

## ارزیابی فراوانی جهش‌های ژن KRAS در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۵ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۴ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۸/۲۵

**زمینه و هدف:** ژن Kirsten rat sarcoma (KRAS) به عنوان هدف در تغییرات ژنتیکی بیماران مبتلا به سرطان کولون تحت درمان با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی مثل ستوکسیماب و پانتوموماب می‌باشد. جهش در KRAS در ۳۵ تا ۴۲٪ بیماران مبتلا مشاهده می‌شود. فراوانی بالای این جهش‌ها و بروز سریع‌شان در سرطان کولون نشان‌دهنده پتانسیل بالای آن‌ها به عنوان یک بیومارکر جهت آشکار سازی زودرس می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی فراوانی جهش در ژن KRAS در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۵۰ بلوک پارافینه بیمارانی که از نقاط مختلف کشور در سال ۱۳۹۴ به آزمایشگاه پیوند تهران مراجعه کرده بودند و دارای تایید ایمنوهیستوشیمی و هیستوپاتولوژی ابتلا به سرطان کولورکتال بودند، انجام شد. پس از استخراج DNA از بلوک‌های بافتی و بررسی کیفی DNA استخراج شده جهش‌های ژن KRAS، با روش لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس (Reverse dot blotting) ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** جهش در ژن KRAS در ۴۲٪ از بیماران مورد مطالعه یافت شد. بیشترین جهش مربوط به کدون ۱۲ با ۳۰٪ و سپس در کدون ۱۳ با ۱۲٪ بود. در کدون ۶۱ هیچ جهشی یافت نگردید. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین تعداد نمونه‌های بلوک‌های پارافینه مورد بررسی متعلق به بیماران مرد مبتلا به سرطان کولورکتال با میزان ۶۸٪ (میانگین سنی ۵۶ سال) بوده، در حالی که تعداد کمتری از نمونه‌های مورد بررسی متعلق به بیماران زن با میزان ۳۲٪ (میانگین سنی ۵۴/۸ سال) بوده است.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج مطالعه، فراوانی جهش در ژن KRAS در بین جمعیت ایرانی با مقادیر گزارش شده در سایر کشورها همخوانی دارد.

**کلمات کلیدی:** KRAS، سرطان کولورکتال، روش لکه‌گذاری نقطه‌ای معکوس.

فاطمه رودباری<sup>۱</sup>، بهزاد پوپک<sup>۲\*</sup>

فاطمه شیخ سفلی<sup>۳</sup>، مجتبی قدیانی<sup>۴</sup>

۱- گروه ویروس‌شناسی، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران.

۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی،

دانشگاه مازندران، مازندران، ایران.

۴- گروه هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم

پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، خیابان شریعی، خیابان خاقانی، کد پستی: ۱۹۳۹۵/۱۴۹۵.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۲۶۴۱۴۴

E-mail: bpoopak@gmail.com

### مقدمه

انواع تومورهای مختلف تغییر می‌کنند و توضیح نقش این ژن‌ها در سرطان‌زایی کمک‌کننده است. یکی از تغییرات ژنتیکی مختلف، که هدف مولکولی مهمی جهت درمان سرطان کولورکتال می‌باشد، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی Epidermal growth factor receptor (EGFR) است.<sup>۱</sup> Kirsten rat sarcoma (KRAS) یکی از مهم‌ترین مولکول‌ها در پایین دست مسیر سیگنالینگ گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است. سه ژن RAS انسانی NRAS، KRAS، HRAS شناخته

سرطان کولورکتال، بیماری هتروژن چند مرحله‌ای است که در نتیجه مجموعه‌ای از تغییرات ژنتیکی، ناهنجاری‌های کروموزومی، جهش‌های ژنی و تغییرات اپی‌ژنتیکی ایجاد می‌شود.<sup>۲</sup> تغییرات در ژنوم سلولی متاثر از بیان یا عملکرد ژن‌های کنترل‌کننده رشد سلولی و تمایز می‌باشند. بررسی مولکولی سرطان در شناسایی ژن‌هایی که در

طبی و تخصصی پیوند شهر تهران در سال ۱۳۹۲ انجام شده است، ۵۰ بلوک بافتی پارافینه مربوط به بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با میانگین سنی ۵۶/۹۶ سال (۳۴ مورد مرد و ۱۶ مورد زن) بررسی شد، گزینش این بیماران به صورت تصادفی از نقاط مختلف کشور انجام شد.

جهت بررسی جهش‌های این بلوک‌های بافتی ابتدا استخراج DNA این نمونه‌ها انجام شد، به همین منظور از بلوک‌های بافتی پارافینه و فیکس شده با فرمالین، ابتدا از تطبیق شماره بلوک بافتی با مشخصات بلوک موجود در برگه پاتولوژی اطمینان حاصل شد و سپس با تیغ بیستوری برش‌هایی از بافت تهیه گردید. ابتدا لازم بود تا از بلوک‌های بافتی پارافین‌زدایی صورت گیرد و سپس بافت‌های برش زده شده، لیز شوند و استخراج از این محلول لیز شده انجام شود. در این استخراج از روش استخراج ستونی استفاده شد.

استخراج بلوک‌های بافتی پارافینه با اندکی تغییر، بر اساس پروتکل کیت ژنومیک High Pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) انجام شد. درجه تخلیص DNA مورد نظر با تعیین نسبت جذب نوری OD 260 / OD 280 و غلظت آن با استفاده از فرمول  $50 \times P \times OD260 = \mu g/ml$  (P درجه رقت DNA توسط Spectrophotometer (Biophotometer, Eppendorff, Hamburg, Germany) محاسبه شد و برای اطمینان از سلامت DNA (عدم قطعه‌قطعه شدن (Fragmentation) و اکشن زنجیره پلیمرازی با یک ژن رایج مثل  $\beta$ -گلوبین انجام شد. DNA هایی که در مراحل کنترل کیفی مناسب نبودند از ارزیابی حذف شدند.

در این پژوهش از روش Reverse dot blotting جهت بررسی فراوانی جهش‌های انکوژن KRAS استفاده شد. این روش توانایی آشکارسازی بیشتر جهش‌های سوماتیک در انکوژن KRAS به وسیله PCR و یک واکنش هیبریداسیون را دارد.

ابتدا یک PCR (در جدول ۱ شرایط دمایی نشان شده است) با استفاده از DNA استخراج شده از بافت انجام شد. در این واکنش دو قطعه ژن که شامل دو KRAS (اگزون ۱ و ۲ برای کدون ۱۲، ۱۳، ۶۱) می‌باشند، در Multiplex PCR با پرایمرهای اختصاصی نشاندار شده با بیوتین تکثیر می‌یابند. قطعات ژنی تکثیر شده سپس در یک واکنش هیبریداسیون با پروب‌های الیگونوکلئوتیدی Sequence-specific

شده است که پروتیین‌های کوچک اتصال GTP-GDP می‌باشند و به عنوان سویچ‌های عملکردی از طریق جفت شدن گیرنده‌های رشد به مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی عمل می‌کنند.<sup>۳-۵</sup> KRAS پروتئین کدون ۲۱ کیلودالتونی متصل شده به گوانوزین تری فسفات/گوانوزین دی فسفات جای گرفته در روی بازوی کوچک کروموزوم ۱۲ در موقعیت ۱۲.۱ است که در غشای داخل سلول قرار دارد و در انتقال سیگنال‌های میتوژنیک و تنظیم پاسخ‌های سلولی به تحریکات (Signal) خارج سلولی مثل فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها و هورمون‌ها نقش زیادی دارد.<sup>۶</sup> همانند سایر G پروتیین‌ها، چرخه RAS بین فرم غیرفعال متصل به GDP و فرم فعال متصل به GTP می‌چرخد. در حالت غیرفعال، RAS به فرم متصل به GDP وجود دارد.<sup>۷</sup> جهش در KRAS منجر به از بین رفتن فعالیت GTPase و همچنین فعال شدن مسیر سیگنالینگ RAS/RAF در ۳۵ تا ۴۲٪ بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می‌گردد،<sup>۹،۱۰</sup> فراوانی بالای این جهش‌ها و بروز سریع‌شان در سرطان کولون نشان‌دهنده پتانسیل بالای آن به عنوان یک بیومارکر جهت آشکارسازی زودرس می‌باشد.<sup>۱۱</sup> جهش‌های BRAF در ۷۰-۳۴٪ سرطان کولورکتال پراکنده با ناپایداری میکروستلایت بالا (MSI-H) رخ می‌دهد، در حالی که جهش‌های KRAS در تومورهای با ناپایداری میکروستلایت پایین (MSI-L) یا میکروستلایت پایدار (MSS) متداول‌تر می‌باشند.<sup>۱۱</sup> جهش‌های بد معنی (Missense) سوماتیک در ژن KRAS باعث جایگزینی یک آمینواسید شده و به طور کلی مستقل از جهش‌های ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است. این جهش‌های نقطه‌ای و فعال بودن پیوسته پروتیین RAS منجر به تحریک مداوم تکثیر سلولی می‌گردند.<sup>۷</sup> به نظر می‌رسد جهش‌های KRAS در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ نقش مهمی را در پیشرفت سرطان روده بزرگ و راست روده بازی می‌کنند. در حالی که جهش در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ بیومارکرهای بالقوه‌ای در سرطان ریه می‌باشند<sup>۱۲</sup> هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی فراوانی جهش‌های انکوژن KRAS در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولورکتال بود.

## روش بررسی

در این مطالعه که به صورت مقطعی و در آزمایشگاه تشخیص

جدول ۱: شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

دما	مدت زمان	تعداد سیکل	
۹۵ °C	۵ دقیقه	۱	دنا تراسیون اولیه
۹۵ °C	۲۰ ثانیه	۱۰	
۶۰ °C	۲۰ ثانیه		
۹۵ °C	۲۰ ثانیه	۲۶	تکثیر
۵۵ °C	۲۰ ثانیه		
۷۲ °C	۲۰ ثانیه		
۷۲ °C	۸ دقیقه	۱	تکثیر نهایی

جهش ژن KRAS با روش Reverse dot blotting آورده شده است. بیشترین تعداد نمونه‌های بلوک‌های پارافینه مورد بررسی متعلق به بیماران مرد ۶۸٪ (با میانگین سنی ۵۶ سال) بوده، در حالی که تعداد کمتری از نمونه‌های مورد بررسی متعلق به بیماران زن ۳۲٪ (با میانگین سنی ۵۴/۸ سال) بوده است. نتایج مطالعه نشان داد که ۱۵ نفر (۳۰٪) از بیماران مورد مطالعه در کدون ۱۲ ژن KRAS دارای جهش بودند، در حالی که، شش نفر (۱۲٪) از بیماران در کدون ۱۳ جهش داشتند.

همچنین نشان داده شد که فراوانی این جهش‌ها در بیماران مرد مبتلا به سرطان کولورکتال بالاتر از بیماران زن بوده است. تقریباً ۸۱٪ جهش‌ها در بیماران مرد یافت شد که ۱۲ مورد (۲۴٪) از آن‌ها دارای جهش در کدون ۱۲ و پنج مورد (۱۰٪) از آن‌ها دارای جهش در کدون ۱۳ بودند.

باقی جهش‌های یافت شده در بیماران زن مشاهده گردید که سه مورد (۶٪) از آن‌ها در کدون ۱۲ و یکی از آن‌ها (۲٪) در کدون ۱۳ بود. نتایج نشان داد که هیچ کدام از بیماران به طور همزمان در کدون‌های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ دارای جهش نبودند. در زنان دارای جهش در ژن KRAS میانگین سن تشخیص نسبت به زنان فاقد جهش در این ژن کمتر بوده و این در حالی است که در مردان دارای جهش در ژن KRAS میانگین سن تشخیص نسبت به مردان فاقد جهش بیشتر بوده است

در مطالعه حاضر، از ۵۰ نمونه مورد مطالعه ۴۵ نمونه مربوط به بافت‌های سکوم، کولون و رکتوم درگیر با سرطان کولورکتال بودند. در حالی که پنج نمونه دیگر دارای بافت متاستاتیک کبد با منشأ سرطان کولورکتال بوده‌اند.

در کدون ۱۲ توالی طبیعی GGT، در اثر جهش‌های ترنزیشن و ترنسورژن، این توالی به فرم جهش‌یافته در می‌آید که در این مطالعه مشخص شد که ۱۵ بیمار (۳۰٪) دارای این جهش بودند که از این بین ۲٪ دارای جهش G12A، ۱۶٪ دارای جهش G12D، ۲٪ دارای جهش G12C، ۴٪ دارای جهش G12S و ۶٪ دارای جهش G12V بودند. در صورتی که وجود جهش در کدون ۱۳ ژن KRAS (توالی طبیعی GGC) در شش بیمار (۱۲٪) گزارش شد که دارای جهش G13D بودند. همچنین در این پژوهش هیچ جهشی در کدون ۶۱ (نوع طبیعی CAA) یافت نشد.

oligonucleotide probes (SSOP) دارای توالی اختصاصی که بر روی نوآرهای نیتروسولوزی تثبیت شده (Reverse hybridization) مشخص می‌شوند. هر نوآر نیتروسولوزی دارای دو پروب ژنی برای نوع طبیعی قطعات و ده پروب برای جهش‌های KRAS می‌باشد. دو باند اضافی دیگر نواحی کنترل می‌باشند.

در طی هیبریداسیون، DNA تکثیر شده دنا توره شده به پروب‌های ژنی نوآرها اتصال می‌یابد. سپس به وسیله یک واکنش رنگی باندها آشکار می‌گردد. الگوهای باندها می‌توانند با استفاده از برگه ارزیابی آنالیز شوند.

پردازش داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) صورت گرفت. همچنین جهت بررسی توزیع متغیرها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد که  $P < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

مطالعه مقدماتی بر اساس پرسشنامه مشخصات از ۵۰ مراجعه کننده نشان داد که این بیماران از نقاط مختلف کشور مراجعه کرده بودند و تنها به استان تهران محدود نمی‌شدند.

در این پژوهش فراوانی جهش‌های انکوژن KRAS در جمعیتی از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با میانگین سنی ۵۶/۹۶، ۴۲٪ (۳۰٪) در کدون ۱۲ و ۱۲٪ (در کدون ۱۳) یافت شد. بررسی جهش‌های این دو انکوژن بر روی بلوک‌های بافتی پارافینه بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد و در شکل ۱ توضیح کوتاهی از نحوه بررسی

جدول ۲: جدول کلموگروف اسمیرنوف: جهت بررسی توزیع متغیرها از این آزمون استفاده شد. تمام ابعاد بررسی شد و نتایج بررسی در جدول زیر آمده است.

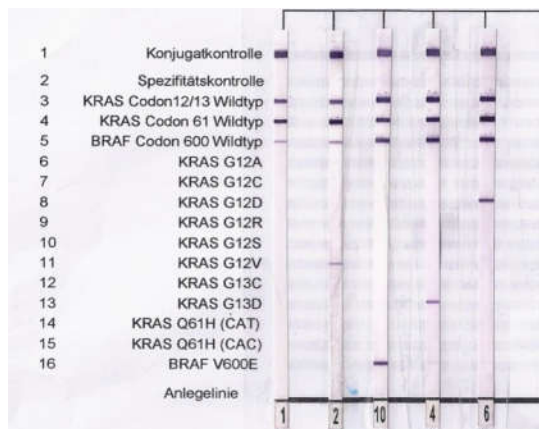
تعداد	میانگین	کولموگوروف-اسمیرنوف	p
۵۰	۵۶/۹۶	۰/۸۰۴	۰/۵۳۸
۵۰	-	۰/۰۵۱	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۳	۳/۱۲۲	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۱۲	۳/۶۹۶	۰/۰۰۰
۵۰	۰	۰	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۱۶	۳/۸۵۶	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۶	۳/۸۱۰	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۰۲	۳/۷۹۲	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۰۴	۳/۸۱۹	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۰۲	۳/۷۹۲	۰/۰۰۰
۵۰	۰/۱۲	۳/۶۹۶	۰/۰۰۰

\*  $P > 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

برابر (۳۰٪ در کدون ۱۲ و ۱۲٪ در کدون ۱۳) بود. بررسی جهش‌های این دو انکوژن بر روی بلوک‌های بافتی پارافینه بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد.

در مطالعه‌ای که Schimanski و همکاران بر روی ۱۴۶ نمونه از بیماران انجام دادند، با اینکه تعداد بیماران زن مورد بررسی نسبت به مردان کمتر بوده است، ۴۴٪ از بیماران مرد دارای جهش و ۵۶٪ از بیماران زن دارای جهش در انکوژن KRAS بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین سنی بیماران زن دارای جهش نسبت به بیماران فاقد جهش بیشتر بوده است. ۴۰٪ بیماران دارای جهش در کدون ۱۲ و ۶٪ از بیماران دارای جهش در کدون ۱۳ گزارش شده‌اند. در این مطالعه تنها کدون‌های ۱۲ و ۱۳ مورد بررسی قرار گرفته بودند.<sup>۱۳</sup>

همچنین در مطالعه دیگری که توسط Kumar و همکارانش انجام شده است، بیشتر بیماران مورد مطالعه زن بوده‌اند و در این مطالعه ۳۰/۹٪ بیماران، دارای جهش در انکوژن KRAS بوده‌اند.<sup>۱۴</sup> همچنین در مطالعه Ince و همکاران که بر روی ۲۶۷ بیمار دارای سرطان کولورکتال صورت گرفته است، در کدون ۱۲ فراوانی جهش‌ها نسبت به کدون ۱۳ بیشتر بوده است.<sup>۱۵</sup> در مطالعه Velho و همکاران، ۳۵/۳٪ بیماران دارای جهش در انکوژن KRAS بوده‌اند،<sup>۱۶</sup> Brink و همکاران در مجموع، فراوانی جهش انکوژن KRAS را در ۷۳۷ نمونه از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (سن تشخیص بین ۵۷ و ۷۶ سال بود)



شکل ۱: نوارهای نیتروسولوزی حاصل از روش **Reverse dot blotting**: هر نوار نیتروسولوزی دارای دو پروب ژنی برای نوع طبیعی قطعات و ده پروب برای جهش‌های KRAS می‌باشد. دو باند اضافی دیگر نواحی کنترل می‌باشند و در صورت وجود جهش DNA تکثیر شده به پروب همان جهش متصل می‌گردد و پس از واکنش رنگدایی باند مربوط به جهش نمایان می‌گردد. در این شکل اولین و سومین نوار فاقد جهش در ژن KRAS می‌باشند در حالی که در نوار دوم جهش G12V و در نوار چهارم جهش G13D و در نوار پنجم جهش G12D وجود دارد.

## بحث

در این پژوهش، فراوانی جهش‌های انکوژن KRAS در جمعیتی از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با میانگین سنی ۵۶/۹۶، ۴۲٪

۷ و ۱ مورد جهش در کدون‌های ۶۱ و ۱۴۶ ژن KRAS یافت شد. در این بررسی این نتیجه‌گیری حاصل شد که جهش‌های کدون ۶۱ و ۱۴۶ هم مقاومت دارویی به ستوکسیماب (Cetuximab) و ایرینوتکان (Irinotecan) را پیش‌بینی می‌کنند.<sup>۳۳</sup>

همان‌طور که مشاهده شد، بیشترین فراوانی جهش‌ها مربوط به کدون ۱۲ و سپس ۱۳ می‌باشد، اگرچه که جهش در کدون‌های ۶۱ و ۱۴۶ همچون کدون‌های ۱۲ و ۱۳ نقش پیش‌آگهی‌دهنده در درمان بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال دارند ولی فراوانی این جهش‌ها بسیار پایین است، که با نتایج مطالعه حاضر در مورد فراوانی بالای بروز جهش در کدون ۱۲ و همچنین فراوانی پایین بروز جهش در کدون ۶۱ همخوانی دارند.

فراوانی جهش ژن KRAS در بیماران سرطان کولورکتال گزارش شده در مقالات مختلف، تقریباً در حدود ۳۰ تا ۴۶٪ بوده است. به گفته Brink این طیف گسترده‌ای از فراوانی‌های گزارش شده از جهش KRAS ممکن است، به دلیل عوامل مختلف، از جمله حساسیت و ویژگی روش‌های تشخیص جهش، سری کوچکی از بیماران و یا تنوع در منطقه ژن مورد تجزیه و تحلیل انتخاب شده، یعنی تنها کدون‌های ۱۲، ۱۳ و / یا ۶۱ باشد.<sup>۲</sup> همچنین، عوامل محیطی ممکن است در این امر نقش داشته باشند. تکنیک‌های مورد استفاده برای غربالگری جهش مانند الکتروفورز ژل گرادیانت دمایی یا SSCP و روش‌هایی برای تشخیص جهش مانند PCR-RFLP و یا مبتنی بر Mutant allele-specific PCR amplification (MASA) تفاوت در حساسیت و / یا ویژگی تشخیص جهش در ژن KRAS را نشان دهند. در مطالعه Brink، تجزیه و تحلیل جهش KRAS با یک روش تشخیص بسیار حساس و اختصاصی، یعنی توالی‌یابی مستقیم قطعات PCR انجام شده بود. به گفته وی به دلیل این تفاوت‌ها، فراوانی گزارش شده از جهش KRAS ممکن است به درستی تخمین زده نشود.<sup>۲</sup>

مطالعه‌ای که در ایران با هدف بررسی سازگاری جهش‌های KRAS در مقایسه با MSI در بافت‌های پولیپ و کارسینومای کولورکتال انجام شد، نشان داد که جهش‌ها در تومورها به طور کامل با الگوی جهش‌ها در پولیپ‌ها سازگاری ندارد،<sup>۲۴</sup> در حالی که در مطالعه حاضر تنها به بررسی وجود جهش در ژن KRAS بدون بررسی ارتباط با MSI پرداخته شده است، در مطالعات آینده بررسی

گزارش کردند.<sup>۲</sup> در مطالعه‌ای که Chang و همکاران بر روی ۲۲۸ نمونه انجام دادند، ۳۶٪ بیماران دارای جهش در انکوژن KRAS بودند که در این مطالعه جهش‌های کدون ۶۱، ۱۳، ۱۲ و همچنین ۱۴۶ مورد بررسی قرار گرفتند و بالاترین شیوع جهش‌ها به ترتیب در کدون‌های ۱۲، ۱۳، ۱۴۶، ۶۱ یافت شد که جهش G به A بیشترین فراوانی را داشته و تنها یک مورد جهش در کدون ۶۱ و سه مورد جهش در کدون ۱۴۶ یافت شد.<sup>۱۷</sup>

در مطالعه‌ای که Li و همکارانش بر روی ۷۸ بیمار دارای سرطان کولورکتال انجام داده‌اند، بیماران مرد نسبت به زن بیشتر بوده است و جهش در ژن KRAS در بیماران مرد نیز فراوانی بیشتری داشت. در این مطالعه فراوانی جهش KRAS ۳۳/۳٪ گزارش شد، که بیشترین فراوانی مربوط به کدون ۱۲ این ژن بود.<sup>۱۸</sup>

در مطالعاتی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند، نشان داده شد که در اکثر آن‌ها سن تشخیص بیماری سرطان بالای ۶۱ سال بود، که البته در مطالعه Chang سن تشخیص به طور میانگین ۴۹ سال بیان شده بود،<sup>۱۷-۲۲</sup> این در حالی است که میانگین سن تشخیص بیماران ایرانی مورد مطالعه ۵۶/۹ سال می‌باشد که بیان‌کننده بروز سرطان کولورکتال در سنین پایین نسبت به سایر کشورها می‌باشد و این موضوع نیاز به ریشه‌یابی و علت‌شناسی دارد.

در مطالعه Richman و همکارانش بر روی ۷۱۱ نمونه، فراوانی جهش در انکوژن KRAS ۴۳/۳٪ بوده است، در این مطالعه، به بررسی جهش‌ها در کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱ پرداخته شد و نشان داده شد که بیشترین جهش مربوط به کدون ۱۲ (ترنژیشن G به A) بوده و تنها ۳٪ نمونه‌های مورد بررسی در کدون ۶۱ دارای جهش می‌باشند.<sup>۳</sup>

در مطالعه‌ای که Lieve و همکارانش بر روی ۸۹ بیمار دارای سرطان کولورکتال متاستاتیک انجام دادند، در ۲۷٪ بیماران جهش KRAS یافت شد که همگی دارای مقاومت به ستوکسیماب بودند و این بیماران بقای کمتری نسبت به بیماران بدون جهش داشتند. این نتایج ارزش پیش‌آگهی‌دهنده بالای جهش‌های KRAS در پاسخ به ستوکسیماب را نشان می‌دهد.<sup>۱۹</sup>

وجود جهش در کدون ۱۲ و ۱۳ انکوژن KRAS مقاومت به درمان‌های ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی را پیش‌بینی می‌کنند. در مطالعه Loupakis و همکارانش، بیماران بدون جهش در کدون ۱۲ و ۱۳ مورد بررسی قرار گرفتند. از میان ۸۷ نمونه مورد بررسی به ترتیب

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، فراوانی جهش در ژن KRAS در بین جمعیت ایرانی با مقادیر گزارش شده در مطالعات پیشین انجام گرفته در سایر کشورها همخوانی دارد. شیوع قابل توجه این موتاسیون‌ها در بیماران مبتلا به سرطان های کولورکتال بیان کننده نقش این ژن در این بیماران می‌باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی تحت عنوان "ارزیابی جهش‌های ژن‌های KRAS و BRAF در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال" در مقطع کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی در سال ۱۳۹۲ مصوب دانشگاه دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد که در آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند انجام گردید.

این ارتباط پیشنهاد می‌شود. در مطالعه حاضر بررسی جهش‌ها در جمعیت کوچکی از بیماران صورت گرفته است ولی انتخاب این بیماران جهت انجام این طرح به صورت تصادفی و غیرانتخابی انجام شده است. جهت آشکارسازی جهش‌های کدون‌های ۱۲، ۱۳، ۶۱ در انکوژن KRAS از روش هیبریداسیون استفاده شد که برای هر جهش نقطه‌ای پرایمرها و پروب‌های اختصاصی طراحی شده و آشکارسازی جهش‌های نقطه‌ای را امکان‌پذیر می‌کند و همچنین هر نوار نیتروسولوزی دارای کنترل‌های داخلی جهت صحت PCR و مراحل انجام هیبریداسیون می‌باشد. وجود موتاسیون در ژن KRAS می‌تواند به عنوان یک بیومارکر مناسب جهت ارزیابی پاسخ به درمان‌های هدفمند مورد استفاده قرار گیرد.

## References

- Choudry A, Masood S, Ahmed S. Feasibility and safety of transabdominal chorionic villus sampling. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2012;24(1):38-43.
- Brink M, de Goeij AF, Weijnenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachem MM, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003;24(4):703-10.
- Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 2009;27(35):5931-7.
- Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360(14):1408-17.
- Tejpar S, Popovici V, Delorenzi M, Budinska E, Estrella E, Mao M, et al. Mutant KRAS and BRAF gene expression profiles in colorectal cancer: Results of the translational study on the PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60-00 trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings* 2010;28(15):3505.
- Prenen H, Tejpar S, Van Cutsem E. New strategies for treatment of KRAS mutant metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(11):2921-6.
- Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
- Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(14):1062-74.
- Hinoda Y. KRAS mutation test. *Rinsho Byori* 2011;59(6):598-601.
- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010;28(3):466-74.
- Srivastava S, Verma M, Henson DE. Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(5):1118-26.
- Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, Leigh NB. Biomarkers that currently affect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. *Front Oncol* 2014;4:204.
- Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res* 1999;59(20):5169-75.
- Kumar K, Brim H, Giardiello F, Smoot DT, Nouraei M, Lee EL, et al. Distinct BRAF (V600E) and KRAS mutations in high microsatellite instability sporadic colorectal cancer in African Americans. *Clin Cancer Res* 2009;15(4):1155-61.
- Ince WL, Jubb AM, Holden SN, Holmgren EB, Tobin P, Sridhar M, et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(13):981-9.
- Velho S, Moutinho C, Cimes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F, et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* 2008;8:255.
- Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC, et al. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009;9:179.
- Li Z, Chen Y, Wang D, Wang G, He L, Suo J. Detection of KRAS mutations and their associations with clinicopathological features and survival in Chinese colorectal cancer patients. *J Int Med Res* 2012;40(4):1589-98.
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66(8):3992-5.
- Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(35):5705-12.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, et al. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One* 2011;6(7):e22769.

22. Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 1994;69(2):367-71.
23. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101(4):715-21.
24. Shemirani AI, Haghighi MM, Milanizadeh S, Taleghani MY, Fatemi SR, Damavand B, Zali MR. The role of kras mutations and MSI status in diagnosis of colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2011;4(2):70-5.

## Evaluation of frequency of kirsten rat sarcoma gene mutations in Iranian colorectal cancer

Fatemeh Roudbari Ph.D.<sup>1</sup>  
Behzad Poopak DCLS., Ph.D.<sup>2\*</sup>  
Fatemeh Sheikhsofla M.Sc.<sup>3</sup>  
Mojtaba Ghadiani M.D.<sup>4</sup>

1- Department of Virology,  
University of Mazandaran,  
Mazandaran, Iran.

2- Department of Clinical  
Laboratory Sciences, Islamic Azad  
University, Tehran Medical  
Sciences Branch, Tehran, Iran.

3- Department of Cell and  
Molecular Biology, University of  
Mazandaran, Mazandaran, Iran.

4- Department of Hematology and  
Oncology, Medical University of  
Shahid Beheshti, Tehran, Iran.

\* Corresponding author: Islamic Azad  
University, Tehran Medical Sciences  
Branch, Khaghani St., Shariati Ave.,  
Tehran, Iran.  
Post Code: 19395/1495.  
Tel: +98- 21- 22264144  
E-mail: bpoopak@gmail.com

### Abstract

Received: 05 Sep. 2016 Revised: 05 Nov. 2016 Accepted: 14 Nov. 2016 Available online: 15 Nov. 2016

**Background:** Kirsten rat sarcoma (KRAS) gene is a target of genetic alterations which are diagnostic and prognostic biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer who are treated with monoclonal anti-EGFR antibodies such as cetuximab and panitumumab. KRAS mutations are seen in 35-42% of patients with colorectal cancer. The high frequency of these mutations in colorectal cancer represents their high potential as a biomarker in early diagnosis of cancer. This study was done to evaluate the frequency of KRAS gene mutations in a small population of Iranian patients suffering from colorectal cancer.

**Methods:** 50 formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks with colorectal cancer (CRC), already confirmed by histopathology and immunohistochemistry testing, were received to Payvand Clinical and Specialty Laboratory, Tehran, from across the country in 2015. DNA was extracted from the tissue blocks and its quality was then evaluated. The reverse dot blotting method was used to evaluate KRAS gene mutations.

**Results:** KRAS mutations were found in 42% of the study patients. 30% and 12% of the mutations were found in codon 12 and codon 13, respectively. Moreover, no mutation was found in codon 61. Results also showed that the most frequency of samples examined belonged to male with 68% (average age of 56 years old) and then to female with 32% (median age of 54.8 years old).

**Conclusion:** This study was performed to evaluate the frequency of KRAS gene mutations in Iranian colorectal cancer patients. According to the study results, the frequency of KRAS mutations was consistent with that of other countries, reported in previous studies. The high prevalence of these mutations in patients with colorectal cancer indicates the important role of these genes in this group of patients. Thus, the presence of these mutations can be used as a suitable biomarker for evaluation of response to targeted therapies in patients suffering from colorectal cancer.

**Keywords:** KRAS, colorectal cancer, reverse dot blotting.