مقاله
پژوهشی

ارزیابی نوع و میزان جهش در ژن KRAS بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ

معصومه تیموری[1]، محمود تولایی[2]، علی زارعی محمودآبادی[3*]،
سمیه چاووشی[4]، حمید راشدی[5]

[1]ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[2]دکتری بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[3]دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[4]ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی، گروه زیست شناسی داشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[5]دکتری مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی، گروه بیوتکولوژی دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[*]**نویسنده مسئول:** گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
پست الکترونیک: alizaremah2014@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *سرطان کلورکتال یکی از رایج ترین انواع سرطان شناخته شده در دنیا و ایران بوده و درصد مرگ و میر زیادی دارد در بین تمام ژن هایی که در مسیر سرطان زایی کولون، جهش می یابند ژن KRAS دارای اهمیت تشخیصی بالایی است. اغلب جهش های KRAS موثر در بروز سرطان در کدون های ۱۲ و ۱۳ رخ می دهد. بنابراین بررسی نوع و میزان جهش این ژن در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال از نظر انتخاب پروتکل درمانی مناسب اهمیت زیادی دارد.*

مواد و روش کار: *نمونه بافت و سرم ۳۵ بیمار مبتلا به سرطان کلورکتال دارای شرایط ورود به مطالعه تهیه و DNA آنها استخراج گردید. سپس پرایمر های کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS طراحی و سنتز شد و از تکنیک qPCR به عنوان تکنیک مورد نظر برای تعیین محل و نوع موتاسیون های ژن KRAS استفاده شد. به کمک نرم افزار SPSS 20، آنالیز آماری صورت گرفت و مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.*

یافته ها: *تحلیل آماری صورت گرفته در این مطالعه میزان شیوع موتاسیون ژن KRAS ۳۷/۱ ٪ بدست آمد. میزان موتاسیون در کدون های ۱۲ و ۱۳ به ترتیب ۶۹/۲ ٪ و ۳۰/۸ ٪ بدست آمد. احتمال وجود جهش در ژن KRAS در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال با درجه بدخیمی بالا نسبت به درجه بدخیمی پایین ۱/۱۴ برابر بیشتر می باشد.*

نتیجه گیری: *آنالیز موتاسیون KRAS یک وسیله تشخیصی مناسب برای این سرطان بوده و نتایج قابل توجهی در خصوص پیش آگهی درمان بدست می دهد. با توجه به سن شیوع بیماری در ایران، برنامه های غربالگری و پیش گیری و ارائه پروتکل های درمانی موثر بسیار مهم می باشد.*

واژه های کلیدی: *KRAS، سرطان کلورکتال، موتاسیون، qPCR*

وصول: ۹۴/۱۲/۱۲
اصلاح: ۹۵/۰۳/۱۲
پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۳

DOI: *http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1121-fa.html*
Cite this article as: *Teimouri M, Tavalaee M, Zarei mahmodabadi A, Chavoshi S, Rashedi H. Evaluation of The Type and Extent of KRAS Gene Mutations Colorectal Cancerous Patients in Baqiyatallah Hospital(1393-1394) . JNKUMS. 2017; 9 (1) :43-54*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹، دوره ۹ (۱): ۵۴-۴۳
Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2017;9(1): 43-54

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

مقدمه

سرطان کلورکتال(CRC) سومین سرطان شایع در مردان و دومین در زنان و چهارمین سرطان از نظر مرگ و میر در جهان است [۱]. در ایران CRC سومین سرطان شایع در مردان و پنجمین در زنان است که در سالیان اخیر با تغییر شیوه زندگی شیوع آن افزایش یافته است [۲]. پیشرفت سرطان کلورکتال یک فرایند چند مرحله ای است که با تغییرات ژنتیکی همراه است [۳]. تبدیل سلول نرمال اپی تلیوم کلونی به سلول سرطانی با فعال شدن انکوژن ها و غیر فعال شدن ژن های تومور ساپرسور مشخص می گردد.

پروتئین KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) یک GTPase کوچک است که در هدایت سیگنال داخل سلولی نقش مهمی را بر عهده دارد. این ژن عضو مسیر MAP کیناز (MAPK) می باشد [۴]. موتاسیون در KRAS موجب کاهش فعالیت پروتئین این ژن شده و در نتیجه فعالیت GTPase کاهش می یابد [۵] موتاسیون های خاص در ژن KRAS منجر به تشکیل پیوسته پروتئین فعال و تشدید سیگنال های تکثیر و یا افتراق حتی در غیاب تحریکات خارج سلولی می شود [۶]. موتاسیون های نقطه ای در اگزون های ۲ و ۱ ژن KRAS مسئول تبدیل سلول به فرم بدخیم است. فعال شدن موتاسیون ها در KRAS شایع ترین موتاسیون های موجود در سرطان های انسانی است [۷] ۹۵ ٪ جهش ها در کدون ۱۲ و ۱۳ می باشد که حدود ۸۰ ٪ در کدون ۱۲ و ۱۵ درصد در کدون ۱۳ اتفاق می افتد. دیگر جهش ها در کدون ۶۱ و ۱۴۶ و ۱۵۴ فراوانی کمتری در سرطان کلورکتال دارند [۸] موتاسیون در کدون های ۱۲ و ۱۳ منجر به تغییر در پروتئین Rasشده و در نتیجه مقاومت نسبت به فعالیت GTPase افزایش [۹-۱۰] و GTP به مدت طولانی متصل به پروتئین باقی می ماند بنابراین Ras موتانت رشد و تکثیر سلول را تشدید [۹] و مسیر های RAS/RAF/MAPK و فسفو اینو زیتید۳-کیناز-AKT را نیز فعال می کند. ارتباط بین فعالیت پایدار مسیر سیگنالینگ RAS/RAF/MAPK و پیش آگهی CRC قبلا از طریق مطالعه ارزیابی ارتباط بین پروتئین موتان BRAF و میزان زنده ماندن بیمار CRC تائید شده است [۱۱-۱۳]. مطالعات قبلی ارتباط بین موتاسیون های مختلف KRAS و طول مدت حیات در CRC را گزارش داده اند بر اساس این گزارشات موتاسیون در p.G12V در میزان حیات بیمار موثر بوده [۱۴] ولی موتاسیون در کدون ۱۳ بدون تأثیر است.

چندین مطالعه در مراحل مختلف بیماری و در حالت متاستاتیک مشخص کرده است که از نوع موتاسیون موجود در KRAS می توان به عنوان یک مارکر پیش آگهی دهنده در خصوص پاسخ بیمار به درمان آنتی بادی بر علیه گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، EGFR (وقتی جهش KRAS بطور ساختاری فعال می شود مسیر EGFR بلوکه شده، درنتیجه انتقال سیگنال آبشاری مسیر MAPK دچار اختلال می شود) استفاده کرد [۱۵-۱۶] نتایج یک مطالعه متا آنالیز عدم پاسخ مشاهده شده به درمان آنتی بادی بر علیه EGFR در مراحل مختلف بیماری را موتاسیون ژن KRAS عنوان می کند. یک مطالعه بالینی روی بیماران فاز III سرطان کلورکتال، با افزودن سلکوکسیب به درمان استاندارد بیماران، موجب افزایش سه سال به عمر بیماران فوق صرف نظر از نوع موتاسیون KRAS گردید [۱۷] این نتایج بیانگر تاثیر نوع موتاسیون KRAS در پاسخ بیمار به درمان است.

هدف از مطالعه حاضر تعیین نوع و فراوانی موتاسیون های ۱۲ و ۱۳ در بیماران مبتلا به CRC مراجعه کننده به یک مرکز درمان در یک مطالعه مقطعی به منظور بهینه کردن پروتکل درمانی می باشد.

روش کار

در این مطالعه از نمونه های خون و بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال که ابتلای آنها توسط آسیب شناسی مورد تأیید قرار گرفته بود و نیاز به عمل جراحی داشتند جمع آوری شد. کیت استخراج DNA ژنومی (از شرکت کیاژن www.kiagen-biotech.com) تهیه شد. پرایمر پس از طراحی توسط شرکت سیناکلون (کشور ایران) (www.sinaclone.ir) سنتز گردید. مواد و کیت PCR و مواد الکتروفروز نیز توسط شرکت سینا کلون تهیه گردید. پرایمرهای کدون ۱۲ و ۱۳ توسط برنامه BLAST با توالی اصلی ژن که در سایت NCBI ذکر

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

شده است مورد بررسی قرار گرفت و جهت اطمینان از طول قطعه تکثیر شده به منظور تأیید ژن مورد نظر توسط برنامه GENE RUNNER ارزیابی گردید. طراحی پرایمر ها به نحوی تنظیم شده است که متوسط محصول PCR آنها طول ۲۲۰ جفت باز باشد و متوسط Tm بین ۵۴ تا ۶۳ درجه سانتیگراد باشند. پرایمرها با پروب برای آلل نوع وحشی (کنترل اندوژن DNA که بطور همزمان به عنوان شاهد برای ظرفیت ازدیاد نمونه) و یک پروب ویژه نشاندار شده با رنگ FAM برای آلل موتاسیون یافته نشاندار و برای سنتز سفارش داده شدند.

نمونه خون و بافت توموری ۳۵ فرد مبتلا به CRC، مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله الاعظم جمع آوری گردید. برای این منظور جهت جمع آوری نمونه از افراد مورد مطالعه در این پژوهش پس از کسب رضایت آگاهانه حدود ۵ میلی لیتر از خون محیطی و بافت توموری به اندازه ۳-۵ میلی متر گرفته و خون را به لوله های استریل حاوی EDTA و بافت به لوله های استریل حاوی ازت مایع منتقل گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش ذخیره شدند. در تمامی بیماران نمونه های بافت و خون بعد از بیهوشی و قبل از انجام عمل جراحی گرفته می شود. تشخیص بیماری سرطان کلورکتال توسط پزشک و تأیید بخش پاتولوژی انجام گرفت.

DNA نمونه های خونی با استفاده از نمک های کائوتروفیک و بر طبق پروتکل جداسازی شد. در خصوص نمونه های بافت مقدار۱۰۰ میلی گرم بافت توسط ازت مایع پودر و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آن به میکروتیوب منتقل و میزان ۲۰۰ میکرولیتر DNG (G:GENERAL DNA) افزوده و ۱۵ ثانیه ورتکس سپس ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه گردید لایه شیری رنگ حاصل DNA است که داخل فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

جدول۱: پرایمر های طراحی شده (رفت و برگشت) برای ژن KRAS

codon	F-Primer	R-Primer	Poduct size bp
۱۲	3′GTTGTGGTAGTTGGAGCTGTT GGCGTAGGCAAGAATGCC5′	3′GGCACTCTTGCCTACGCCAA CAGCTCCAACTACC ACAAG5′	۲۲۰
۱۳	3′GGTAGTTGGAGCTGGTGACGT AGGCAAGAGTGCC5′	3′GGCACTCTTGCCTACGTCAC CAGCTCCAACTACC5′	۲۲۰

جدول ۲: ترکیب های استفاده شده برای هر نمونه

ردیف	ترکیب تیوب
ترکیب ۱	کنترل منفی نرمال
ترکیب ۲	کنترل منفی کدون۱۲
ترکیب ۳	کنترل منفی کدون ۱۳
ترکیب ۴	کنترل مثبت کدون ۱۲
ترکیب ۵	کنترل مثبت کدون ۱۳
ترکیب ۶	تکثیر پروب پرایمر نرمال مربوط به نمونه بیمار
ترکیب ۷	تکثیر پروب پرایمر کدون ۱۲ مربوط به نمونه بیمار
ترکیب ۸	تکثیر پروب پرایمر کدون ۱۳ مربوط به نمونه بیمار

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

(کیت استخراج سیناکلون، کشور ایران) به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفروز نمونه های DNA بر روی ژل آگارز و دستگاه نانو دراپ استفاده گردید.

qPCR تکنیک مبتنی بر real time PCR و کیفی برای سنجش میزان DNA اولیه در یک روند تکثیر DNA در PCR است در مطالعه حاضر از این تکنیک برای بررسی کیفی ایجاد موتاسیون در کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن مورد مطالعه استفاده شد. برای این منظور با استفاده از پرایمر های اختصاصی کدون های ۱۲ و ۱۳ واکنش PCR برای تمام نمونه ها انجام شد.

ابتدا میزان واکنش دهنده های لازم در PCR (Buffer10 X، dNTP، Mgcl2 ، پرایمرها، Taq DNA Polymerase و آب مقطر) برای نمونه ها ی بیمار، نمونه بدون DNA (کنترل منفی)، نمونه کنترل مثبت (نمونه دارای جهش کدون ۱۲ و ۱۳) محاسبه شد. در واقع با Master mix و هر یک از پرایمر ها بهمراه آب یک استوک تهیه گردید. بعد از آماده سازی محلول Master Mix برای PCR برای هر یک نمونه های بیمار که شامل (PCR Mix ، آب مقطر، مخلوط پروب پرایمر و الگو) به ازای هر نمونه هر بیمار ۸ ترکیب مختلف به صورت زیر تهیه شد.

حجم نهایی هر نمونه ۲۰ میکرولیتر ۴۰ چرخه های PCR انجام شد و در پایان PCR نمودار هر نمونه ثبت گردید در نهایت روی محصول PCR الکتروفورز آگارز انجام شد.

با استفاده از نرم افزار SPSS 20، آنالیز نتایج صورت گرفت و مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از الکتروفروز DNA استخراج شده از نمونه های بافت بیانگر صحت اجرای تکنیک و تخلیص مناسب DNA است (شکل ۱).

بعد از استخراج DNA از نمونه های بیمار، با استفاده از پرایمرهای تخصصی و تکثیر توسط PCR، منحنی های مربوط به هر نمونه در صفحه مانیتور نمایش داده شد. لازم به ذکر است که در تمامی نمونه ها می بایست منحنی مربوط به نرمال، افزایش یابد در غیر اینصورت استخراج DNA نمونه به درستی انجام نشده است و باید کل نمونه از پروسه آزمایشات خارج گردد. تمامی نمونه های مربوط به بافت تکثیر شدند و منحنی مربوط به شرایط مختلف نرمال و جهش یافته در مانیتور به تصویر کشیده شده است (شکل ۲ و ۳). برای تائید صحت روند PCR محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل بیانگر تکثیر محصول PCR است (شکل۴)

آنالیز نتایج حاصله از این مطالعه بر مبنای کمی سازی اطلاعات مربوط به وضعیت جهش کدون ۱۲ و ۱۳ بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال با توجه به معیار های جنسیت، سن، سابقه ژنتیکی بیماری، وجود جهش ژن KRAS صورت گرفت. با توجه به اطلاعات فردی بیمار شرکت کننده در این مطالعه، قبل از تجزیه و تحلیل نتایج موتاسیون آمار توصیفی بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین ۳۵ نمونه بافت که در مورد ژن KRAS از طریق PCR تقویت شدند ۱۳ (۳۷/۱٪) بیمار دارای جهش هتروزیگوت ژن KRAS در بافت توموری و ۲۳ (۶۲/۹ ٪) بیمار حاوی ژن Wild Type KRAS بودند(نمودار ۱)

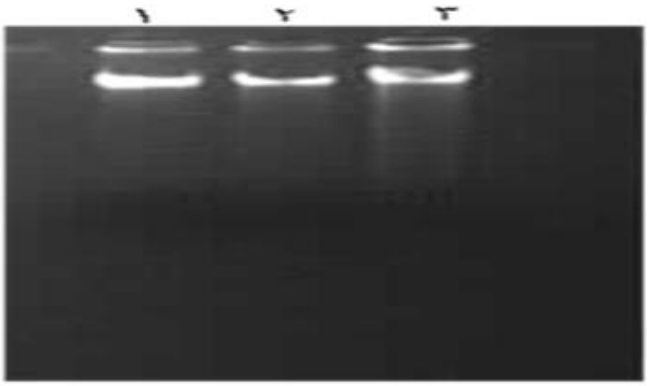
هیچ یک از نمونه های بیماران مورد مطالعه جهش هموزیگوت در مورد ژن KRAS نداشتند. ۶۹/۲ ٪ نمونه ها حامل جهش در کدون ۱۲ و ۳۰/۸ ٪ حامل جهش در کدون ۱۳ ژن KRAS بودند. (نمودار۲)

لازم به ذکر است نمونه های دارای جهش کدون ۱۲ یا ۱۳ براساس پرایمر طراحی شده در هر جهش بطور مجزا، منحنی مربوطه را در نتایج نهایی PCR نمایش داده شدند.

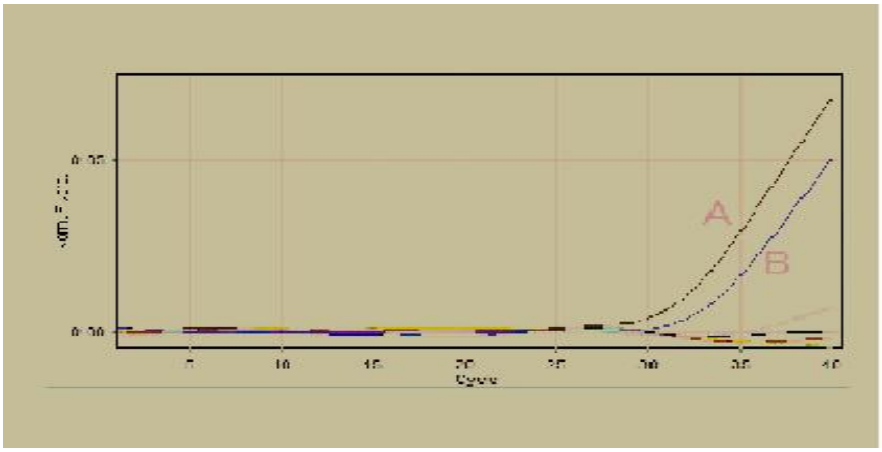
بحث

KRAS یک عضو مهم از خانواده آبشار سیگنالینگ EGFR است. موتاسیون های فعال کننده KRAS از جمله معمول ترین موتاسیون ها در سرطان های انسانی هستند [۱۸]. موتاسیون در کدون های ۱۲ و ۱۳ منجر به تغییر در پروتئین Ras می شود که نسبت به فعالیت GTPase مقاوم بوده [۹] و منجر به ماندگاری طولانی مدت فرم فعال متصل به GTP شده در نتیجه منجر به تشدید رشد و تکثیر سلول [۹] می شود. موتاسیون های BRAFو KRAS هر دو در مراحل اولیه سرطان های کلورکتال رخ می دهند ولی به ندرت با هم مشاهده می

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

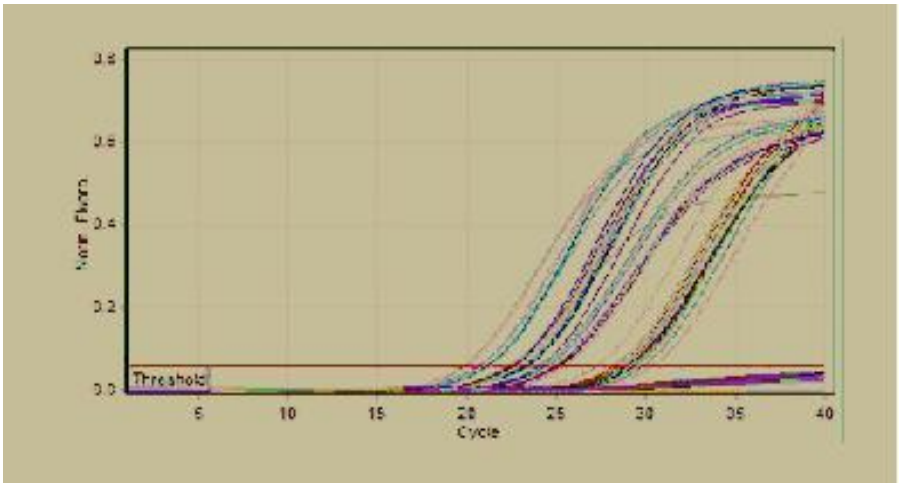


شکل۱: ژل آگارز مربوط به استخراج DNA از نمونه های بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال
ستون های ۱ و ۲ و ۳ معرف محصولات استخراج DNA از نمونه های بافت بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال می باشد.

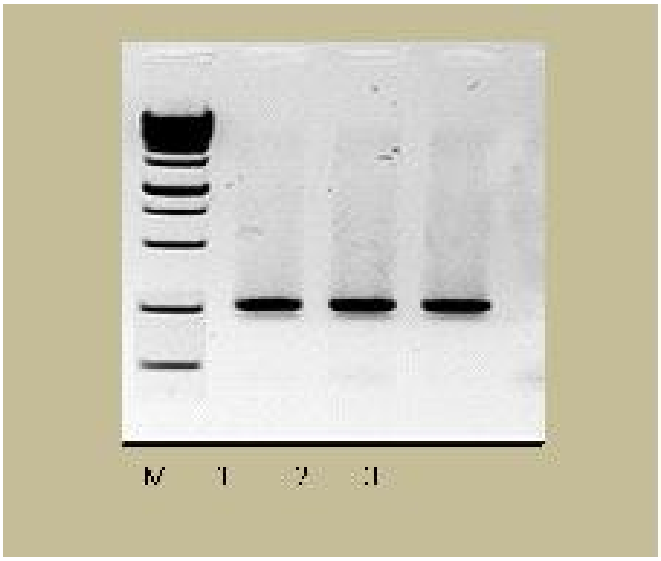


شکل۲: منحنی PCR مربوط به تکثیر DNA یک نمونه بافت. در این نمونه منحنی A مربوط به حالت نرمال نمایان شده است و در عین حال منحنی B مربوط به کدون ۱۳ در نمونه الگو نمایان شده که نشان دهنده وجود جهش در کدون ۱۳ این نمونه می باشد..

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

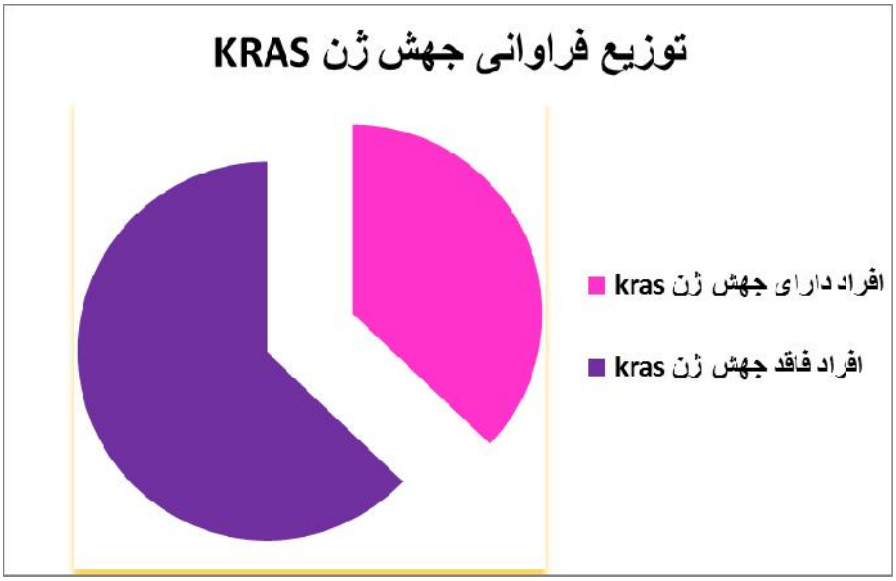


شکل۳: گراف مربوط به مجموعه نمونه های بافت تکثیر شده در تکنیک qPCR

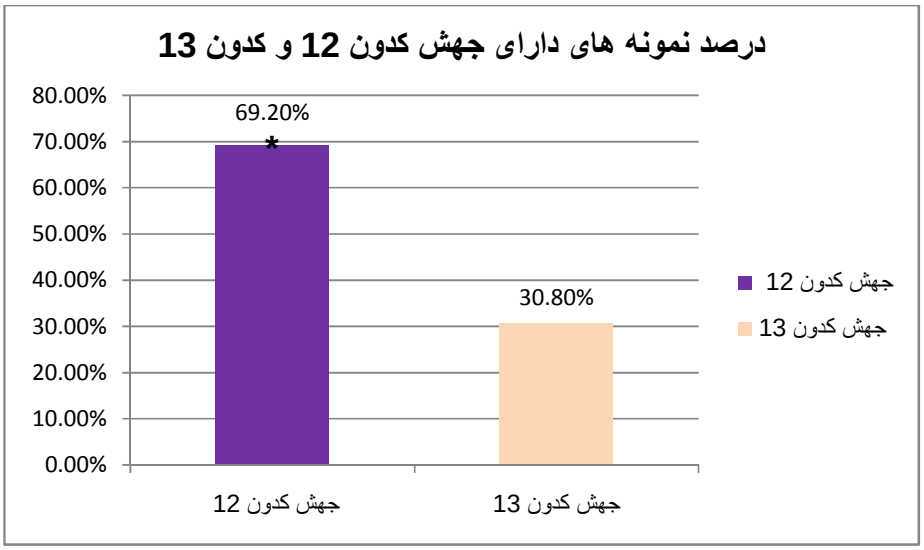


شکل ۴: الکتروفروز محصول PCR نمونه های جهش یافته با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به کدون ۱۲ و ۱۳ روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستونهای M: معرف Molecular marker و ۱، ۲، ۳: معرف محصولات PCR نمونه های بافت ژن KRAS می باشد.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]



نمودار۱: توزیع فراوانی جهش ژن KRAS



نمودار۲: مقایسه درصد نمونه های دارای جهش کدون ۱۲ و کدون ۱۳ ژنKRAS در بیماران مبتلا به CRC منحنی سفید نشان دهنده درصد نمونه های است که در بین بیماران دارای جهش KRAS، جهش کدون ۱۲ را دارند. منحنی سیاه مربوط به درصد نمونه هایی است که در بین بیماران دارای جهش ژن KRAS، دارای جهش در کدون ۱۳ هستند. *۰/۰۵≥p جهش در کدون ۱۳ نسبت به ۱۲ معنی دار است.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

شوند. چندین مطالعه در مراحل مختلف بیماری و شرایط متاستاتیک نشان داده است که نهایتاً حالت های موتاسیون KRAS به عنوان یک مارکر پیشگویی کننده برای پاسخ به درمان با آنتی بادی ضد EGFR است آقای ایمارو و همکاران اخیراً ارتباط کم بین موتاسیون ۱۳ با میزان زنده ماندن بیماران و نقش پررنگ تر موتاسیون کدون ۱۲ در پیشرفت سرطان کلورکتال گزارش داده اند [۱۹-۲۰]

براساس نتایج حاصل از مطالعات مختلف از KRAS به عنوان بیومارکر ارزیابی درمان اختلالات مختلف به کمک داروهای آنتی بادی بر علیه EGFR استفاده شده است. در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار ارزش این ژن در مطالعه لیور[1] و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۱] نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که موتاسیون در ژن KRAS مانع از تأثیر Cetuximab می شود این نتایج در مطالعات بعدی نیز مورد تائید قرار گرفت [۲۳-۲۲] در حالی که میزان تأثیر Cetuximab در بیماران فاقد موتاسیون KRAS بهتر است [۲۵-۲۴]. بر اساس این نتایج شبکه جامع بین المللی سرطان (NCCN) و جامعه انکولوژی بالینی آمریکا (ASCO) ارزیابی موتاسیون ژن KRAS را در بیماران CRC پیشرفته توصیه کردند و این تست ها قبل از تجویز آنتی بادی مونوکلونال بر علیه EGFR انجام شود و در صورت وجود موتاسیون در کدون های ۱۲ و ۱۳ از تجویز آنتی بادی بعنوان بخشی از درمان آنها خودداری شود.

مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک qPCR نوع و فراوانی موتاسیون های کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS در بیماران مبتلا به CRC مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله (عج) در (سال ۹۴-۹۳) مورد ارزیابی قرار گرفت . بر اساس نتایج حاصل میزان کلی موتاسیون در ژن KRAS ۳۷/۱ ٪ بود که معادل ۶۹/۲ ٪ جهش جهش در کدون ۱۲ و ۳۰/۸ ٪ در کدون۱۳ می بود. احتمال وجود جهش در ژن KRAS در بیماران درجه بدخیمی بالا ۱/۱۴ برابر بیماران با درجه بدخیمی پایین تر بود. طبق گزارش خانم سبحانی و همکاران (سال ۸۹) ۲۰/۳ ٪ از بیماران مورد مطالعه دارای جهش در کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS بودند [۲۶] نتایج حاصل از این بررسی افزایش معنی داری را در مقایسه با مطالعه خانم سبحانی نشان می دهد. شاید دلیل این تفاوت به علت استفاده از دو روش متفاوت می باشد در مطالعه خانم سبحانی از روش تعیین توالی برای بررسی وجود موتاسیون استفاده شده است ولی در مطالعه حاضر از qPCR استفاده شده است ولی نتایج این بررسی با نتایج سایر مطالعات گزارش شده هم خوانی دارد.

بر اساس سایر گزارشات، آقای تور سیلو[2] و همکاران در سال ۲۰۰۶، ۳۳٪ آقای نیومن[3] و همکاران در سال ۲۰۰۹ میزان جهش های کدون های ۱۲ و ۱۳ را ۳۹٪ می باشد [۲۸] در سال ۲۰۰۴ آقای Gymbldr ۳۷٪ جهش را در نمونه های مورد مطالعه گزارش داده اند [۲۹] نتایج حاصل از مطالعه حاضر تشابه نسبی با سایر مطالعات را نشان می دهد.

از نظر فراوانی ۹ مورد (از ۳۵ نمونه) در کدون ۱۲ و تنها ۴ مورد در کدون ۱۳ جهش مشاهده گردید. در بررسی تاریخچه خانوادگی بیماران ۴۲/۹ ٪ پیشینه وجود سرطان کلورکتال وجود داشت. بنابراین احتمالاً می توان از تاریخچه خانوادگی برای پیش بینی جهش در کدون های ۱۲ و ۱۳ به عنوان نقاط داغ جهش استفاده نمود اما قطعیت این موضوع به مطالعات بیشتر و گسترده تری نیاز دارد.

مطالعات متعدد در کشورهای غربی نشان داده که سن شیوع سرطان کلورکتال همانند سایر تومورهای جامد، به طور معمول بعد از ۶۰ سالگی است. بروز زود این بیماری در میان سالگی (۵۰-۴۰ سالگی) در کشورهای غربی تنها در حدود ۸-۲ درصد موارد می باشد. از طرفی بررسی های متعدد اپیدمیولوژیک در ایران درصد بالاتری از بیماری را در سنین میان سالی نشان می دهد به طوری که در حدود یک سوم در سنین زیر ۵۰ سالگی دیده می شود.

با توجه به شیوع بالای سرطان کلورکتال در ایران و نقشی که کدون های ۱۲ و ۱۳ در ژن KRAS در بدخیمی و پیشرفت آن دارد بنابراین غربالگری در زمان مناسب برای شناسایی بیماران در مراحل اولیه بسیار ضروری می باشد

1 -Lievere

2- Torre silo
3- Neumann

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

و برای درمانهای هدفمند متناسب با نوع جهش، تعیین نوع جهش با استفاده از روشهای غیر تهاجمی و سریع نیز از اهمیت قابل توجهی برخوردار است.

نتایج حاصل از ارزیابی جهش ژن KRAS در نمونه های خون در پژوهش حاضر بیانگر آن است که نمونه های خونی برای این مطالعه با روش qPCR مناسب نیست.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه بیانگر درصد بالای موتاسیون در بیماران می باشد و جهش در کدون ۱۲ به طور معنی داری ($p\leq$ ۰/۰۵) نسبت به کدون ۱۳ بالاتر است همچنین ارتباط خانوادگی بیماری و سن بروز در بیماران مورد مطالعه نیز نسبت به سایر مطالعات بطور معنا داری متفاوت بود بنابراین استفاده از روش استاندارد درمان بدون در نظر گرفتن نوع موتاسیون موجب عدم نتیجه مناسب در درمان خواهد شد و بکارگیری نتایج فوق به منظور بهینه شدن روش درمان و پیشگیری ضروری است.

هر چند انجام مطالعات بیشتر در سطح ملکولی و برنامه های غربالگری و پیشگیری درگروه سنی جوان تر در کشور نیز لازم و ضروری بنظر می رسد.

تشکر و قدردانی

از همکاران و نویسندگان این مقاله همچنین مسئولین محترم آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) به دلیل پشتیبانی از این پژوهش تشکر و قدردانی می نماید.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

References

1.Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int J Cancer*, 2010;127(12):2893-917.

2.Pourhoseingholi MA, Zali MR, Colorectal cancer screening: Time for action in Iran, *World J GastrointestOncol*, 2012;4(4):82-3.

3.Lubomierski N, Plotz G, BRAF mutations incolorectal carcinoma suggest two entities ofmicrosatellite-unstable tumors, Cancer 2005; 104: 952-61.

4. Muller PAJ, Caswell PT, Mutant p53 drives invasion bypromoting integrin recycling, Cell 2009; 139: 1327– 41.

5. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, BRAF, KRAS andPIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: Primary or secondary genetic events incolorectal carcinogenesis? BMC Cancer 2008; 8: 255

6. Sameer AS, Chowdhri NA. Mutation pattern of K-ras gene incolorectal cancer patients of Kashmir: a report, IndianJ Cancer 2009; 46: 219-25.

7.Ikediobi ON, Davies H, Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set, Mol Cancer Ther2006;5(11): 2606–2612.

8. David Z Chang, Vikas Kumar1, Individualized therapies in colorectal cancer: KRAS as a marker for response to EGFR-targeted therapy 2009 ; 2:18

9. Al-Mulla F, Milner-White EJ, Structural differences between valine-12 and aspartate-12 Ras proteins may modify carcinoma aggression, J Pathol1999;187(4): 433–438

10.Bollag G, McCormick F ,Intrinsic and GTPase-activating protein-stimulated RasGTPase assays.Methods Enzymol1995;255: 161–170

11.Ogino S, Nosho K,CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer,Gut2009;58(1): 90–96.

12. Roth AD, Tejpar S. 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 Oncol2010;28(3): 466–474.

13. De Roock W, Claes B. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis, Lancet Oncol2010;11(8): 753–762.

14. Imamura Y, Morikawa T, Specific Mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF-wild-type colorectal cancers,Clin Cancer Res2012;18(17): 4753–4763

15. Lin AY, Buckley NS, Effect of KRAS mutational status in advanced colorectal cancer on the outcomes of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: a systematic review and meta-analysis, Clin Colorectal Cancer2011;10(1): 63–69

16. Bokemeyer C, Cutsem EV, Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: Pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials, Eur J Cancer2012;48(10): 1466–1475

17.Alberts SR, Sargent DJ, Effect of oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial, JAMA2012;307(13): 1383–1393.

18.Ikediobi ON, Davies H, Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set, Mol Cancer Ther2006; 5(11): 2606–2612.

19. Bokemeyer C, Cutsem EV,Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: Pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials, Eur J Cancer201248(10): 1466–1475.

20. Imamura Y, Morikawa T, Specific Mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF-wild-type colorectal cancers, Clin Cancer Res201218(17): 4753–4763. 25

21.Lièvre A, Bachet JB, KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer, Cancer Res. 2006;66:3992–3995.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

22. De Roock W, Piessevaux H, KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab, Ann Oncol. 2008;19:508–515.
23. Bibeau F, Lopez-Crapez E. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan, J ClinOncol, 2009;27:1122–1129.
24. Freeman DJ, Juan T, Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone, Clin Colorectal Cancer, 2008;7:184–190.
25. Cohn AL, Shumaker GC, An open-label, single-arm, phase 2 trial of panitumumab plus FOLFIRI as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer, Clin Colorectal Cancer, 2011;10:171–177.
26. S. Sobhani, SM Ghaffarpour, Prevalence of common mutations in codons 12 and 13 2 K-ras gene in patients with colorectal cancer in Iranian population, 19/8/89[Persian]
27.Trevisiol C, Fabio FDi, Prognostic value of circulating KRAS2 gene mutationsin colorectal cancer with distant metastases, IntBiol Marker 2006; 21(4):223-8.
28. Neuman J, ZeindilEberhart E, Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer, Pathol Res part 2009;205(12):858-62.
29. Gimimbel MI, Nash G, B-raf mutations are associated with increased mortality incolorectal cancer, J Am collgesalgeons 2004;199:92

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]

Original Article

Evaluation of The Type and Extent of KRAS Gene Mutations Colorectal Cancerous Patients in Baqiyatallah Hospital(1393-1394)

Teimouri M[1], Tavalaee M [2], Zarei mahmodabadi A[3], Chavoshi S[4], Rashedi H[5]*

[1]Senior Biochemistry Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences Baqiyatallah, Tehran, Iran
[2]PhD Biotechnology Research Center for Human Genetics, University of Medical Sciences Baqiyatallah, Tehran, Iran
[3]Senior Cell and Molecular Biology Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad,Iran
[4]PhD Chemical Engineening / College of Chemical Engineening, University of Tehran , Tehran, Iran
[5]PhD in Biochemistry: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences Baqiyatallah, Tehran, Iran
***Corresponding Author:** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences Baqiyatallah
Email: alizaremah2014@gmail.com

Abstract

Background & Objectives: *Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies in the world with a high mortality rate. Among all of the genes that are involved in colorectal cancer, KRAS gene has a high diagnostic importance. This gene is mutated in early stages of colorectal cancer. Most of KRAS effective mutations are observed in codons 12 and 13. Therefore, detection of KRAS gene mutations (codon 12 or 13 or both codons) in patients with colorectal cancer is important for the treatment protocol of choice.*

Material & Methods: *DNA was extracted from the tissue and serum samples of 35 patients with colorectal cancer who had inclusion criteria. The primer of KRAS codons 12 and 13 were designed and synthesized. qPCR technique was used to determine the location and type of KRAS gene mutations. Statistical analysis was performed using the SPSS 20 software and P-value less than 0.05 was considered as significant.*

Results: *Statistical analysis have shown that the incidence of mutations in genes KRAS was 37.1%. The mutations in codons 12 and 13 were 69.2% and 30.8%, respectively. The possibility of KRAS mutations in colorectal cancer patients with high grade was 1.14 times greater than the cases with low grade.*

Conclusion: *KRAS mutation analysis is a diagnostic tool for cancer with a remarkable prognostic result. Regarding the age of outbreak in Iran, screening and prevention programs and providing effective treatment protocols are very important.*

Keywords: *KRAS, colorectal cancer, Motations, qpcr*

Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2017;9(1): 43-54

Received: 2 Mar 2016
Revised: 7 Jun 2016
Accepted: 13 Sep 2016

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2026-07-08]