

موتاسیون های شایع ژن KRAS و BRAF در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

رویا دولت خواه^۱، سعید دستگیری^۲، محمد حسین صومی^۳، مرتضی جبار پور بنیادی^۴، سوسن گرامی^۵، نیکو فتوحی^۶، رضا عبدالمحمدی^۷، طاهره محمدیان^۸، فریبا عزتی^۹، سوسن اسکویی^{۱۰}، فاطمه زهرا راهبری^{۱۱}، لیلا سعیدی^{۱۲}، مهری گلچین^{۱۳}

^۱ پژوهشگر، دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران و مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲ استاد، دکتری تخصصی اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ استاد، فوق تخصص بیماری های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ دانشیار، دکتری تخصصی ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۵ کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۶ دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۷ کارشناس پرستاری، مرکز آموزشی درمانی امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۸ کارشناس پرستاری، مرکز آموزشی درمانی سینا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۹ کارشناس ارشد پرستاری، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

جهش های پروتئوکوزن KRAS و BRAF از جمیع وقایع کلیدی در پروسه سرطان زایی سرطان کولورکتال به حساب می آیند. با توجه به اهمیت بررسی شیوع این موتاسیون ها، به ویژه در بیماران متاستاتیک از نظر تعیین استراتژی های درمانی، شیوع موتاسیون های ژن KRAS و BRAF در شهر تبریز مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی:

نمونه DNA از بافت سرطانی و بافت سالم اطراف تومور ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال اولیه استخراج گردید. روش تعیین توالی مستقیم، متد مورد نظر برای تعیین محل و نوع موتاسیون ها ژن KRAS برای اگزون شماره دو و ژن BRAF برای اگزون شماره ۱۵ بود. بعد از تعیین موتاسیون ها، وجود رابطه بین ژن های موتانت با تظاهرات بالینی و پاتولوژیک بیماری بررسی گردید.

یافته ها:

در این مطالعه، شیوع موتاسیون ژن KRAS ۲۰٪ (۶ نفر از ۳۰ نفر) بود و هیچ کدام از بیماران حاوی ژن BRAF موتانت نبودند. احتمال وجود موتاسیون در ژن KRAS در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با درجه بدخیمی بالا ۲/۱ برابر بیشتر بود. (95%CI: 1.34-3.29) وجود متاستاز شانس بروز موتاسیون این ژن را ۱/۱ برابر بیشتر می کرد. (95%CI: 0.93-1.25) همچنین در این بررسی هیچ رابطه آماری معنی داری بین وجود موتاسیون با تظاهرات کلینیکال و پاتولوژیک مختلف به دست نیامد.

نتیجه گیری:

نسبت توزیع سنی بالاتری از بروز زودرس سنی سرطان کولورکتال در ایران لزوم توجه به برنامه های غربالگری و پیشگیری در گروه سنی جوان تر در کشور ایران را می طلبد. همچنین نیاز بیشتر برای مطالعات ژنتیکی در سطح مولکولی و وسیع در جمعیت بزرگ تر و مناطق جغرافیایی مختلف وجود دارد. **کلید واژه:** سرطان کولورکتال، BRAF، KRAS، موتاسیون

گوارش/ دوره ۲۰، شماره ۱/ بهار ۱۳۹۳/ ۲۷-۳۳

نویسنده مسئول: سعید دستگیری

تبریز، خیابان گلگشت، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی،

کد پستی: ۵۱۶۶۶۱۴۷۳۱

تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۴۳۶۲۶

نمابر: ۰۴۱-۳۳۳۴۳۸۴۴

پست الکترونیک: saeed.dastgiri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۱

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۳/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۱

زمینه و هدف:

سرطان کولورکتال یکی از شایع ترین بدخیمی ها در جوامع غربی و در کشورهای آسیایی می باشد. (۱) مکانیسم های مولکولی مختلفی در سیر بیولوژیک سرطان کولورکتال مطرح است. در این مسیر ژنتیکی، تبدیل اپی تلیوم نرمال به اپی تلیوم تکثیر شونده با جهش در ژن APC^۱، و از اپی تلیوم تکثیر شونده به آدنوما با تغییرات متیلاسیون DNA همراه است. در مرحله آدنوما، جهش در ژن BRAF، KRAS رخ می دهد و در نهایت تبدیل آدنوما به کارسینوما با جهش در ژن P۵۳ همراه است. جهش های ژن BRAF، KRAS جزو شایع ترین تغییرات

1. Adenomatous Polyposis Coli

ژنتیکی سوماتیک در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در کشورهای غربی می باشند. (۲۰۱)

موتاسیون در ژن KRAS در ۲۵-۱۷٪ تمامی سرطان ها و در بیش از ۴۵-۳۵٪ سرطان های کولورکتال دیده می شود. موتاسیون این ژن در سرطان کولورکتال با میزان بقاء پایین و افزایش تهاجم تومور در ارتباط بوده و به صورت موتاسیون های نقطه ای و در اگزون شماره ۲، و در بیش از ۹۰٪ موارد در کدون شماره ۱۲ و ۱۳ دیده می شود. موتاسیون در ژن KRAS با متاستاز سریع و تهاجمی کبد نیز در ارتباط می باشد. همچنین این بیماران به درمان های شامل بلوکاز EGFR^۱ پاسخ نمی دهند. موتاسیون ژن BRAF در ۱۰-۵٪ موارد سرطان کولورکتال اسپورادیک و در نزدیک به نیمی از تومورهای کولون با بی ثباتی های ریز ماهواره ای (MSI)^۲ دیده می شود و به صورت موتاسیون های نقطه ای در اگزون شماره ۱۱، ۱۲ و ۱۵ و بیش از ۹۰٪ موارد کدون (۶۰۰/۵۹۹) ژن BRAF دیده می شود. اگرچه نقش موتاسیون های ژن KRAS و BRAF، در پیش بینی پاسخ به درمان های آنتی-EGFR به خصوص در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پیشرفته به شکل وسیعی مورد قبول واقع شده است، ولی در مورد نقش موتاسیون ژن KRAS در پیش آگهی و میزان بقاء بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال توافق نظر وجود ندارد و هنوز مورد بحث می باشد. با این وجود جهش در ژن BRAF با پیش آگهی بد بیماری و عدم پاسخ به درمان های آنتی-EGFR همراه است. (۳-۶)

مارکهای مولکولی و ژنتیکی در سرطان کولورکتال می تواند توسط عوامل محیطی و یا استعداد ژنتیکی تحت تاثیر قرار گیرند. از این رو مطالعه و مقایسه داده های مربوط به شیوع موتاسیون های مختلف درگیر در سرطان کولورکتال در جمعیت های مختلف با تظاهرات اپیدمیولوژیک متفاوت، در فهم بهتر مکانیسم های زمینه ای سرطان کولورکتال مفید خواهند بود. مطالعات اپیدمیولوژیک متعدد در ایران نشان داده است که اگرچه میزان بروز سرطان کولورکتال در ایران پایین تر از جوامع غربی می باشد، ولی فراوانی شیوع در جمعیت جوان اندکی بیشتر و یا نزدیک به آمارهای آمریکا گزارش شده است. تغییر رژیم غذایی به سمت رژیم پرچرب و سرشار از پروتئین حیوانی و تغییر شیوه زندگی^۳ در نسل جوان می تواند عامل افزایش صعودی ناگهانی در حال حاضر و در آینده نزدیک بیماری باشد. (۷-۱۱)

در نهایت ثابت شده است که مسیرهای مولکولی درگیر در سرطان کولورکتال مانند جهش ها، پلی مورفیسم ها، تغییرات کروموزومی، بیان پروتئین ها، و فاکتورهای رشد به طرز چشمگیری بر روی پیشرفت بیماری و یا پاسخ درمانی تاثیر می گذارند. در این زمینه نتایج تجزیه و تحلیل جهش های ژن KRAS و BRAF می تواند در انتخاب بیماران واجد شرایط درمان های آنتی-EGFR مورد استفاده قرار گیرد. از این رو با انتخاب مسیر درمانی مناسب و در مقایسه با هزینه درمانی، انجام تست های مولکولی بسیار مقرون به صرفه خواهند بود.

1. Epidermal Growth Factor Receptor
2. Microsatellite Instability
3. Life Style

علی رغم پیشرفت های علمی وسیع در دو دهه اخیر در زمینه تغییرات ژنتیکی درگیر در مسیرهای مولکولی مختلف در سرطان کولورکتال، در مورد شیوع و ارزش تشخیصی این موتاسیون ها در بیماران آسیایی ارزیابی های کافی در دست نیست. همچنین مطالعات بسیار معدودی از شیوع این موتاسیون ها از ایران گزارش شده است. (۷۱) این مطالعه با هدف بررسی شیوع پروتئین های KRAS و BRAF در بافت سرطانی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال اولیه طراحی و اجرا گردید. تعیین ارتباط وجود ژن های جهش یافته با تظاهرات بالینی و پاتولوژیک بیماران تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

روش بررسی:

در طی انجام این مطالعه که در طی ۶ ماه (از تاریخ ۱۳۹۳/۱/۱۵ لغایت ۱۳۹۳/۷/۱۵) انجام گرفت، تمامی موارد مشکوک به سرطان کولورکتال مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا و سینا ی شهر تبریز به ترتیب مراجعه وارد مطالعه شدند. در این مطالعه به منظور انجام تست های مولکولی در حین انجام کولونوسکوپی و بعد از اخذ رضایت نامه اخلاقی از بیماران نمونه گیری از بافت تومورال ناحیه کولون و رکتوم به عنوان گروه مورد و بافت سالم از خود بیمار به عنوان کنترل انجام گرفت. نمونه بیوپسی به اندازه ۴-۲ میلی متر تهیه و در شرایط استریل به آزمایشگاه مولکولی ارسال و کد گذاری شده و در فریزر منهای ۸۰ درجه نگهداری شدند.

تشخیص قطعی سرطان کولورکتال در هر مرحله بیماری و رضایت بیمار جهت شرکت در مطالعه از معیار های ورود به مطالعه بودند. عدم رضایت بیمار جهت شرکت در مطالعه، و رد تشخیص سرطان کولورکتال در گزارش پاتولوژی از معیارهای خروج از مطالعه بودند.

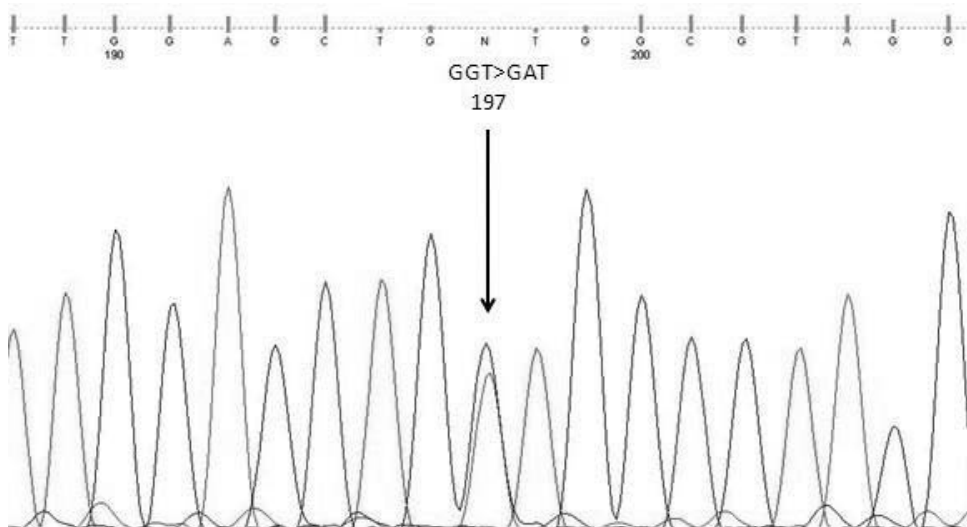
بعد از تایید بدخیمی بر اساس گزارش پاتولوژی، از نمونه های بافتی جمع آوری شده بیماران، DNA ژنومی آنها براساس راهنمای کیت استخراج DNA (DNG-Plus, Cinagene) استخراج گردید. اگزون شماره ۲ (کدون شماره ۱۲ و ۱۳) برای ژن KRAS و اگزون شماره ۱۵ (کدون شماره ۶۰۰) برای ژن BRAF به وسیله واکنش PCR با پرایمرهای مربوطه تکثیر شدند.

مقدار ۱۵۰-۱۰۰ نانوگرم از محصول DNA برای حصول PCR 25µl، ترکیب 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl PH 8.8, 50 mM KCl) و 1.5mM MgCl₂ و 0.2mM از هر نوکلئوتید dNTP، و ۱ یونیت آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن) به اضافه 1pmol از هر پرایمر آماده گردید.

واکنش PCR و توالی پرایمرهای مربوط به ژن KRAS و BRAF جدول ۱ آورده شده است. محصول واکنش PCR برای مشخص کردن برخی از موتاسیون های شایع در اگزون مربوطه با روش توالی خودکار Direct Sequencing آنالیز شدند. بعد از تعیین موتاسیون ها، وجود رابطه بین این موتاسیون ها با درجه بدخیمی تومور و پیش آگهی بیماری

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای بررسی جهش ژن های KRAS و BRAF

ژن مورد بررسی	پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول
KRAS	Forward	5'-ACACGTCTGCAGTCAACTGGAAT-3'	339bp
	Reverse	5'-ATGGTCCTGCACCAGTAATATGCA-3'	
BRAF	Forward	5'-GCTTGCTCTGATAGGAAAATGAG-3'	237bp
	Reverse	5'-CCTGAGATGCTGCTGAGTTAC-3'	



شکل ۱: توالی جهش یافته در یکی از نمونه های موتانت ژن KRAS

بررسی شد. داده های توصیفی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تحت آنالیز آماری قرار گرفتند.

بررسی شد. داده های توصیفی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تحت آنالیز آماری قرار گرفتند.

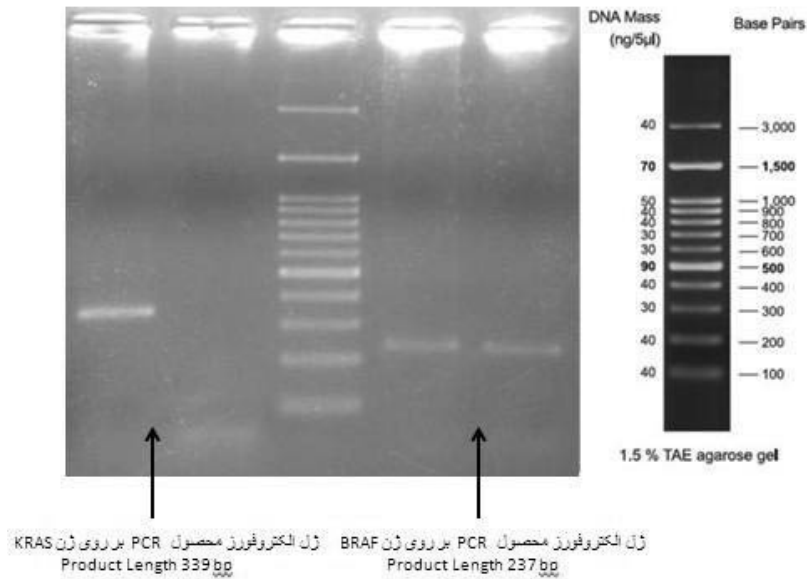
یافته ها:

این بررسی بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کولون و رکتوم انجام گرفت. از بین ۳۰ نمونه ای که توالی یابی شدند، در مورد ژن KRAS، ۶ بیمار (۲۰٪) دارای جهش هتروزایگوت ژن KRAS در بافت تومورال و ۲۴ بیمار (۸۰٪) حاوی ژن Wild Type KRAS بودند. هیچ گونه جهشی در منطقه مورد مطالعه ژن KRAS در بافت نرمال اطراف تومور بیماران مشاهده نشد. هیچ موردی از موتاسیون ژن BRAF در آگزون مورد نظر (آگزون شماره ۱۵) در بافت تومورال و بافت نرمال اطراف تومور در ۳۰ بیمار مورد مطالعه مشاهده نگردید.

ارتباط آماری معنی داری بین جنسیت و وجود موتاسیون ژن KRAS به دست نیامد ($p=0/397$)، ولی، احتمال وجود موتاسیون ژن KRAS در مردان ۱/۷ برابر بیشتر از زنان بود. $OR=1.7(95\% CI: 0.16-17.26)$ از ۵ نفر بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال که زیر ۵۰ سال سن داشتند، ۴ نفر سابقه مثبت فامیلی سرطان کولورکتال داشتند. در صورتیکه در از ۲۵ بیمار بیشتر یا مسای ۵۰ سال سن، ۸ مورد سابقه مثبت فامیلی را ذکر کردند. ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. $OR=0.12(95\% CI: 0.01-1.23)$ ($p=0/068$)

شکل ۱ توالی جهش یافته در یکی از نمونه های موتانت ژن KRAS، در آگزون شماره ۲ را نشان می دهد. نوکلئوتید شماره ۱۹۷ در کدون شماره ۱۲ دچار موتاسیون شده و نوکلئوتید گوانین به آدنین تبدیل شده است. نتیجه این جهش تولید اسید آمینه اسپاراتات به جای اسید آمینه گلایسین می باشد. از کل ۳۰ بیمار مورد مطالعه ۲۳ نفر از آنها مرد (۷۶٪) و ۷ نفر زن بودند (۲۳٪) و نسبت مرد به زن در این مطالعه ۳/۲۸ بود. میانگین سنی بیماران

ارتباط آماری معنی داری بین وجود موتاسیون ژن KRAS با سابقه مثبت فامیلی سرطان کولورکتال وجود نداشت ($p=0/173$)، همچنین ارتباط آماری معنی داری بین نوع هیستولوژیک تومور با موتاسیون ژن KRAS وجود نداشت. ($p=0/179$) در این مطالعه ارتباط آماری معنی داری بین وجود موتاسیون و مرحله بیماری، و درجه تمایز تومور به دست نیامد. مرحله بیماری بالا (High Stage) نسبت به



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR بر روی ژن KRAS و BRAF

جدول ۲: مشخصات دموگرافیک بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

متغیر	فراوانی	درصد
جنس	مرد	۲۳
	زن	۷
سن	>۵۰ سال	۵
	≤۵۰ سال	۲۵
سابقه فامیلی سرطان کولورکتال	مثبت	۱۲
	منفی	۱۸
مرحله بیماری (TNM)	I	۷
	II	۴
	III	۶
	IV	۸
درجه تمایز	نامعلوم	۵
	تمایز خوب	۱۵
	تمایز متوسط	۸
	تمایز بد	۲
	تمایز نیافته	۵

اسید آمینه ای Gly12Asp بود. (۱۳) در یک مطالعه با ارزش دیگر توسط دکتر بیشه ساری و همکاران، ۱۸۲ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال در ایران از نظر شیوع جهش ژن KRAS در کدون های ۱۲، ۱۳ و ۶۱ مورد بررسی قرار گرفتند. ۶۸ مورد (۳۷/۴٪) دارای ژن جهش یافته بودند، که بیشتر از

مرحله پایین بیماری (Low Stage) احتمال بروز موتاسیون ژن KRAS را ۲/۱ برابر بیشتر می کند (OR=2.1 (95% CI: 1.34-3.29) همچنین شانس موتاسیون ژن KRAS در بیماران متاستاتیک ۱/۱ برابر بیشتر بود. (OR=1.1 (95% CI: 0.93-1.24)

بحث:

بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک متعدد با استفاده از داده های مربوط به ثبت اطلاعات بیماران سرطانی وزارت بهداشت، با وجود این که بروز سرطان کولورکتال به خصوص در جمعیت مسن در حال حاضر در کشور ما پایین گزارش شده است (۷-۱۱)، ولی با توجه به بالا بودن بروز این سرطان در گروه سنی زیر ۴۰ سال و روند رو به افزایش آن نسبت به گزارش های قبلی، این مطالعه در شهر تبریز انجام گرفت. از طرف دیگر با توجه به اهمیت بررسی شیوع موتاسیون های ژن KRAS و BRAF به ویژه در بیماران متاستاتیک از نظر تعیین استراتژی های درمانی، بررسی شیوع این موتاسیون ها مد نظر بود. با توجه به مشکلاتی که در تهیه نمونه های تازه انسانی از طریق بیوپسی تومور وجود دارد، قادر بودیم که تعداد محدودی نمونه تهیه کنیم.

در این پژوهش ۳۰ بیمار با تشخیص اولیه سرطان کولورکتال مورد مطالعه قرار گرفتند. شیوع موتاسیون ژن KRAS ۲۰٪ (۶ مورد) بود. نتایج مطالعه حاضر مطابق با نتایج بررسی دکتر سبحانی و همکاران بود، که ۲۰٪ از بیماران دارای ژن KRAS نوع موتانت بودند و اکثریت جهش های مربوط به ژن RAS، مربوط به تغییر نوکلئوتیدی مشابه بود. (۱۲) در مطالعه دیگری که توسط ایرانی شمیرانی و همکاران انجام گرفت شیوع موتاسیون ژن KRAS را ۱۲/۵٪ گزارش کرده بودند که نزدیک به ۸۵٪ از موتاسیون ها از نوع تغییر

مانند سایر تومورهای توپر^۲، بیماری مختص سنین پیری بوده و معمولاً بعد از ۶۰ سالگی بروز می کند. ظهور زودرس بیماری در سنین میان سالگی (۵۰-۴۰ سالگی) در جوامع غربی تنها ۸-۲ درصد موارد را تشکیل می دهد. (۷) بررسی های اپیدمیولوژیک مختلف در ایران نشان دهنده یک نسبت توزیع سنی بالاتری از بروز زودرس در سنین میان سالی است، به طوری که تقریباً یک پنجم موارد سرطان کولورکتال زیر ۴۰ سالگی دیده می شود. (۷) در مطالعه حاضر ۱۷٪ از بیماران زیر ۵۰ سال سن بودند که تا حدودی کمتر از نتایج گزارش شده توسط حاج منوچهری و همکاران بود، ولی بیشتر و با حداقل نزدیک به آمارهای جوامع غربی و کشورهای پر خطر می باشد. این یافته ها در کنار نتایج به دست آمده قبلی لزوم توجه به برنامه های غربالگری و پیشگیری در گروه سنی جوان تر در کشور ایران را می طلبد. (۷ و ۲۳)

از محدودیت های این مطالعه، تعداد کم بیماران با توجه به مشکل جمع آوری نمونه های انسانی از موارد تازه تشخیص داده شده سرطان کولورکتال بود. با توجه به ارتباط ثابت شده بین شیوع موتاسیون های KRAS و BRAF با عواملی نظیر نژاد، قومیت، منطقه جغرافیایی، عوامل تغذیه ای و شیوه زندگی، بررسی های بیشتر با حجم نمونه بالاتری در این زمینه از ضروریات می باشد. این اهداف در طی مطالعات آتی این گروه در حال انجام می باشد و نتایج آن به زودی جمع آوری و ارائه خواهند شد.

نتیجه گیری:

جهش های پروتوانکوژن های KRAS و BRAF از جمله وقایع کلیدی در سیر سرطان زائی سرطان کولورکتال می باشند. علیرغم بررسی های وسیع موتاسیون های KRAS و BRAF به عنوان سنگ بنای اصلی تعیین استراتژی های درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در بسیاری از مراکز اونکولوژی جهان، داده های محدودی از میزان و طیف این موتاسیون ها در ایران وجود دارد. همچنین نسبت بارز از توزیع فامیلی سرطان کولورکتال، خصوصاً در جمعیت جوان کلیدهای تشخیصی بسیار مهم به دست می دهند که مطرح کننده نیاز بیشتر برای مطالعات ژنتیکی در سطح مولکولی و وسیع در جمعیت ایرانی و مناطق جغرافیایی مختلف دارد. از طرف دیگر نسبت توزیع سنی بالاتری از بروز زودرس سرطان کولورکتال در سنین میان سالی در ایران لزوم توجه به برنامه های غربالگری و پیشگیری در گروه سنی جوان تر در کشور را می طلبد. (۲۴ و ۲۵)

2. Solid

نتایج مطالعات دیگر می باشد. در هر حال این نتایج در مقایسه با مطالعات انجام گرفته در کشورهای پرخطر و از جمله ایتالیا پایین تر می باشد. (۱۴ و ۱۵) فراوانی گزارش شده برای جهش ژن KRAS در طیف وسیعی از ۲۰ تا ۵۰ درصد در مناطق مختلف جهان گزارش شده است. (۶-۳)

همچنین نتایج مطالعه حاضر قابل مقایسه با نتایج مطالعه اخیر است که از آلبانی گزارش شده است که شیوع موتاسیون ژن KRAS آنها تقریباً نزدیک به نتایج ما بود (۱۸٪ برای ژن KRAS و ۶٪ برای ژن BRAF). همچنین در این بررسی هیچ رابطه آماری معنی داری بین وجود موتاسیون با تظاهرات کلینیکال و پاتولوژیک مختلف وجود نداشت. (۲)

داده های مطالعات متعدد قبلی در مورد شیوع موتاسیون ژن BRAF نشان می دهد که این جهش در ۵-۱۰٪ سرطان های کولورکتال اسپورادیک دیده می شود، و در بیش از ۹۰٪ موارد مربوط به موتاسیون اگزون شماره ۱۵، و کدون V600E می باشد. (۱۶) داده های ضد و نقیضی از شیوع این جهش در کشورهای مختلف در دسترس می باشد. بالاترین میزان از کشور آمریکا و استرالیا با شیوع ۹/۵-۱۲/۵٪ بوده است. (۱۷) در مطالعه وسیعی که بر روی ۴۳۶ بیمار از مناطق مختلف چین در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، ۴/۴-۴/۲٪ از بیماران حاوی ژن موتانت بودند. (۱۸) مطالعه بریم^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطرح کننده میزان شیوع بسیار پایین این موتاسیون در جوامع شرقی می باشد (۱۹)، و چندین مطالعه در ایران نیز این ادعا را تأیید کرده اند، به طوری که شیوع صفر تا ۳/۷٪ از شیوع جهش ژن BRAF از مناطق مختلف ایران گزارش گردیده است. در این مطالعه تمامی ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال از نظر وجود موتاسیون ژن BRAF در اگزون شماره ۱۵ مورد بررسی با روش اختصاصی تعیین توالی مستقیم قرار گرفتند. هیچ موردی از جهش ژن در منطقه V600E مشاهده نگردید. این یافته مشابه با چندین مطالعه از ایران و بعضی از کشورهای آسیایی می باشد. (۱۷ و ۲۰)

همچنین میانگین سنی بیماران در این مطالعه (۸۲/۱۴±) ۶/۱۷۷ بود که تقریباً معادل با آخرین داده های بررسی دکتر صومی و همکاران بر روی سرطان های دستگاه گوارش در سال ۲۰۱۴ در همین استان بود. (۲۱) ولی توزیع میانگین سنی سرطان کولورکتال بر اساس گزارش های متعدد در استان های مختلف ایران اندکی متفاوت بوده و از حدود ۵۱ سال در استان کردستان تا ۶۰ سال در استان تهران متفاوت می باشد. (۲۲)

مطالعات متعدد در جوامع غربی نشان داده است که سرطان کولورکتال

1. Brim

REFERENCES

- Chen J, Guo F, Shi X, Zhang L, Zhang A, Jin H, et al. BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2014;14: 802.
- Martinetti D, Costanzo R, Kadare S, Alimehmeti M, Colarossi C,

- Canzonieri V, et al. KRAS and BRAF mutational status in colon cancer from Albanian patients. *Diagn Pathol* 2014;9:187.
- Lewandowska MA, Jozwicki W, Zurawski B. KRAS and BRAF Mutation Analysis in Colorectal Adenocarcinoma Specimens with a Low Percentage of Tumor Cells. *Mol Diagn Ther*

- 2013;17:193-203.
4. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W, Duldulao M, Patel S, Sanchez J, et al. Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. *Int J Sci* 2012;13:12153-68.
 5. Abd El Kader Y, Emera G, Safwat E, Kassem HA, Kassem NM. The KRAS Strip Assay for detection of KRAS mutation in Egyptian patients with colorectal cancer (CRC): A pilot study. *J Egypt Natl Canc Inst* 2013;25:37-41.
 6. Miglio U, Mezzapelle R, Paganotti A, Allegrini S, Veggiani C, Antona J, et al. Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay. *Pathology – Research and Practice* 2013;209:233-6.
 7. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and Molecular Genetics of Colorectal Cancer in Iran: A Review. *Arch Iranian Med* 2009;12:161-9.
 8. Safaee A, Fatemi SR, Ashtari S, Vahedi M, Moghimi-Dehkordi B, Zali MR. Four years Incidence Rate of Colorectal Cancer in Iran: A Survey of National Cancer Registry Data-Implications for Screening. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2695-8.
 9. Hosseini SV, Izadpanah A, Yarmohammadi H. Epidemiological changes in colorectal cancer in Shiraz, Iran: 1980 – 2000. *ANZ J Surg* 2004;74:547 –9.
 10. Pahlavan PS, Kanthan R. The Epidemiology and Clinical Findings of Colorectal Cancer in Iran. *J Gastrointest Liver Dis* 2006;15:15-19.
 11. Mohebbi M, Nourijelyani K, Mahmoudi M, Mohammad K, Zeraati H, Fotouhi A, et al. Time to Occurance and Age Distribution of Digestive Cancers in Northern Iran. *Iranian J Public Health* 2008;37:8-19.
 12. Sobhani S, Ghaffarpour M, Mostakhdemin Hosseini Z, Kamali F, NourMohammadi Z, Houshmand M. The prevalence of common mutation frequency in K-ras codons 12, 13 in Iranian Colorectal Cancer patients. *Genetics in the 3rd Millennium* 2010;8:2011-8.
 13. Irani Shemirani A, Montazer Haghighi M, Milanizadeh S, Taleghani MY, Fatemi SR, Damavand B, et al. The role of kras mutations and MSI status in diagnosis of colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2011;4:70-5.
 14. Nazemalhosseini Mojarad E, Kishani Farahani R, Montazer Haghighi M, Asadzadeh Aghdaei H, Kuppen PJ, Zali MR. Clinical implications of BRAF mutation test in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2013;6:6-13.
 15. Bishehsari F, Mahdavinia M, Malekzadeh R, Verginelli F, Catalano T, Sotoudeh M, et al. Patterns of K-ras mutation in colorectal carcinomas from Iran and Italy (a Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale study): influence of microsatellite instability status and country of origin. *Ann Oncol* 2006;17:vii91–96.
 16. Borrás E, Jurado I, Hernan I, Gamundi MJ, Dias M, Marti I, et al. Clinical pharmacogenomics testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *Bio Med Central Cancer* 2011;11:406.
 17. Javadi F, Geramizadeh B, Mirzai M. BRAF Gene Mutation Analysis in Colorectal Cancer in South of Iran. *Ann Colorectal Res* 2014;2:e19917.
 18. Leung Li, Brigitte BY Ma. Colorectal cancer in Chinese Patients: current and emerging treatment options. *Onco Target and Therapy* 2014;7:1817-28.
 19. Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, Saberi-Firooz M, Al-Mandhari M, Al-Mawaly K, et al. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study. *Mol Cancer* 2008;7:68–79.
 20. Naghibalhossaini F, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mokarram P, Zamani M. High Frequency of Genes' Promoter Methylation, but Lack of BRAF V600E Mutation among Iranian Colorectal Cancer Patients. *Pathology and Oncology Research* 2011;17: 819-25.
 21. Somi MH, Golzari M, Farhang S, Naghashi S, Abdollahi L. Gastrointestinal Cancer Incidence in East Azerbaijan, Iran: Update on 5 Year Incidence and Trends. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 3945-9.
 22. Mahmoodlou R, Mohammadi P, Sepehrvand N. Colorectal Cancer in Northwestern Iran. *ISRN Gastroenterology Volume 2012 (2012), Article ID 968560, 4 pages. Available From: <http://dx.doi.org/10.5402/2012/968560>*
 23. Hajmanoochehri F, Asefzadeh S, Kazemifar AM, Ebtehaj M. Clinicopathological Features of Colon Adenocarcinoma in Qazvin, Iran: A 16 Year Study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:951-5.
 24. Fatemi SR, Shivarani S, Nemati Malek F, Vahedi M, Maserat E, Iranpour Y, et al. Colonoscopy Screening Results in at Risk Iranian Population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11:1801-4.
 25. Moradi A, Khayamzadeh M, Guya MIM, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, et al. Survival of Colorectal Cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009;10:583-6.

Common KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer Patients

Roya Dolatkah¹, Saeed Dastgiri², Mohammad Hossein Somi³, Morteza Jabbarpour Bonyadi⁴, Susan Gherami⁵, Nikou Fotouhi⁶, Reza Abdolmohammadi⁶, Tahere Mohammadi⁶, Fariba Ezati⁷, Susan Oskoui⁷, Fatemeh Zahra Rahbari⁸, Leila Saeedi⁸, Mehri Gholchin⁹

¹ Researcher, Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran and Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Professor, Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Professor, Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Genetic, Faculty of Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

⁵ Ms of Biochemistry, Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁶ Researcher, Department of Genetic, Faculty of Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

⁷ MS of Nursing, Imam Reza Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁸ MS of Nursing, Sina Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁹ MS of Nursing, Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ABSTRACT

Background:

KRAS and BRAF gene mutations are considered as key events in carcinogenesis progression of colorectal cancer. Given the importance of these gene mutations evaluations, especially in metastatic patients, in terms of determination of therapeutic strategies, we studied the prevalence of KRAS and BRAF mutations in Tabriz city.

Materials and Methods:

Deoxyribonucleic Acid (DNA) extracted from Fresh tumor and normal tissues of 30 primary CRC patients. Direct sequencing method, was the method for determining the mutation points of KRAS exon 2 and BRAF exon 15 genes. After mutation analysis, the clinical and pathological associations of mutant genes were assessed.

Results:

The prevalence of KRAS gene mutation was 20 % (6 out of 30 cases) in this study, and none of patients had the mutant BRAF gene. The odds ratio of the KRAS gene mutation in high grade CRCs was 2.1 (95% CI: 1.34 to 3.29). The same ratio for metastasis was 1.1 (95% CI: 0.93 to 1.25). There was no significant relationship between the mutation and clinical and pathological aspects of the disease.

Conclusion:

The high occurrence of early onset of colorectal cancer in Iran demands more attention to screening and prevention programs in the younger age group in the country. However further genetic studies are needed at the molecular level and large population in different geographical areas.

Keywords: Colorectal Cancer, KRAS, BRAF, Mutation

please cite this paper as:

Dolatkah R, Dastgiri S, Somi MH, Jabbarpour Bonyadi M, Gherami S, Fotouhi N, Abdolmohammadi R, Mohammadi T, Ezati F, Oskoui S, Zahra Rahbari F, Saeedi L, Gholchin M. KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer Patients. *Govaresh* 2015;20:27-33.

Corresponding author:

Saeed Dastgiri, MD

Hematology and Oncology Research Center, Tabriz

University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Postal

Code: 51666114731

Tel: + 98 41 33343626

Fax: + 98 41 33343844

E-mail: saeed.dastgiri@gmail.com

Received: 01 Jan. 2015

Edited: 11 Mar. 2015

Accepted: 12 Mar. 2015