynib, oraz z bardzo dobrą odpowiedzią na stosowanie tych leków zarówno w pierwszej, jak i drugiej linii chemioterapii [24–26]. Najnowsze wytyczne ASCO i ESMO z 2010 r. dotyczące terapii celowanej w NDRP jednoznacznie wskazują, że obecność jednej z somatycznych mutacji aktywujących *EGFR* należy uznać za najbardziej wiarygodny czynnik predykcyjny odpowiedzi na leczenie EGFR-TKI [3, 4, 27, 28]. Obowiązującym kryterium podania gefitynibu lub erlotynibu w monoterapii, w tym również w pierwszej linii chemioterapii, oprócz oceny stanu klinicznego pacjenta jest zatem stwierdzenie mutacji *EGFR*. Wyniki badań klinicznych z użyciem cetuksymabu, monoklonalnego przeciwciała skierowanego przeciw EGFR, świadczą natomiast o jego niewielkim wpływie na poprawę wskaźników odpowiedzi na leczenie, w tym wydłużenie czasu przeżycia całkowitego [2, 15].

5.1. Przygotowanie materiału biologicznego do oceny statusu genu *EGFR*

Materiał biologiczny do oceny mutacji genu *EGFR* obejmuje materiał cytologiczny utrwalony lub świeży, pobierany metodą biopsji transtorakalnej pod kontrolą tomografii komputerowej, przezoskrzelowych wymazów szczoteczkowych, przezoskrzelowej aspiracyjnej biopsji cienkoigłowej pod kontrolą ultrasonografii, materiał tkankowy oligobiopsyjny (wycinek pobierany podczas bronchoskopii) i pooperacyjny.

Bez względu na sposób uzyskania i typ materiału cytologicznego lub histologicznego obligatoryjne kryteria kwalifikacji do wykonania oznaczenia statusu genu *EGFR* obejmują:

- typ histologiczny – wyłącznie gruczolakorak i NDRP *not otherwise specified* (NOS), bez raka płaskonabłokowego,
- ilość materiału diagnostycznego – preparaty muszą zawierać nie mniej niż 50% utkania nowotworowego lub 50% komórek w przypadku rozmazu cytologicznego.

5.1.1. Przygotowanie materiału tkankowego pooperacyjnego i oligobiopsyjnego

Materiał tkankowy pooperacyjny i oligobiopsyjny wymaga:

- utrwalenia w 10-procentowej zbuforowanej formalinie (4-procentowy roztwór wodny aldehydu mrówkowego zbuforowany do pH = 7,2) przez 24–48 godz.,
- pobrania wycinków z guza i zatopienia w bloczkach parafinowych,
- oceny histopatologicznej z ustaleniem rozpoznania,
- wyboru odpowiedniego bloczka parafinowego,

- skrojenia bloku parafinowego z wybranym wycinkiem do próbki PCR,
- przekazania do pracowni biologii molekularnej.

Jeśli znaczną część bloczka stanowi utkanie nienowotworowe, należy wyciąć ten fragment i przetopić bloczek tak, by uzyskać jak największy odsetek utkania nowotworowego w materiale (makrodysekcja). Idealnym rozwiązaniem jest wykonanie mikrodysekcji, tzn. wycięcie wiązką lasera pod kontrolą mikroskopową fragmentu zawierającego utkanie nowotworowe. W chwili obecnej metoda ta nie jest powszechnie dostępna.

5.1.2. Przygotowanie materiału cytologicznego utrwalonego

Materiał cytologiczny utrwalony wymaga:

- standardowego wykonania preparatów barwionych HE,
- wybrania reprezentatywnego rozmazu,
- odklejenia szkiełka nakrywkowego w ksylenie,
- „zeszkrobania” materiału komórkowego ze szkiełka podstawowego za pomocą sterylnego skalpela do próbki PCR zawierającej nośnik, zgodnie z instrukcjami producenta,
- przekazania do pracowni biologii molekularnej maksymalnie do 48 godz. od „zeszkrobania”.

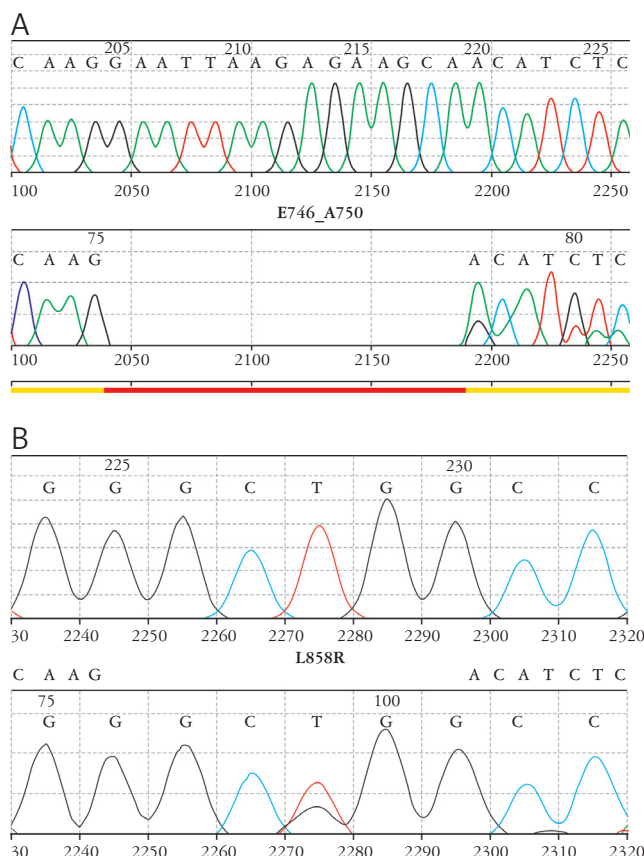
5.1.3. Przygotowanie materiału cytologicznego świeżego

Materiał cytologiczny świeży wymaga:

- wykonania z tego samego nakłucia co najmniej dwóch rozmazów cytologicznych, które rutynowo poddawane są utrwaleniu, oraz pobrania pozostałego materiału „w igłę” do próbki PCR zawierającej nośnik, zgodnie z instrukcjami producenta,
- przechowywania w lodówce w temperaturze 2–8°C, maksymalnie przez 48 godz.; jeśli materiał ma być przechowywany dłużej, należy go zamrozić (temperatura poniżej –10°C),
- potwierdzenia rozpoznania histopatologicznego z rozmazów utrwalonych,
- przekazania zabezpieczonego materiału do pracowni biologii molekularnej.

6. Metodyka oceny statusu genu *EGFR*

Ocena statusu genu *EGFR* wymaga izolacji DNA oraz oznaczenia mutacji. W wyniku procedury walidacyjnej przyjęto odpowiednie metody izolacji DNA. Ze względu na pochodzenie większości materiału (materiał tkankowy pooperacyjny, utrwalony w blokach parafinowych) do izolacji stosowany jest zestaw ze zmodyfikowaną procedurą izolacji materiału zatopionego w parafinie. Stężenie otrzymanego DNA mierzone jest na spektrofotometrze, czystość DNA jest sprawdzana przez badanie stosunku absorbancji przy $\gamma = 260$ i 280 nm. W zależności od wyjściowej ilości tkanki otrzymuje się od kilku do kilkudziesięciu μg DNA. Współczynnik czystości A260/A280 otrzymanego DNA mieści się między 1,8 a 2,0. Do oceny mutacji genu *EGFR* opracowano procedury uwzględniające wykorzystanie technologii bezpośredniego sekwencjonowania DNA. Metodyka jest zoptymalizowana do analizy DNA pochodzącego z bloków parafinowych (poddegradowane DNA). W badanych preparatach oceniany jest ekson 18, 19, 20 i 21 genu *EGFR* (ryc. 3.).



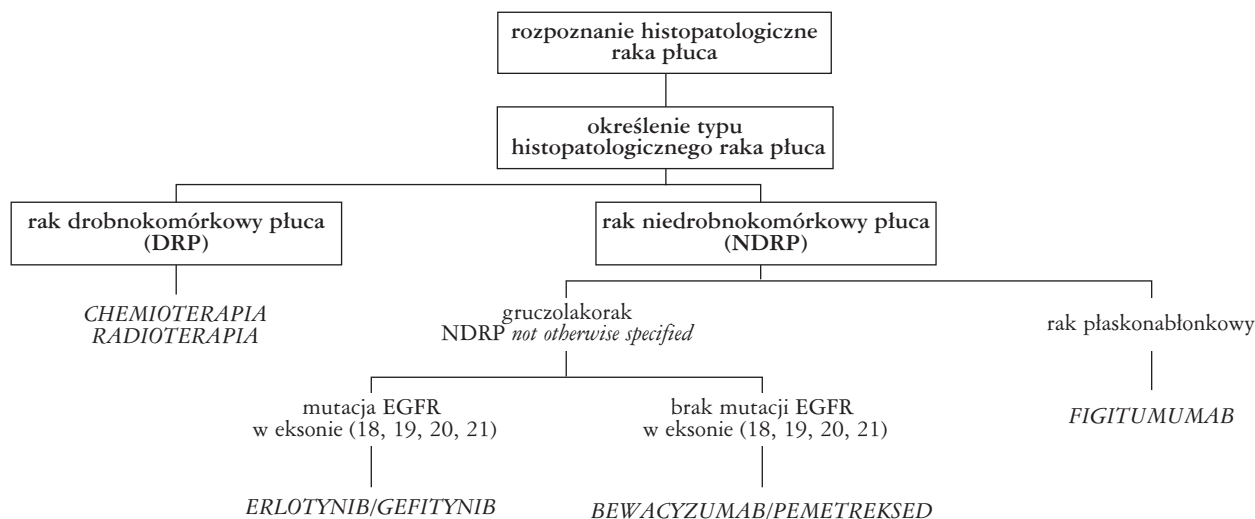
Rycina 3. Najczęstsze typy mutacji w genie (delecja E746_A750 i mutacja L858R)

7. Interpretacja wyników

Występowanie somatycznych mutacji aktywujących w jednym z ocenianych eksonów (18, 19, 20 i 21) genu *EGFR* stanowi molekularne potwierdzenie zasadności podania inhibitora kinaz tyrozynowych. Brak mutacji genu *EGFR* wymaga indywidualnego rozważenia potencjalnych korzyści dla pacjenta z leczenia wg alternatywnych schematów terapeutycznych (ryc. 4.).

8. Ocena mutacji *KRAS*

Szlak RAS-RAF-MEK uczestniczy w przekazywaniu sygnałów „poniżej” *EGFR*, jak również w innych szlakach prowadzących do rozrostu komórek nowotworowych. Aktywujące mutacje *KRAS* występują w niedrobnokomórkowym raku płuca (głównie gruczolakorakach), praktycznie nigdy nie współistnieją z mutacjami w kinazowych domenach *EGFR* i *HER2* oraz towarzyszą oporności na leczenie inhibitorami *EGFR* [29–31]. Większość mutacji *KRAS* w raku gruczolowym płuca to wywoływane paleniem tytoniu transwersje G na T (substytucja puryny za pirymidynę) w eksonie 12 (u 90% chorych) lub eksonie 13 [32]. Odrębny profil mutacji *KRAS*, na który składają się mutacje prowadzące do tranzycji G na A, wykryto niedawno u chorych na raka gruczolowego, którzy nigdy nie palili tytoniu, ale jego znaczenie czynnościowe pozostaje nadal nieznanne [33]. Aktualne rekomendacje ASCO i ESMO z 2010 r. nie zalecają rutynowo



Rycina 4. Algorytm diagnostyczno-terapeutyczny w raku płuca

wej oceny mutacji *KRAS* celem kwalifikacji chorych do leczenia celowanego.

Podziękowania dla prof. dr. hab. n. med. Janusza Siedleckiego i mgr. inż. Andrzeja Tysarowskiego z Zakładu Biologii Molekularnej Centrum Onkologii – Instytutu w Warszawie za pomoc w opracowaniu tych zaleceń.

Piśmiennictwo

- Herbst RS, Hirsch FR. Patient selection criteria and the FLEX Study. *Lancet* 2009; 373: 1497-1498.
- Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009; 373: 1525-1531.
- Azzoli CG, Giaccone G, Temin S. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Oncol Pract* 2010; 6: 39-43.
- Campbell L, Blackhall F, Thatcher N. Gefitinib for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 1343-1357.
- Suzuki R, Hasegawa Y, Baba K, et al. A phase II study of single-agent gefitinib as first-line therapy in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 1599-1603.
- Li AR, Chitale D, Riely GJ, et al. EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J Mol Diagn* 2008; 10: 242-248.
- Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1472-1478.
- Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N, Mann H, Watkins C, Parums DV, et al. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2008; 112: 1114-1121.
- Galizia G, Lieto E, De Vita F, et al. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3654-3660.
- Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, et al. A randomized phase III trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 672-680.
- Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2205-2213.
- Clark GM, Zborowski DM, Santabarbara P, et al. Smoking history and epidermal growth factor receptor expression as predictors of survival benefit from erlotinib for patients with non-small-cell lung cancer in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR.21. *Clin Lung Cancer* 2006; 7: 389-394.
- Florescu M, Hasan B, Seymour L, et al.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. A clinical prognostic index for patients treated with erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR.21. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 590-598.
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 133-144.
- Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, et al. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol* 2010; 28: 911-917.
- Dziadziuszko R, Holm B, Skov BG, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Ann Oncol* 2007; 18: 447-452.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5034-5042.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-655.
- Varella-Garcia M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol* 2006; 1: 19.
- Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, et al. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2009; 62: 970-977.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169-181.
- Toyooka S, Takano T, Kosaka T, et al. Epidermal growth factor receptor mutation, but not sex and smoking, is independently associated with favorable prognosis of gefitinib-treated patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2008; 99: 303-308.

23. Amann J, Kalyankrishna S, Massion PP, et al. Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 226-235.
24. Sequist LV, Joshi VA, Janne PA, et al. Epidermal growth factor receptor mutation testing in the care of lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (14 Pt 2): 4403s-4408s.
25. Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8081-8092.
26. Haber DA, Bell DW, Sordella R, et al. Molecular targeted therapy of lung cancer: EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 419-426.
27. D'Addario G, Fruh M, Reck M, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v116-v119.
28. Crino L, Weder W, van Meerbeeck J, et al. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v103-v115.
29. Benesova L, Minarik M, Jancarikova D, et al. Multiplicity of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Anti-cancer Res* 2010; 30: 1667-1671.
30. Cortot AB, Italiano A, Burel-Vandenbos F, et al. KRAS mutation status in primary nonsmall cell lung cancer and matched metastases. *Cancer* 2010; 116: 2682-2687.
31. Liu HP, Isaac Wu HD, Chang JW, et al. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor and KRAS gene mutations and epidermal growth factor receptor gene copy numbers in patients with surgically resectable non-small cell lung cancer in Taiwan. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1175-1184.
32. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor 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* 2005; 23: 5900-5909.
33. Gautschi O, Huegli B, Ziegler A, et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett* 2007; 254: 265-273.