

بررسی جهش در کدون ۱۳ ژن *K-ras* در بیماران مبتلا به سرطان

کولورکتال در شمال شرق ایران

سارا لاری*^۱، کامران غفارزادگان^۲، سیماافشارنژاد^۳، مهدیه صرافرضوی^۴، نازنین پازوکی^۵،
سامان حسینیخانی^۶

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- استادیار، آزمایشگاه دکتر موید مشهد

۳ و ۴- به ترتیب استادیار و کارشناس ارشد، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

۵- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مشهد

۶- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sara.lary@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۳)

چکیده

سرطان کولون یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در دنیا می‌باشد. از میان تمامی ژن‌هایی که در فرآیند سرطان‌زایی کولون دستخوش تغییر می‌شوند، *Kras* از اهمیت تشخیصی بالایی برخوردار می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد جهش در این ژن که در ۵۰-۲۰ درصد سرطان‌های کولورکتال و در مراحل اولیه آن اتفاق می‌افتد و نقش بسیار مهمی در پیشرفت و گسترش سرطان کولون دارد. اغلب جهش‌های *Kras* در کدون ۱۲ و ۱۳ و به میزان بسیار کمتری در کدون ۶۱ اتفاق می‌افتد. در این تحقیق فراوانی جهش کدون ۱۳ با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. سپس ارتباط بین جهش در کدون ۱۳ با فاکتورهای کلینیکی پاتولوژی سن، جنس، محل تومور، مرحله تومور، درجه و نوع تومور نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۸/۵ درصد (۱۰ مورد از ۵۴ مورد) در کدون ۱۳ جهش داشته و بین جهش در کدون ۱۳ با مرحله تومور ارتباط معنی‌دار وجود دارد. بنابراین به نظر می‌رسد بررسی وجود جهش در ژن *Kras* در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولون در بررسی سیر پیشرفت بیماری دارای نقش تعیین‌کننده و ارزش تشخیصی باشد.

مقدمه

سرطان کولون شایع‌ترین سرطان دستگاه گوارش و سومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان پستان و ریه و دومین عامل مرگ و میر مردان پس از سرطان پروستات می‌باشد (۳) که اگر در مراحل اولیه تشخیص داده شود قابل درمان می‌باشد (۴). بر اساس تحقیقات انجام شده دو فاکتور مهم ارث و محیط در ایجاد و پیشرفت سرطان کولون نقش دارند (۵). از عوامل محیطی معمول می‌توان به سن بالای ۵۰ سال، رژیم غذایی، مصرف سیگار و فعالیت فیزیکی اشاره نمود (۶). از عوامل ژنتیکی شایع نیز می‌توان جهش‌های سوماتیکی ژن‌های *APC*، *P53*، *Kras*، ژن‌های ترمیم‌کننده DNA و تغییرات میتیلاسیون DNA را نام برد که علاوه بر سرطان‌های کولون فامیلی در انواع تک‌گیر آن نیز به وقوع می‌پیوندد (۱).

واژه‌های کلیدی

آدنوکارسینوم کولون،
کدون ۱۳،
RFLP-PCR

برنامه MAPVIUWER محل برش آنزیمی تأیید گردید. سپس PCR اولیه با شرایط (دنا تورا سیون اولیه ۱۱ دقیقه ۹۵ درجه، دنا تورا سیون ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه، جوش خوردن ۳۰ ثانیه ۵۵ درجه، طولیل شدن ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه، طولیل شدن انتهایی ۵ دقیقه ۷۲ درجه) به منظور تکثیر قطعات انجام شده، پس از الکتروفورز محصولات PCR یک باندها در موقعیت ۱۲۰bp مشاهده شد که نشان دهنده تکثیر قطعه مورد نظر طی PCR است. برای بررسی جهش در کدون ۱۳، نمونه‌ها تحت هضم آنزیم *BglII* (شرکت Fermentase) قرار گرفته و محصولات PCR جهش یافته و وحشی به ترتیب در قطعات ۱۰۶ و ۷۴ بر روی آگارز قابل شناسایی بودند. برای آنالیز داده‌های مربوط به ارتباط میان وقوع پلی مورفیسم ژن *Kras* با برخی فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی مانند سن، جنس، درجه تومور، مرحله بیماری، نوع سرطان کولون و محل تومور از تست Fisher Exact Test با نرم افزار Spss 16 استفاده شد. در این پژوهش سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق ۵۴ بیمار مورد مطالعه بین سنین ۲۶ و ۸۵ سال قرار داشتند و میانگین سن آن‌ها ۵۴ سال بود. طبق مطالعات انجام شده معمولاً بیماریابی در مردان و زنان از سن ۵۰ سالگی شروع می‌شود و در صورتی که سابقه مثبت سرطان یا پولیپ روده بزرگ در خانواده باشد بایستی کولونوسکوپی تمام روده از سن ۴۰ سالگی شروع شود، یعنی ۱۰ سال زودتر از افراد عادی لذا شیوع آن بین سنین ۴۰ تا ۵۰ سالگی به تدریج افزایش می‌یابد و عدم اطلاع از اینکه چند نفر از افراد مطالعه سابقه مثبت سرطان را دارا بودند با توجه به بررسی انجام شده روی داده‌ها و واریانس آن‌ها (پراکندگی) و همچنین از آنجائی که سن می‌تواند یک متغیر مداخله‌گر باشد عدد ۴۵ سال در نظر گرفته شد علاوه بر این میانگین سنی در افراد زیر ۴۵ سال که جهش کدون ۱۳ آن‌ها مثبت بود 16 ± 52 سال و در محدوده سنی ۴۵ و بالاتر که جهش کدون ۱۳ در آن منفی بوده 13 ± 61 سال بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.01$). میزان جهش در افراد زیر ۴۵ سال به مراتب بیشتر از گروه دیگر بود. فراوانی فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیکی و دموگرافیک بیماران و مقادیر آماره احتمال

این تغییرات در مسیر ژنتیکی که به توالی آدنوم-کارسینوم شهرت داشته و ۹۰ درصد سرطان‌های کولون از آن پیروی می‌کنند، اتفاق می‌افتد (۷). جهش ژن *Kras* در سرطان‌های مختلف شایع بوده و نقش مهمی در مراحل مختلف پیشرفت تومور، رشد، گسترش، متاستاز و پاسخگویی به درمان بیماران دارد (۸). بنابراین شناسایی جهش این ژن در مطالعات سرطان‌شناسی امری ضروری می‌باشد. ژن *Kras* بروی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ قرار داشته و یک پروتئین GTPase می‌باشد (۹). در ۵۰-۲۰ درصد از سرطان‌های کولون جهش *Kras* در سه کدون ۱۲، ۱۳ و ۶۱ اتفاق می‌افتد (۱۰). بیماران حامل این جهش علی‌رغم صرف هزینه‌های گزاف به درمان‌های دارویی رایج مقاوم بوده و به دنبال آن از شانس بقای کمی برخوردار می‌باشند (۱۱). با توجه به این موضوع و اینکه جهش در *Kras* در مراحل اولیه سرطان کولون قابل شناسایی می‌باشد، بررسی وجود یا عدم وجود جهش در این ژن به منظور شناسایی سریع‌تر افراد مستعد سرطان کولون و افزایش شانس بقا امری اجتناب‌ناپذیر به شمار می‌آید. از این رو در این تحقیق به بررسی فراوانی جهش انکوژن *Kras* در کدون ۱۳ اگزون یک در بیماران مبتلا به سرطان کولون در منطقه شمال شرق کشور و ارتباط آن با برخی فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی مانند سن، جنس، درجه، مرحله، نوع و محل تومور پرداختیم.

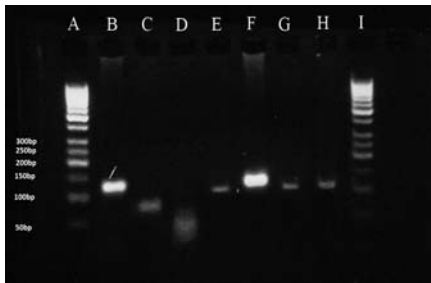
مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر بر روی بافت توموری بلوک‌های پارافینی ۵۴ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم کولون که ابتلا آنان توسط آسیب‌شناس مورد تایید قرار گرفته بود انجام شد. پس از تهیه ۵-۴ برش بافتی با ضخامت ۲-۵ میکرومتر از نمونه‌های مذکور، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت (شرکت QIAGEN) انجام شد، آغازگر (K12&13FACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCCCT) و طبق 13mt-R (ACAAGATTTGCCTCTATGGCTGGATCA) تحقیق Nagasaka و همکاران در سال ۲۰۰۴ قبل از سفارش سنتز، توسط برنامه BLAST با سکانس اصلی ژن AXECTIONNO ذکر شده در سایت ncbi، مورد بررسی قرار گرفته و جهت اطمینان از طول قطعه تکثیر شده به منظور تأیید ژن مورد نظر توسط برنامه GENE RUNNER ارزیابی شد و توسط

جدول ۱- ارتباط برخی فاکتورهای کلینیکوپاتولوژی با وضعیت جهش در کدون ۱۳ ژن *k-ras*

p-value*	تعداد (درصد) موتاسیون در کدون ۱۳	تعداد کل در جمعیت	فاکتورها
۰/۷	۵ (۱۵/۶) ۵ (۲۲/۷)	۳۲ ۲۲	جنس: مرد زن
۰/۰۴	۴ (۴۰) ۶ (۱۳/۶)	۱۰ ۴۴	سن: ۴۵ < ۴۵ ≥
۰/۱۶	۲ (۱۵/۴) ۳ (۲۷/۳) ۰ ۱ (۲۵) ۱ (۱۲/۵) ۳ (۳۷/۵) ۰	۱۳ ۱۱ ۷ ۴ ۸ ۸ ۱ ۲	محل تومور: رکتوم رکتوسیگموئید سیگموئید کولون چپ کولون راست ناشناخته کولون عرضی کولون چپ و سیگموئید
*۰/۰۰۲	۰ ۲ (۱۰/۵) ۱ (۳۳/۳) ۰ ۲ (۱۴/۳) ۴ (۸۰) ۱ (۱۰۰)	۹ ۱۹ ۳ ۱۴ ۵ ۱	مرحله سرطان: IIA IIIA IIIB IIIC IIIV
۰/۳	۸ (۲۲/۲) ۲ (۱۱/۸)	۳۶ ۱۷	درجه تومور: I II III
۰/۰۸	۸ (۱۵/۷) ۲ (۶۶/۷)	۵۱ ۳	تیپ تومور: غیر موسیسی موسیسی

* سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



شکل ۱- طرح الکتروفورزی قطعات هضم شده پس از برش آنزیمی A و I: مارکر B ۵۰bp و F: محصول تکثیر تیمار نشده با آنزیم که بصورت باند ۱۲۰bp مشاهده می شود. C: قطعه برش خورده مربوط به نمونه فاقد جهش که بصورت باند ۷۴bp مشاهده می شود. E, G, H: قطعه برش خورده مربوط به نمونه دارای جهش که بصورت باند ۱۰۶bp مشاهده می شود. D: کنترل منفی

برخی مطالعات نیز با وجود عدم ارتباط معنی دار، این نتایج را تأیید می کنند (۱۳، ۱۶). نتایج برخی تحقیقات هم خلاف این بوده و میزان جهش را در مردان بیش تر نشان می دهد (۱۸). در رابطه با محل تومور صرف نظر از موارد ناشناخته آن، بیشترین میزان جهش در رکتوسیگموئید مشاهده شد (جدول ۱). نتایج مطالعات مختلف بیشترین میزان جهش را در رکتوم و رکتوسیگموئید

آزمون برای این فاکتورها با میزان جهش در کدون ۱۳ در جدول یک گزارش شده است. در ۱۸/۵ درصد بیماران مورد مطالعه، جهش در کدون ۱۳ مشاهده شد (شکل ۱). همچنین طبق جدول شماره ۱، فراوانی جهش در بین مراحل سرطان، در مرحله IIIC اختلاف و ارتباطی معنادار نشان داد ($P < 0.002$) که همانطور که مشاهده می شود در مراحل پیشرفته سرطان فرکانس جهش افزایش می یابد (جدول ۱). مطابق جدول ۱، بین جنسیت بیماران، محل قرارگیری تومور، درجه و تیپ سرطان با جهش هیچ رابطه معنی داری حاصل نشد ($P > 0.05$). فراوانی جهش کدون ۱۳ ژن *Kras* در میان ۵۴ نمونه مورد مطالعه ما ۱۸/۵ درصد محاسبه شد. در مطالعات مختلف روی جمعیت های متفاوت، فرکانس جهش متنوع است. این اختلاف می تواند به دلیل تفاوت رژیم غذایی، ژنتیک، روش زندگی و ... باشد. در مطالعه دکتر Samowitz و همکارانش در سال ۱۹۹۴ روی بافت توموری ۱۴۱۳ بیمار مبتلا به سرطان کولون، شیوع جهش *Kras* ۳۱/۸ درصد گزارش شد که ۲۲/۱ درصد از کل جهش ها در کدون ۱۳ قرار داشت (۱۲). همچنین نتایج مطالعه Sameer و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۳ تومور نشان داد که ۱۲ نمونه (۲۲/۶۴ درصد) جهش *Kras* داشته که ۳۸/۵ درصد آن در کدون ۱۳ است (۱۳). در مطالعه حاضر مشاهده شد که در افراد زیر ۴۵ سال میزان جهش در کدون ۱۳ به مراتب بیش تر از بیماران بالای ۴۵ سال است همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین سن در گروه منفی بیش تر است از این رو می توان نتیجه گرفت که افزایش سن باعث کاهش میزان مثبت بودن جهش کدون ۱۳ می شود. برخی مطالعات، ارتباط بین سن و جهش نیز یافتند (۱۷). در مطالعات کشورهای غربی فراوانی جهش *Kras* در سن زیر ۵۰ سال ۲۰ درصد گزارش شده است (۱۴، ۱۵). در مطالعات مختلف در گروه بندی های متفاوت سنی، افراد با سنین کمتر، برای مثال زیر ۵۵ سال (۱۳) یا در مطالعه دیگر افراد زیر ۶۰ سال (۱۶) میزان جهش پائین تری نسبت به افراد در گروه سنی بالاتر دارند. نتایج حاصل از مطالعه ما، ارتباط معنی داری بین جنس، محل، درجه و تیپ تومور با جهش در *Kras* نشان نمی دهد (جدول ۱). با این حال طبق جدول ۱ میزان وقوع جهش در رابطه با جنس، در زنان بیشتر از مردان است.

درصد مورد جهش *Kras* (۴/۵) درصد در کدون ۱۲ و ۱۸/۲ درصد در کدون ۱۳) و ۲۵ درصد C+D دارای جهش (۲۱/۹ درصد در کدون ۱۲ و ۳/۱ درصد در کدون ۱۳) گزارش شده است همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان جهش در مراحل C+D بیش‌تر از مراحل A+B است (۱۳). در مطالعه Okulczyk و همکاران در سال ۲۰۰۴ در نمونه‌های سرطانی کولون مورد مطالعه ۵۰ درصد مرحله A، ۳/۳۳ درصد مرحله B، ۳۲ درصد مرحله C، ۵۰ درصد مرحله D دارای جهش *Kras* است و ارتباط معنی‌دار یافت نشد ($P < 0/04$) (۱۶). همچنین در مطالعه Garrett و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که بین شیوع جهش *Kras* و مرحله مختلف پیشرفت تومور سرطان کولون اختلاف معنی‌داری وجود ندارد: I: ۳۶ درصد، II: ۳۴ درصد، III: ۳۵ درصد، IV: ۴۰ درصد (۱۰). Brink و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز نشان دادند میزان وقوع جهش *Kras* در سرطان کولون در جامعه مورد مطالعه ۳۶ درصد A، ۳۵ درصد B، ۳۴ درصد C و ۴۵ درصد D می‌باشد و بین مرحله تومور کولون با جهش *Kras* رابطه معنی‌دار حاصل نشد ($P < 0/04$) (۱۸). نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین سن بیماران با جهش مشاهده شد و در افراد زیر ۴۵ سال میزان جهش در کدون ۱۳ به مراتب بیشتر از بیماران بالای ۴۵ سال است. همچنین ارتباط معنی‌داری در مرحله تومور با جهش *Kras* دیده شد و این ارتباط، بیشتر مربوط به مرحله III می‌شود که در آن بیش‌ترین میزان جهش مشاهده شد بطوری‌که با افزایش پیشرفت بیماری (مرحله III) احتمال وقوع جهش در *Kras* افزایش می‌یابد. از آنجا که جهش *Kras* در مراحل اولیه سرطان کولون رخ می‌دهد از این رو انتظار می‌رود که مرحله تومور در سرطان کولون ارزش پیش‌آگهی برای این بیماران داشته باشد. پیشنهاد می‌شود با افزایش تعداد نمونه و بهره‌گیری از روش کمی Real time-PCR و بررسی بیان ژن *Kras* با استفاده از روش ایمنو هیستوشیمی، همچنین بررسی ارتباط بین بیان ژن *Kras* با بقاء بیماران، بررسی ارتباط جهش در کدون ۱۳ *Kras* و ژن EGFR با پاسخ به درمان در بیماران مبتلا به سرطان کولون و مطالعه بر روی جهش ژن‌های دیگر درگیر در ژنتیک سرطان کولون مانند *APC*، *E-cadherin*، *EGFR*، *MLH1*، *MSH2* بتوان به نتایج و یافته‌های جدیدتری دست یافت.

گزارش دادند (۲،۱۸). این در حالیست که در گزارش تحقیقاتی در جوامع غربی نشان داده شده که کم‌ترین میزان جهش در رکتوم است و بیشترین میزان در ناحیه کولون واقع شده است (۱۷،۱۳). در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین درجه سرطان کولون با جهش مشاهده نشد. طبق جدول ۱، میزان جهش‌ها در درجه I بیشتر از درجه II است، برخی مطالعات این نتیجه را تایید می‌کنند (۱۶). در ارتباط با نوع سرطان کولون با جهش، رابطه معنی‌داری بدست نیامد اما با توجه به مطالعات پیشین و نتایج مطالعه ما می‌توان گفت در بیماران با وقوع جهش بیش‌تر تیپ سرطان از نوع موسینی محتمل‌تر است (۱۳،۱۶،۱۹). در مطالعه ما ارتباط معنی‌داری در مرحله تومور با جهش *Kras* دیده شد (رجوع به جدول ۱) ارتباط میان مرحله و جهش بیشتر مربوط به مرحله III می‌شود که در آن بیشترین میزان جهش مشاهده شد. می‌توان گفت فراوانی جهش *Kras* در مراحل پیشرفته سرطان بیشتر بوده و این ارتباط کاملاً مستقیم است. مطالعات متعدد نشان دهنده تایید این مطلب است بطوری‌که در مطالعه Bazan و همکاران در سال ۲۰۰۲ بین مرحله و جهش ارتباط ($P < 0/05$) معنی‌داری مشاهده شد. مطابق با نتایج حاصل، در مرحله A+B، ۴۰ درصد جهش ژن *Kras* گزارش شد (۲۶ درصد در کدون ۱۲ و ۱۴ درصد در کدون ۱۳) و ۵۴ درصد C+D دارای جهش (۲۳ درصد در کدون ۱۲ و ۳۱ درصد در کدون ۱۳) مشاهده شد (۱۹). همان‌طور که این نتایج نشان می‌دهد میزان جهش در مراحل C+D بیش‌تر از مراحل A+B است و نیز در کدون ۱۳ در مراحل نهایی جهش بیشتری مشاهده شده است. در مطالعه دکتر Breivik و همکارانش در سال ۱۹۹۴، نشان داده شد که در نمونه‌های توموری سرطان کولون مورد مطالعه ۳۴/۴ درصد در مرحله A، ۴۱/۴ درصد در مرحله B، ۴۱/۹ درصد در مرحله C، ۳۲/۳ درصد و در مرحله D جهش *Kras* مشاهده شد و این اختلاف معنی‌دار است (۱۷). مطالعه دکتر Urosevi و همکاران در سال ۱۹۹۳، بر روی ۳۷ بیمار مبتلا به سرطان کولون، میزان جهش *Kras* در مراحل A, B, C به ترتیب ۳۳، ۴۶ و ۵۸ درصد گزارش شد و ارتباط معنی‌داری بین مرحله تومور و جهش *Kras* مشاهده شد (۲۰). در مطالعه Sameer و همکاران در سال ۲۰۰۹ بین مرحله و جهش ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در این تحقیق در مرحله A+B، ۲۲/۷

سپاسگزاری:

به نتیجه رسیدن این پژوهش را مدیون همکاری صمیمانه مدیریت و پرسنل شایسته آزمایشگاه دکتر موید و سرکار خانم اسعدی کارشناس آزمایشگاه آسیب‌شناسی بیمارستان امید هستیم.

منابع

۱. عدالت ح، صادقی زاده رضا، جمالی زواره ای م، بررسی جهش در کدون ۱۲ ژن *Kras* در بیماران مبتلا به سرطان کولون اسپورادیک با روش RFLP-PCR، مجله علوم پزشکی مدرس، ۲۰(۱۳۸۵): ۳۳-۳۸۰.
۲. جلالی م، کردجزی الف، جلالی ع، ویژگی اپیدمیولوژیک سرطان کولورکتال در یک دوره ۲۰ ساله (۱۳۸۰-۱۳۶۰) در افراد مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران، مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران، ۴۳(۱۳۸۳): ۷۲۳-۷۲۹.
3. Schimanski C, Linnemann U, Berger M, (1999) Sensitive Detection of K-ras Mutations Augments Diagnosis of Colorectal Cancer Metastases in the Liver, *Journal of Cancer Research*, 59(1999): 5169-5175
4. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H, (2009) The Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group Comparison of 17,641 Patients With Right- and Left-Sided Colon Cancer: Differences in Epidemiology, Perioperative Course, Histology, and survival, *Med Ann of Onco*, 6 (2009): 581-588.
5. Ames B, Gold L S, Willett W C, (1995) The causes and prevention of cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(1995): 5258-65
6. Kuper H, Boffetta P, Adomi Ho, (2002) Tobbaccouse and cancer causation: association by tumor type, *Journal of intern Med*, 252(2002): 206-224.
7. Abbaszadegan M R, Tavasoli A, Velayati A, Sima, H R, Vosooghinia H, Farzadnia M, Asadzedeh H, Gholamin M, Dadkhah E, Aarabi A, Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran, *World J Gastroenterol*, 13(2007) 1528-1533.
8. Wang H, Lopategui J, Amin M B, Patterson S D, KRAS Mutation Testing in Human Cancers: The Pathologist's Role in the Era of Personalized Medicine, *Adv Anat Pathol*, 17(2010) 23-32.
9. Friday B, Adjei A, Kras as a target for cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta*, 25(2005) 127-144.
10. Garrett M, Gimbel M, Cohen A, Zeng Z, Ndubuisi M, Nathanson D, Ott J, Barany F, Paty P H, KRAS Mutation and Microsatellite Instability: Two Genetic Markers of Early Tumor Development That Influence the Prognosis of Colorectal Cancer, *surg oncol*, 53 (2009) 115-120
11. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Cutsem E V, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson S, Chang D, Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer, *J Clin Oncol*, 26(2008) 1626-1634.
12. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery M L, Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage and survival: a population-based study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 9(2000) 1193-1197.
13. Sameer AS, Chowdhri NA, Abdullah S, Shah ZH, Siddiqi Ma, Mutation pattern of Kras gene in colorectal cancer patients of Kashmir: A report, *Can Res*, 15(2009) 219-225.
14. Bishehsari F, Mahdavinia M, Malekzadeh R, Verginelli F, Catalano T, Sotoudeh M, Patterns of Kras 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*, 17(2006) 91-96.
15. Cormann ML. Colon and Rectal surgery. 4th ed. New York: Lippincott company; 1999. p. 625-762.
16. Okulczyk B, Kovalchuk O, Piotrowski Z, Myoeliwiec P, Chyczewski L, Clinical usefulness of KRAS mutation detection in colorectal cancer and in surgical margins of the colon, *Proc. Ann. Acad. Med Bialostocensis*, 49(2004) 221-225
17. Breivik J, Meling G I, Spurkland A, Rognum T, Gaudernack G, Kras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location, *Br J Cancer*, 69(1994) 367-371.
18. Brink M, De Goeij A, Weijenberg M, Roemen G, Lentjes M, Pachen M, Smits K, De Bruïne A, van den Brandt A, Kras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study, *Inv lab J*, 4(2003) 703-710.
19. Bazan V, Migliavacca M, Zannaand I, Specific codon 13 *Kras* mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 *Kras* mutations are associated with mucinous histotype, *Ann. Oncol*, 13 (2002) 1438-1446.
20. Urosevic N, Krtolica K, Skaro-Milic A, Knezevic-Usaj S, Dujic A, Prevalence of G-to-T transversions among *Kras* oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int. J. Cancer*, 54(1993) 249-254.