Original Article

Relationship between Common KRAS Gene Mutations and Clinicopathological Features of Patients with Colorectal Cancer in Isfahan, Iran

Mohsen Saleh Jazi[1], Saber Zahri[2*], Saeid Latifi-Navid[3], Ardeshir Talebi[4]

[1] Researcher, MSc Student of Cell & Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[4] Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

ABSTRACT

Background:
Colorectal cancer (CRC) is one of the most common gastrointestinal cancers worldwide. KRAS mutations are found in 20-30% of the cases and are associated with poor response to anti-EGFR therapies. Mutations in the KRAS gene induce the constitutive protein activity by eliminating the GTPase activity in the signal transduction pathway. Somatic mutations of KRAS are located up to 90% in codons 12 and 13 of exon 2. Therefore, this study evaluated the association between KRAS mutations and clinicopathological features of patients with CRC in Isfahan.

Materials and Methods:
This study was performed on 52 patients with CRC referred to Al-Zahra Hospital in Isfahan. Total DNA was extracted from fresh tumor and normal tissues. The exon 2 of KRAS gene was amplified and sequenced for detection of the point mutations. After mutation analysis, the clinical and pathological associations of mutant genes were assessed.

Results:
The prevalence of KRAS gene mutation was 15/4% (8 out of the 52 cases). Six mutations found in codon 12 (75%), were G12D and G12A, and two mutations found in codon 13 (25%) were G13D. Common tumor sites were rectum and rectosigmoid. The mean age of the patients was 61/2±13/9 years (range: 31-87 years). There was no significant relationship between the mutations and clinicopathological features of patients with CRC ($p>0.05$).

Conclusion:
This paper presents new results on the frequency of KRAS mutations in patients with CRC. KRAS mutations could be used as molecular biomarkers to predict the lack of response to anti-EGFR monoclonal antibodies.

Keywords: Colorectal cancer, KRAS, Mutation, Anti-EGFR

please cite this paper as:
Saleh Jazi M, Zahri S, Latifi-Navid S, Talebi A.Relationship between Common KRAS Gene Mutations and Clinicopathological Features of Patients with Colorectal Cancer in Isfahan, Iran. *Govaresh* 2017;22:39-46.

Corresponding author:
Saber Zahri, Ph.D.
Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
Post code: 56199-11367
Telefax: + 98 45 33514701
E-mail: sazahri@gmail.com

Received: 07 Nov. 2016
Edited: 05 Mar. 2017
Accepted: 06 Mar. 2017

مقاله پژوهشی

ارتباط جهش های شایع ژن KRAS با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیکی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در شهر اصفهان

محسن صالح جزی[۱]، صابر زهری[۲*]، سعید لطیفی نوید[۳]، اردشیر طالبی[۴]

[۱] پژوهشگر، دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲] استاد، دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۳] دانشیار، دکترای ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۴] دانشیار، دکترای تخصصی پاتولوژی، گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف :
سرطان کولورکتال (CRC) یکی از شایع ترین سرطان های جهان و ایران است که در ۲۰ تا ۳۰ درصد آنها جهش در ژن KRAS دیده شده است و با پاسخ ضعیف به درمان های Anti-EGFR در ارتباط است. وقوع جهش در ژن KRAS با حذف فعالیت GTPase، فعالیت پیوسته ی پروتئین را در مسیر پیام رسانی القا می کند. بیش از ۹۰٪ جهش های سوماتیک ژن KRAS در کدون ۱۲ و ۱۳ اگزون ۲ قرار دارند. از این رو، این پژوهش ارتباط جهش های ژن KRAS با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیکی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در اصفهان را بررسی کرد.

روش بررسی :
این مطالعه بر روی ۵۲ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال که به بیمارستان الزهراء اصفهان مراجعه کرده بودند انجام گرفت. DNA از بافت تازه ی توموری و بافت سالم استخراج شد. اگزون شماره ۲ ژن KRAS برای تعیین جهش های نقطه ای تکثیر و توالی یابی شد. بعد از آنالیز جهش ها، وجود رابطه بین ژن های موتانت و فاکتورهای بالینی و پاتولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها :
در این بررسی شیوع جهش های ژن KRAS ۱۵/۴٪ (۸ مورد از ۵۲ نفر) بود. شش جهش از نوع G12D و G12A در کدون ۱۲ (۷۵٪) مشاهده شد و دو جهش موجود در کدون ۱۳ (۲۵٪) تنها از نوع G13D بودند. شایع ترین محل تومور، رکتوم و رکتوسیگموییدبوده و میانگین سنی بیماران ۱۳/۹±۶۱/۲ سال با دامنه ۸۷-۳۱ سال بدست آمد. رابطه ی آماری معنی داری بین وجود جهش و هیچ یک از فاکتورهای بالینی و پاتولوژیکی بیمار مشاهده نشد. (*P*-value >۰/۰۵)

نتیجه گیری :
این مطالعه نتایج جدیدی از فراوانی جهش های ژن KRAS در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارائه کرد. انواع جهش های KRAS می تواند بعنوان نشانگر مولکولی، برای پیش بینی عدم پاسخ به آنتی بادی های مونوکلونال Anti-EGFR به کارگرفته شود.

کلید واژه: سرطان کولورکتال، KRAS، جهش، Anti-EGFR

گوارش/ دوره ۲۲، شماره۱/ بهار ۱۳۹۶/۴۶-۳۹

***نویسنده مسئول:** صابر زهری
اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم پایه،
گروه زیست شناسی، کدپستی: ۱۱۳۶۷-۵۶۱۹۹
تلفن و نمابر: ۳۳۵۱۴۷۰۱-۰۴۵
پست الکترونیک: sazahri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۷
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۵/۱۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۶

زمینه و هدف:

طبق آمار موسسه بین المللی تحقیقات سرطان[۱] (IARC)، سرطان کولورکتال[۲] (CRC) دومین سرطان شایع در زنان، پس از سرطان سینه و سومین سرطان شایع در مردان، بعد از سرطان های ریه و پروستات می باشد. استرالیا، نیوزلند، اروپا و ساکنان آمریکای شمالی بیشتر از سایر جاهای دنیا به سرطان کولون مبتلا می شوند. در حدود ۶۹۳۹۰۰ مرگ در اثر این سرطان در سال ۲۰۱۲ ثبت شده است که ۸/۵٪ مرگ و میرهای ناشی از سرطان را شامل می شود.(۱) ایران، از جمله کشورهای جنوب غربی آسیاست که سرطان کولورکتال یکی از پنج سرطان شایع در این کشور محسوب می شود (۲) و شیوع آن در طول ۲۵ سال گذشته

1. International Agency for Research on Cancer
2. Colorectal Cancer

افزایش یافته است.(۳) علت این افزایش اپیدمیولوژیک را می توان به دلیل تغییر سبک زندگی، رژیم غذایی و عوامل محیطی مانند شرایط استرس زا دانست. اما در این بین استعداد ارثی و ژنتیکی هم نقش مهمی در بروز سرطان کولورکتال دارد.(۴, ۵)

سرطان روده بزرگ می تواند اسپورادیک، ارثی و یا فامیلی باشد. سندرم لینچ یا کارسینوم ارثی غیرپولیپوز[1] (HNPCC) و سندرم پولیپوز فامیلی[2] (FAP) از شایع ترین سرطان های ارثی و فامیلی هستند که در دهه ی دوم و سوم زندگی فرد، صدها پولیپ تشکیل می دهند و در نهایت این دو سندرم منجر به سرطان های کولورکتال ارثی قبل از ۴۰ سالگی خواهند شد.(۶) سرطان های اسپورادیک معمولا در سنین بالای ۵۰ سال روی می دهند و به همین سبب غربالگری سرطان کولورکتال برای افرادی که سابقه فامیلی ندارند از همین سن آغاز می شود. مسیر پیشرفت سرطان کولورکتال با جهش ژن APC در اپی تلیوم نرمال و تبدیل آن به اپی تلیوم تکثیر شونده آغاز می شود. در ادامه اپی تلیوم تکثیرشونده با تغییرات متیلاسیون به آدنوما همراه است. در مرحله آدنوما جهش های ژن KRAS و BRAF رخ می دهد و در نهایت مسیر تبدیل آدنوما به کارسینوما با جهش در ژن P۵۳ همراه است. بیش از ۹۰٪ سرطان های کولورکتال از این مسیر ژنتیکی پیروی می کنند.(۷)

پروتوآنکوژن KRAS در بازوی کوتاه کروموزم ۱۲، کدکننده ی پروتئین ۲۱ کیلودالتونی RAS می باشد. این پروتئین ۱۸۸ آمینواسیدی، یکی از اعضای خانواده GTPase است که از بخش ایزوپرنیل در ناحیه C-Terminous به غشای سلولی متصل است و همانند کلید روشن و خاموش مسیرهای پیام رسانی سلولی، پیام های خارج سلولی را از طریق گیرنده های غشای سلولی مانند EGFR[3] به پیام های داخل سلولی تبدیل می کند و باعث فراخوانی پروتئین های لازم برای فعالیت رسپتورهایی مانند PI۳K می شود.(۹-۷) نقش پیام رسانی پروتئین KRAS به ساختار G-Domain آن وابسته است. این ساختار متشکل از سه منطقه ی مهم Switch I، P-Loop و Switch II می باشد. سوئیچ I کدون های ۳۸-۳۰ و سوئیچ II کدون های ۶۷-۵۹ را شامل شده و نقش مهمی در اتصال عوامل تنظیمی بازی می کنند. دمین اتصال به فسفات P-loop، کدون های ۱۶-۱۰ و ۵۸-۵۶ را شامل می شود که محل اتصال GTP به RAS و همچنین مسئول فعالیت GTPase ی و هیدرولیز RAS-GTP می باشد.(۱۰)

شایع ترین نقاط داغ جهش های ژن KRAS در کدون های ۱۲ و ۱۳ اگزون ۲ ، کدون های ۵۹ و ۶۱ اگزون ۳ و کدون های ۱۱۷ و ۱۴۶ اگزون ۴ قرار دارد.(۱۱, ۱۲) جهش های این ژن با میزان بقاء پایین بیمار و افزایش متاستاز و تهاجم به کبد در ارتباط اند و بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به درمان های رایج با داروهای Anti-EGFR نظیر Cetuximab پاسخ نمی دهند.(۱۶-۱۳)

آنتی بادی های مونوکلونال Cetuximab و Panitumumab با EGF بر سر اتصال به گیرنده آن رقابت می کند و بدین ترتیب باعث توقف فسفوریلاسیون و عدم فعالیت EGFR و مهار پیام داخل سلولی شده و از تکثیر بی رویه سلول های سرطانی جلوگیری می نماید. سرطان های کولورکتال متاستاتیک که در آن ها جهش در ژن KRAS مشاهده شده است نسبت به داروهای Anti-EGFR مقاومت نشان می دهند.

نزدیک به ۹۷٪ تمامی جهش های سوماتیک ژن KRAS در کدون ۱۲ و ۱۳ اگزون ۲ (به ترتیب ۸۰٪ و ۱۷٪) قرار دارند (۱۱, ۱۷, ۱۸). بیشترین فراوانی در تغییرات نوکلئوتیدی جایگزینی GGT با GAT در کدون ۱۲ گزارش شده که بواسطه ی آن آمینواسید گلیسین در کدون ۱۲ به آسپارتیک اسید تغییر کرده و موجب تشکیل GTPase هایی می شود که در حالت روشن قفل شده اند. حضور آمینواسید گلیسین در کدون ۱۲ بنظر می رسد برای فعالیت طبیعی پروتئین KRAS ضروری باشد.(۱۹و۲۰)

گزارشها بررسی های جمعیتی در زمینه شناسایی جهش های ژن KRAS و ارتباط آنها با فاکتورهای سن و جنس، مرحله و درجه-ی تومور، محل تومور و نوع تومور در مناطق مختلف آسیا و از جمله ایران محدود بوده است.(۲۱) این مطالعه با هدف بررسی فراوانی جهش های آنکوژن KRAS درکدون های ۱۲ و ۱۳ اگزون شماره ی ۲ ی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال منطقه ی اصفهان و ارتباط آنها با تظاهرات کلینیکوپاتولوژیکی طراحی و اجرا شده است.

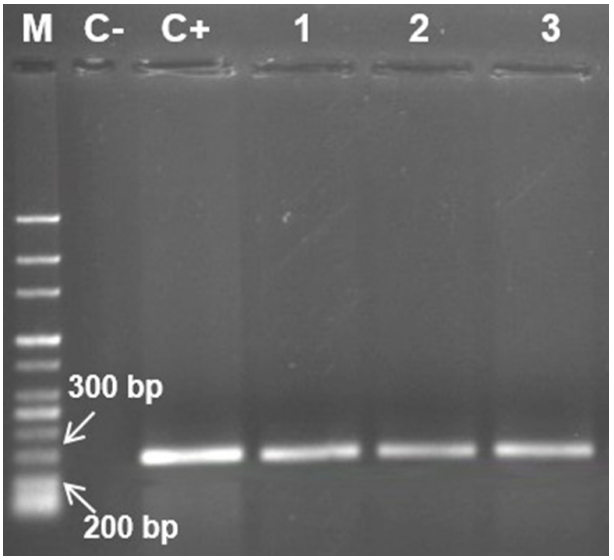
روش بررسی :

این مطالعه ی موردی- شاهدی بر روی ۵۲ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال که در طی یک سال از تاریخ ۹۴/۶/۱۲ تا ۹۵/۶/۱۲ در بخش جراحی بیمارستان الزهراء شهر اصفهان تحت عمل جراحی قرار گرفتند، انجام پذیرفت. به منظور انجام تست های مولکولی، بعد از گرفتن رضایت نامه اخلاقی از بیماران، نمونه گیری از بافت تازه ی ناحیه توموری و بافت سالم اطراف تومور انجام گرفت. نمونه ها به اندازه ۶- ۴ میلی متر تهیه و در شرایط استریل به آزمایشگاه مولکولی ارسال و کد گذاری شده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

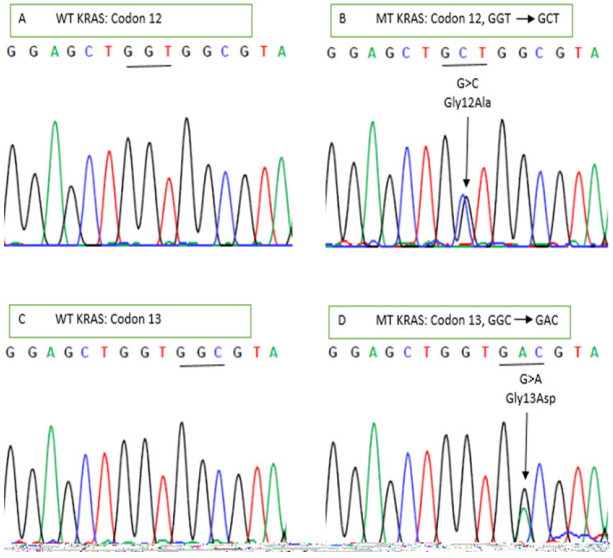
پس از بررسی های پاتولوژیکی ۵۷ نمونه ی توموری جراحی شده، در ۵ بیمار شواهد بدخیمی گزارش نشد و در نهایت با تأیید پاتولوژیست ۵۲ بیمار مبتلا به آدنوکارسینومای بدخیم مجوز ورود به مطالعه ی ما را کسب کردند. استخراج DNA ژنومی بافت تازه ی فریزشده بر اساس راهنمای کیت PrimePrep Genomic DNA Isolation Kit (from Tissue) از شرکت Genet bio ساخت کشور کره صورت پذیرفت. غلظت نمونه های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ سنجیده شد و DNA در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد تا در مرحله ی بعدی واکنش های زنجیره ای پلی مراز (PCR) انجام شود.

واکنش PCR در حجم µl ۲۵ و در غلظت های بهینه ی واکنشگرها، شامل DNA (۱۵۰-۸۰ نانوگرم)، آنزیم تک پلیمراز (۲ واحد)، MgCl2 (۱/۵ میلی مولار)، dNTP (۰/۲ میلی مولار) و زوج پرایمرهای اختصاصی (هرکدام ۱ پیکومول) برای تکثیر کدون ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS استفاده شد. پرایمرها توسط نرم افزار Oligo ۷ طراحی گردید و توالی DNA محدوده ی اگزون ۲ ژن KRAS توسط پرایمرهای اختصاصی KRAS-F

1. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
2. Familial Adenomatous Polyposis
3. Epidermal Growth Factor Receptor



شکل۲: تصویر ژل الکتروفوز محصول PCR بر روی اگزون شماره ۲ ژن KRAS. چاهک اول M مارکر مولکولی، چاهک دوم و سوم کنترل منفی(C-) و مثبت(C+)، سایر چاهک ها محصولات PCR



A و B: بترتیب توالی بافت نرمال اطراف تومور و بافت توموری در بیمار با جهش در کدون ۱۲
C وD: بترتیب توالی بافت نرمال اطراف تومور و بافت توموری در بیمار با جهش در کدون ۱۳

شکل۲: کروماتوگرام توالی نرمال و جهش یافته کدون های ۱۲ و ۱۳ در اگزون ۲ ژن KRAS با روش Sanger

باتوالی'۳-TGTGACATGTTCTAATATAGTCAC-'۵ و KRAS-R با توالی'۳-ATTATCTTGTAATAAGTACTCATG-'۵ تکثیر گردید.

شرایط واکنش PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون ابتدایی در دمای ۹۴ °C و به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۴ چرخه هرکدام شامل: دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۵۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه تنظیم شد. در انتهای واکنش دمای گسترش نهایی ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. محصول واکنش PCR با الکتروفورز در سطح ژل آگاروز ۲٪ مورد ارزیابی قرارگرفت. (شکل ۱) پس از اینکه کیفیت و طول باند و صحت PCR انجام شده تأیید شد، باند موردنظر با دقت زیر اتاقک UV برش داده شد و توسط کیت خالص سازی از روی ژل (ساخت شرکت Genet bio)، تخلیص شده و تعیین توالی گردید (Bioneer-Korea). آنالیز نتایج توالی یابی با نرم افزار Bioedite انجام شد و داده های توصیفی بیماران با نرم افزار SPSS و با استفاده از X2 (Chi-Square Test) و Fisher's Exact Test آنالیز گردید. *P*-value کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظرگرفته شد.

یافته‌ها:

این بررسی بر روی ۵۲ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال بین سنین ۸۷-۳۱ سال صورت پذیرفت. میانگین سنی بیماران ۱۳/۹±۶۱/۲ سال بود که از بین آنها ۱۰ نفر (۱۹/۲٪) در گروه سنی زیر ۵۰ سال قرار داشتند. کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS، در ۸ بیمار (۱۵/۴٪) دارای جهش هتروزیگوت در بافت توموری و در ۴۴ بیمار (۷۴/۶٪) حاوی ژن Wild Type KRAS بود. در بین بافت های نرمال اطراف تومور هیچگونه جهشی مشاهده نشد. (شکل ۲) میانگین سنی بیماران دارای جهش ۱۷/۶±۶۴/۶ سال بدست آمد که از میانگین سنی کل بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال بالاتر است.

از جامعه ی آماری ۵۲ نفره، ۲۹ نفر را مردان (۵۵/۸٪) و ۲۳ نفر را زنان (۴۴/۲٪) تشکیل دادند. ارتباط آماری معناداری بین وجود جهش ژن KRAS با جنسیت وجود نداشت (*P* =۰/۷۲). با این حال احتمال وجود جهش در زنان ۱/۲۶ برابر بیشتر از مردان بود. از کل ۱۰ نفر بیمار زیر ۵۰ سال ۲ نفر (۲۰٪) سابقه فامیلی مثبت داشتند و از ۴۲ بیماری که سن بالای ۵۰ سال داشتند تنها برای ۳ نفر (۷/۱٪) سابقه فامیلی مثبت گزارش شد. ارتباط آماری معنی داری بین وجود جهش و سابقه ی فامیلی وجود نداشت (*P* =۰/۳۲).

بر طبق آزمون های دقیق فیشر و کای اسکویر رابطه ی معنی داری بین وجود جهش با مرحله ی تومور (*P* =۰/۵۰) و درجه تمایز تومور (*P* =۰/۷۰) مشاهده نشد. در بررسی مرحله بیماری نتایج زیر حاصل شد: ۱۴ نفر در مرحله یک، ۱۵ نفر مرحله دوم، ۱۱ نفر مرحله سوم، ۴ نفر مرحله چهارم و ۸ نفر هم با مرحله بیماری نامشخص بودند. بیشترین فراوانی درجه تمایز تومور مربوط به ۲۲ بیمار (۴۲/۲٪) با تمایز متوسط (Moderately differentiated) بود.

نوع سرطان در تمامی موارد آدنوکارسینوما تشخیص داده شد و از بین بیماران، ۴ بیمار آدنوکارسینومای موسینی داشتند (۷/۷٪) و هر ۴ مورد در مردان دیده شد. براساس آزمون کای اسکویر، بین وجود جهش و تیپ (پاتولوژی) تومور رابطه معنی داری وجود نداشت(*P* =۰/۵۸).

شایع ترین محل آناتومی سرطان کولورکتال هم به ترتیب رکتوم با ۱۵ بیمار، رکتوسیگموید با ۱۲ بیمار، سیگموید ۱۲ بیمار، کولون راست ۶ بیمار، کولون عرضی ۴ بیمار، کولون چپ ۲ بیمار و سیگموید به

جدول۱: ارتباط وجود جهش های KRAS با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیکی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

متغیر		فراوانی (درصد) در کل جمعیت	فراوانی (درصد) در جهش ها	*P*-Value
جنس	مرد	۲۹ (۵۵/۸)	۴ (۵۰)	۰/۷۲
	زن	۲۳ (۴۴/۲)	۴ (۵۰)	
سن	۵۰<	۴۲ (۸۰/۸)	۶ (۷۵)	۰/۶۵
	۵۰>	۱۰ (۱۹/۲)	۲ (۲۵)	
محل تومور	رکتوم	۱۵ (۲۸/۸)	۱ (۱۲/۵)	۰/۰۹
	رکتوسیگموید	۱۲ (۲۳/۱)	۱ (۱۲/۵)	
	سیگموید	۱۲ (۲۳/۱)	۲ (۲۵)	
	کولون چپ	۲ (۳/۹)	۱ (۱۲/۵)	
	کولون راست	۶ (۱۱/۵)	۳ (۳۷/۵)	
	کولون عرضی	۴ (۷/۷)	-	
	کولون چپ+سیگموید	۱(۱/۹)	-	
مرحله تومور(TNM)	I	۱۴ (۲۶/۹)	۲ (۲۵)	۰/۵۰
	II	۱۵ (۲۸/۸)	۱ (۱۲/۵)	
	III	۱۱ (۲۱/۲)	۱ (۱۲/۵)	
	IV	۴ (۷/۷)	۲ (۲۵)	
	نامعلوم	۸ (۱۵/۴)	۲ (۲۵)	
درجه تمایز تومور	No diff.	۱۰ (۱۹/۲)	۲ (۲۵)	۰/۷۰
	Well diff.	۱۲ (۲۳/۱)	۲ (۲۵)	
	Moderately diff.	۲۲ (۴۲/۳)	۲ (۲۵)	
	Poorly diff.	۸ (۱۵/۴)	۲ (۲۵)	
پاتولوژی	آدنوکارسینوما	۴۸ (۹۲/۳)	۷ (۸۷/۵)	۰/۵۸
	موسینوس کارسینوما	۴ (۷/۷)	۱ (۱۲/۵)	
سابقه فامیلی	منفی	۴۷ (۹۰/۴)	۸ (۱۰۰)	۰/۳۲
	مثبت	۵ (۹/۶)	۰ (۰)	

همراه کولون چپ ۱ مورد گزارش شد و رابطه ی بین محل تومور و وجود جهش معنی دار نبود (P =۰/۰۹). در جدول ۱ خلاصه نتایج و ارتباط وجود جهش های KRAS با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک جمعیت مورد مطالعه ارائه گردیده است.

بحث :

در این پژوهش با بررسی ۵۲ بیمار با سرطان کولورکتال،۱۵/۴٪ موارد، موتاسیون های KRAS را داشتند که ۶ مورد در کدون ۱۲ و ۲ مورد در کدون ۱۳ این ژن مشاهده شد. تغییرات آمینواسیدی جهش ها در این مطالعه شامل: چهار مورد تغییر Gly12Asp و دو مورد Gly12Ala بود و تنها تغییر آمینواسیدی در دو جهش کدون ۱۳ از نوع Gly13Asp بود. نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده از سایر پژوهش ها در ایران و سایر کشورها مقایسه شد. در ایران بررسی های خانم سبحانی و همکاران بر روی ۵۹ بافت توموری، ۱۲ نمونه (۲۰/۳٪) دارای جهش های نقطه ای در ژن KRAS بودند. ۱۰ جهش مشاهده شده در کدون ۱۲ با تغییرات آمینواسیدی از نوع Gly12Ser یا Gly12Asp و یا Gly12Valو جهش های گزارش شده در کدون ۱۳ هم از نوع Gly13Val و Gly13Asp بودند.(۲۲) در مطالعه ی دیگری که توسط ایرانی شمیرانی و همکاران صورت گرفت، شیوع جهش KRAS را ۱۲/۵٪ گزارش کرده بودندکه ۸۵٪ آنها از نوع تغییر اسیدآمینه ای Gly12Asp بود.(۲۳) در پژوهش دکتر بیشه ساری و همکاران، ۶۸ مورد (۳۷/۴٪) از ۱۸۲ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال جهش های KRAS را در کدون های ۱۲ و ۱۳ و ۶۱ خود نشان دادند. ۶۶٪ این جهش ها در کدون ۱۲ و ۳۲/۵٪ مربوط به کدون ۱۳ بوده است. بیشترین نوع تغییر اسیدآمینه در کدون ۱۳ از نوع

G13D و در کدون ۱۲ هم G12V و G12D گزارش شد.(۲۴) سه مطالعه ی مذکور با نتایج ما مطابقت داشتند.

در جوامع غربی و سایر کشورها شیوع جهش های KRAS بیشتر گزارش شده است. طبق مطالعات ارزشمند تانگ[1] و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی ۱۵۰۶ بیمار مبتلا به کولورکتال کانسر، جهش در ۴ کدون KRAS ۴۴/۵٪ گزارش شد که ۷۵/۱٪ جهش ها در کدون ۱۲ و ۱۹/۳٪ در کدون ۱۳ دیده شد. بیشترین جهش در مطالعه ی تانگ تبدیل گلیسین به آسپارتیک اسید بود (G12D)که ۳۷/۵٪ کل جهش ها را شامل می شد.(۲۵) در مطالعه جدیدی که مارتینتی[2] و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور آلبانی بر روی ۱۵۹ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال انجام پذیرفت، میزان شیوع جهش های KRAS و BRAF به ترتیب ۱۷/۶٪ و ۶/۳٪ گزارش شد (۲۶) که به نتایج ما نزدیک است. در این مطالعه همانند مطالعه ی ما هیچ رابطه ی آماری معنی داری بین وجود جهش با پارامترهای کلینیکوپاتولوژیکی مختلف وجود نداشت. در مطالعه ی ثمیر[3] و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۳ نمونه ی توموری ۱۲ نمونه (۲۲/۶۴٪) جهش KRAS داشتند که هیچ رابطه معنی داری بین وجود جهش و سن و جنس و محل تومور وجود نداشت اما جهش ها با مراحل بالای تومور و تیپ موسینی آدنوکارسینوما رابطه ی معنی داری داشتند.(۲۷) در پژوهشی که میکامی[4] و همکاران در ژاپن انجام دادند، از بین ۳۱۰ نمونه ۲۱/۶٪ جهش های KRAS را نشان دادند.(۲۸) بیشترین فراوانی جهش ها در تمامی مطالعات اشاره شده مربوط به جهش G12D ژن KRAS بود.

میانگین سنی در مطالعه ی ما ۶۱/۲ بود که نزدیک به مطالعات انجام گرفته توسط پژوهشگران در بسیاری نقاط ایران است. مطالعه ای که دکتر صومی و همکاران بر روی سرطان های دستگاه گوارش در سال ۲۰۱۴ در آذربایجان شرقی انجام دادند میانگین سنی ۵۹/۴ گزارش شد.(۲۹) در تبریز، دولت خواه و همکاران میانگین سنی بیماران را ۶۱/۷۷ گزارش دادند.(۳۰) در اردبیل، بابایی و همکاران در سال ۲۰۰۹ این میزان را ۵۹/۸ گزارش کردند.(۳۱) همچنین مطالعه ی دیگری در یزد میانگین سنی را ۶۰/۰۷ محاسبه کردند.(۳۲)

بررسی جهش در کدونهای گلیسین ۱۲ و ۱۳ و تأثیر آن بر پیش آگهی سرطان از اهداف این مطالعه بود. این دو کدون جهش یافته، دمین اتصال به فسفات(P-loop) ساختار پروتئین KRAS را تحت تأثیر قرار داده و ضمن حذف فعالیت GTPase این پروتئین، باعث اتصال گروه های فسفات به RAS و افزایش مستمر سطح سیتوپلاسمی RAS-GTP می گردند. بدین ترتیب آبشارهای پیام رسانی پایین دست در غیاب گیرنده های تیروزین کینازی مثل EGFR پیوسته تحریک می شوند تا افزایش چرخه سلولی، تومورزایی را سرعت بخشد.(۳۳) مطالعات متعددی نشان داده است که تست تشخیصی KRAS/BRAF قبل از درمان بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال با داروهای Anti-EGFR، عدم پاسخ به درمان های Anti-EGFR را پیشگویی می کند.(۳۸-۳۴) به این ترتیب می توان از سمیت القاشده توسط این داروها جلوگیری کرد و هزینه های سنگین درمان را کاهش داد. مطالعات قبلی نشانگر رابطه مستقیم بین موتاسیون های KRAS و مقاومت دارویی بیماران بود به طوری که بیمارانی به درمان با Cetuximab پاسخ داده بودند که در ژن KRAS آنها جهشی مشاهده نگردیده بود. بنابراین بررسی ژن KRAS ارزش پیش آگهی بالایی در شکست هدفمند درمانی با Cetuximab نشان داده است.(۳۶, ۳۹)

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۶ در کشور فنلاند انجام شد، جهش در ژن های KRAS، NRAS، BRAF، PIK3CA را بر روی مبتلایان به سرطان کولورکتال آنالیز کردند و ۱۸/۲٪ بیماران جهش KRAS را داشتند که به گزارش ما نزدیک بود. در نمونه هایی که دارای جهش های چندگانه از ژن های مذکور بودند درصد پاسخ به داروهای Anti-EGFR و طول عمر بیماران بشدت کاهش می یافت.(۴۰)

مطالعات اخیر با استفاده از روش NGS بر روی نمونه های CRC حاصل از ۵۱ بیمار، نشانگر فراوانی قابل توجه جهش در ژن‌های MSH6، APC، MSH3 و PIK3CA در جمعیت شیراز بود، و تنها ۲٪ از این نمونه ها جهش در ژن KRAS نشان دادند(۴۱)، در حالی که یافته های این پژوهش نشانگر شیوع قابل توجه (۱۵/۴٪) جهش مذکور در بیماران CRC اصفهان بود.

نتیجه گیری :

در مطالعه ی ما ۱۹/۲ درصد بیماران در سنین زیر ۵۰ سال قرار داشتند که نسبت به جوامع غربی (۲-۸ درصد) آمار بالایی است.(۴) با توجه به مشکلاتی که در تهیه نمونه های انسانی وجود دارد، قادر بودیم تعداد نسبتاً محدودی نمونه تهیه نماییم. در این پژوهش از مجموع ۵۲ بیمار، ۱۵/۴٪ جهش در KRAS را نشان دادند. این میزان در مطالعاتی که در مناطق مختلف ایران صورت گرفته از ۱۲/۵ تا ۳۷/۵ درصد گزارش شده است که با نتایج ما مطابقت دارد. بیشترین تغییرات آمینواسیدی گزارش شده در جهان و ایران مربوط به تغییر اسیدآمینه گلایسین به آسپارتیک اسید در کدون ۱۲ ژن KRAS بود. در مطالعه ی ما نیز از مجموع ۸ جهش نیمی از آنها (۵۰٪) مربوط به G12D می باشد و تنها دو مورد از نوع G12A و دو مورد هم از نوع G13D می باشد. در پژوهش حاضر ۷۵٪ جهش ها در سنین بالای ۵۰ سال رخ داده و هیچکدام از بیماران دارای جهش، سابقه ی فامیلی مثبت نداشتند. بنابراین وجود یا عدم سابقه فامیلی در فراوانی جهش در کدون های ۱۲ و ۱۳ نقش قابل توجهی ندارد. همچنین هیچگونه رابطه ی معنی داری بین وجود جهش با سایر تظاهرات کلینیکوپاتولوژیکی مثل سن و جنس و محل تومور، مرحله ی تومور و درجه ی تومور دیده نشد. از آنجا که جهش های KRAS در مراحل ابتدایی مسیر ژنتیکی آدنوم-کارسینوما رخ می

1. Joanna HM Tong
2. Daniela Martinetti
3. Sameer
4. Mikami

دهند، (۴۲) بنابراین انجام به موقع تست شناسایی جهش های KRAS ، علاوه بر افزایش شانس بقای بیمار و کاهش هزینه های درمانی، می تواند به عنوان یک فاکتور پیش بینی مقاومت به داروهای Anti-EGFR مدنظر قرارگیرد.

سپاسگزاری :

بدینوسیله از جراحان محترم بیمارستان الزهراء اصفهان دکتر مهاجری، دکتر طباطبایی، دکتر هاشمی و تکنسین اتاق عمل سرکار خانم زهرا شیرانی جهت همکاری در تهیه ی نمونه های توموری صمیمانه سپاسگزاریم.

REFERENCES:

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.
2. Shadi Kolahdoozan MD M, Alireza Sadjadi MD M, Radmard AR, Hooman Khademi MD M. Five common cancers in Iran. *Arch Iran Med* 2010;13:143-6.
3. Mohammadianpanah M. Characteristics of the patients with colorectal cancer: epidemiologic study or pathology report-based study. *Iran Red Crescent Med J* 2014;17:e17899.
4. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran: a review. *Arch Iran Med* 2009;12:161-9.
5. Mehrabani D, Tabei S, Heydari S, Shamsina S, Shokrpour N, Amini M, et al. Cancer occurrence in Fars Province, Southern Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2008;2008:314-22.
6. Akrami S. Genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Arch Iran Med* 2006;9:381-9.
7. Abbaszadegan MR, Tavasoli A, Velayati A, Sima HR, Vosooghinia H, Farzadnia M, et al. Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran. *World J Gastroenterol* 2007;13:1528-33.
8. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:459-65.
9. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras:'it ain't over'til it's over'. *Trends Cell Biol* 2000;10:147-54.
10. Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:150960.
11. Forrester K, Almoguera C, Han K. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987 3;327:298-303.
12. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Engl J Med* 1988;319:525-32.
13. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti–epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2091-6.
14. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cance Lancet Oncol 2011;12:594-603.
15. Diaz Jr LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486:537-40.
16. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486:532-6.
17. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan–de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-7.
18. 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;40:1589-98.
19. Chipperfield R, Jones S, Lo K, Weinberg R. Activation of Ha-ras p21 by substitution, deletion, and insertion mutations. *Mol Cell Biol* 1985;5:1809-13.
20. Seeburg PH, Colby WW, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 1984;312:71-5.
21. 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.
22. Sobhani S, Ghaffarpour M, Mostakhdemin Hosseini Z, Kamali F, Nour Mohammadi 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;8:201-8.
23. Shemirani AI, Haghighi MM, 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.
24. 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-vii6.
25. Tong JH, Lung RW, Sin FM, Law PP, Kang W, Chan AW, et al. Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2014;15:768-76.
26. 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.
27. Sameer A, Chowdhri N, Abdullah S, Shah Z, Siddiqi M. Mutation pattern of K-ras gene in colorectal cancer patients of

Kashmir: a report. *Indian J Cancer* 2009;46:219-25.
28. Mikami M, Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, Maehata T, Taniguchi H, et al. Mutational analysis of β-catenin and the RAS-RAF signalling pathway in early flat-type colorectal tumours. *Eur J Cancer* 2006;42:3065-72.
29. 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.
30. Dolatkhah R, Somi MH, Kermani IA, Ghojazadeh M, Jafarabadi MA, Farassati F, et al. Increased colorectal cancer incidence in Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2015;15:997.
31. Babaei M, Jaafarzadeh H, Sadjadi A, Samadi F, Yazdanbod A, Fallah M, et al. Cancer incidence and mortality in Ardabil: Report of an ongoing population-based cancer registry in Iran, 2004-2006. *Iran J Public Health* 2009;38:35-45.
32. Vakili M, Pirdehghan A, Adimi M, Sadeghian M, Akhondi M. Epidemiology and Trend of Cancer in Yazd, a Central Province of Iran, 2005-2009. *J Res Health Sci* 2014;14:210-3.
33. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997;277:333-9.
34. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-34.
35. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New Engl J Med* 2008;359:1757-65.
36. Lievre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-5.
37. Van Cutsem E, Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *New Engl J Med* 2009;360:1408-17.
38. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011;29:2011-9.
39. Lièvre A, Bachet J-B, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-9.
40. Algars A, Sundström J, Lintunen M, Jokilehto T, Kytölä S, Kaare M, et al. EGFR gene copy number predicts response to anti-EGFR treatment in RAS wild type and RAS/BRAF/PIK3CA wild type metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2017;140:922-9.
41. Ashktorab H, Mokarram P, Azimi H, Olumi H, Varma S, Nickerson M, et al. Targeted exome sequencing reveals distinct pathogenic variants in Iranians with colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8:7852-7866.
42. Nash GM, Gimbel M, Cohen AM, Zeng Z-S, Ndubuisi MI, Nathanson DR, et al. KRAS mutation and microsatellite instability: two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010;17:416-24.