

## بررسی جهش‌های رایج ژن‌های KRAS و BRAF در بیماران مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۰ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰

**زمینه و هدف:** کارسینومای بافت سنگفرشی (Squamous cell carcinoma) سر و گردن، سرطان بافت اپیدرمی ناحیه‌ی سر و گردن است. این عارضه شایعترین نوع سرطان‌های سر و گردن (حدود ۹۰٪ موارد) است و همانند سایر بدخیمی‌ها، جهش در ژن‌های مسیر پیام‌رسانی RAS/MAPK یا همان مسیر گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)، بسیار رایج است. از علل اصلی ابتلا به این سرطان‌ها، جهش در ژن‌های KRAS و BRAF در بیش از (به ترتیب) ۳۰٪ و ۱۰٪ موارد است. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی جهش‌های شایع این دو ژن در ناحیه‌ی سر و گردن انجام گردید.

**روش بررسی:** این پژوهش مقطعی-توصیفی از آبان ۱۳۹۲ تا شهریور ۱۳۹۵ بر کدون‌های جهش‌پذیر ۱۲ و ۱۳ آگزون ۲ ژن KRAS و کدون V600E ژن BRAF در کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن ۴۰ نمونه‌ی تایید شده‌ی مبتلا به این سرطان در بیمارستان امام خمینی (ره) تهران انجام شد و سه تکنیک استخراج DNA بر پایه فنل-کلروفرم، Multiplex-PCR و آزمون استریپ در این پژوهش به کار رفت.

**یافته‌ها:** در ۱۱ تن از بیماران جهش دو ژن KRAS و BRAF به میزان حدود ۱۷/۵٪ در ژن KRAS (۱۰٪ جهش تبدیل گلیسین به اسپارتات و ۲/۵٪ جهش گلیسین به سرین در کدون ۱۲ و ۵٪ جهش تبدیل‌کننده‌ی گلیسین به اسپارتات در کدون ۱۳) و ۱۰٪ در ژن BRAF مشاهده شد. در یک بیمار نیز، همزمان، دو جهش در کدون ۱۲ مشاهده شد که نشان از ناهمگن بودن توده‌ی سرطانی داشت.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های به دست آمده می‌توان دو ژن KRAS و BRAF را در زمره‌ی علل تاثیرگذار در ابتلا به سرطان سنگفرشی سر و گردن به حساب آورد.

**کلمات کلیدی:** ارزیابی بیولوژیکی، BRAF، پژوهش‌های مقطعی، سرطان اسکواموس سل سر و گردن، KRAS، جهش.

راضیه ظریفیان یگانه<sup>۱</sup>، عباس شکوری  
گراگانی<sup>۱،۲</sup>، سامان مهربابی<sup>۱</sup>  
نادر عبادی<sup>۱</sup>، مازیار مطیعی لنگرودی<sup>۳</sup>  
محمدرضا نوری دلویی<sup>۳\*</sup>

۱- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- آزمایشگاه ژنتیک، انستیتو کنسر، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- مرکز جراحی، انستیتو کنسر، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، خیابان انقلاب، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی

تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵-۰۲۱

E-mail: nooridalooi@sina.tums.ac.ir

### مقدمه

(Head and neck squamous cell carcinoma)، رایج‌ترین نوع سرطان‌های سر و گردن از نظر بافت شناختی (حدود ۹۰٪) می‌باشد. این سرطان، ششمین بدخیمی رایج در دنیا است.<sup>۱</sup> با این حال، تفاوت‌های بارزی در میزان بروز آن در نقاط متفاوت دنیا وجود دارد.<sup>۲</sup> سرطان حفره دهان و اوروفارنکس یا دهان و حلق، رایج‌ترین نوع سرطان اسکواموس سل سر و گردن هستند. در سال ۲۰۰۸،

سرطان سر و گردن، شامل بدخیمی‌های حفره دهانی، نازو-فارنکس (بینی-حلقی)، اوروفارنکس (دهانی-حلقی یا فوق حنجره)، هایپوفارنکس (تحت حلقی) و لارنکس (حنجره)، سینوس‌های پاراناژال (پیرامون بینی) و غدد بزاقی است. سرطان بافت سنگفرشی

بخش ATP، گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی را مورد هدف قرار می‌دهند، می‌توانند فعالیت‌های ضد توموری داشته باشند. بر اساس پژوهش‌های انجام گرفته، درمان با مهار کننده‌های گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی تا زمانی که اندازه‌ی تومور بزرگ نشده باشد باید ادامه یابد، حتی اگر تغییر اساسی در بیان این ژن دیده نشود.<sup>۱۱</sup>

BRAF نیز جز خانواده RAF سرین/ترئونین کینازها است. بر اساس گزارشات اخیر، در شمار چشمگیری از سرطان‌های انسان فعالیت دارد و این جهش‌ها در تعداد زیادی از ملانوماهای بدخیم و کارسینومای تیروئید و به مقدار کمتری در بقیه سرطان‌ها رخ می‌دهد. موارد بسیاری از سرطان‌های انسان نتیجه‌ی جهش‌های RAS هستند و در کارسینوماهای اسکواموس سل سر و گردن از جمله نوع سر و گردن نیز گزارش شده است، در این سرطان فراوانی جهش‌های KRAS را حدود ۲/۴٪ است.

نتایج نشان داده که جهش‌های BRAF در حدود ۲٪ از کارسینوماهای اسکواموس سل دهانی وجود دارد.<sup>۱۱</sup> مطالعه حاضر با هدف بررسی دو ژن KRAS و BRAF در بیماران مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن انجام شد.

## روش بررسی

مطالعه‌ی کنونی که از نوع توصیفی و مقطعی است، با هدف بررسی دو ژن جهش KRAS و BRAF در کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن همچون سایر سرطان‌ها است که در بین تمام بخش‌های این ژن‌ها دو نقطه‌ی داغ جهش (کدون ۱۲ و ۱۳) در اگزون ۲ ژن KRAS و کدون پرجهش ژن BRAF (V600E) بررسی شد. این پژوهش بر جمعیتی شامل ۴۰ بیمار مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن صورت گرفت. اولین مرحله، تهیه‌ی نمونه‌ی تازه با وزن حداقل ۵۰ mg از ۴۰ بیمار بود که پیش‌تر با تایید بخش پاتولوژی، قطعیت ابتلا به سرطان بافت اسکواموس سل سر و گردن در آن‌ها اعلام شده بود و از طریق مرکز جراحی سرطان بیمارستان امام خمینی (ره) و بخش جراحی بیمارستان ولیعصر (عج) انجام شد و باقی نمونه‌ها نیز از تومور بانک انسیتو سرطان بیمارستان امام خمینی (ره) تهران خریداری گردید. نمونه‌ها را در فریزر و در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری و در مرحله‌ی

سرطان اسکواموس سل دهانی و اوروفارنکس حدود ۲۶۳۹۰۰ مورد جدید را به این سرطان دچار کرد و ۱۲۸۰۰۰ نفر را به کام مرگ فرستاد.<sup>۳</sup> آمار کلی بروز سالانه سرطان اسکواموس سل سر و گردن در دنیا ۶۰۰،۰۰۰ نفر و میزان مرگ و میر حدود ۳۵۰،۰۰۰ نفر می‌باشد.<sup>۲</sup> بررسی‌های تشخیصی ممکن است شامل آزمایش‌های خون، نمونه‌برداری (برداشت مقدار کمی از بافت یا مایع برای بررسی آزمایشگاهی) از توده و رادیوگرافی بخش‌های مبتلا در سر یا گردن باشد. سی‌تی اسکن یا MRI به بررسی گسترش بدخیمی کمک می‌کند.<sup>۳</sup> اصلی‌ترین معیارهای تنوع در پیش‌آگهی انواع سرطان اسکواموس سل سر و گردن، موقعیت و اندازه تومور، متاستاز به مناطق دورتر از جمله غدد لنفاوی گردنی می‌باشد.<sup>۴</sup>

سرطان سر و گردن را می‌توان با تشخیص سریع به‌طور مناسب درمان کرد. بیماران مبتلا، در معرض خطر بالایی از درگیری یا عود تومورهای ثانویه هستند که آن را اثر میدانی گویند. در صورت تهاجم سلول‌های توموری به غدد لنفاوی، میزان مرگ و میر افزایش می‌یابد، ولی میزان کلی بقا از ۵۰٪ فراتر نمی‌رود که این میزان در میان سرطان‌های اصلی جزو کمترین‌ها است.<sup>۱۱</sup> عدم موفقیت در درمان موثر این نوع سرطان، بیشتر در نتیجه‌ی پیشرفت آن، عدم شناخت دقیق علت و نبود اهداف دارویی است. حدود دو- سوم بیماران در مراحل پیشرفته هستند که در آن‌ها معمولاً غدد لنفاوی درگیر است.<sup>۷</sup> در صورت تشخیص به موقع، حدود ۶۵-۶۰٪ بیماران را در مراحل اولیه می‌توان با یکی از روش‌های جراحی، پرتو درمانی یا شیمی‌درمانی درمان نمود.<sup>۱۱</sup> درحالی‌که در مراحل پیشرفته، نیاز به ترکیبی از روش‌ها است.<sup>۳،۴،۵</sup> تا به امروز، نشانگر زیستی معتبری برای پیش‌بینی این بیماری یافت نشده است که نشان دهد چه کسی نتیجه بالینی ضعیفی دارد.<sup>۹</sup>

گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی یک گیرنده‌ی تیروزین کینازی است، که به خانواده ErbB تعلق دارد و نقش مهمی را در پیشرفت تومور، رشد و تمایز سلول بازی می‌کند. موفقیت بالینی در مورد مهار کننده‌ی تیروزین کیناز (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) برای گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی به‌عنوان عامل درمانی، مورد توجه زیادی قرار گرفته است.<sup>۱۱</sup> افزایش بیان گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی و لیگاند آن در بسیاری از تومورهای اپیتلیالی گزارش شده است. در سال‌های اخیر نشان داده شده که مهارکننده‌های تیروزین کیناز که

جدول ۱: درصد و فراوانی ۱۱ جهش شایع ژن‌های KRAS/BRAF

درصد	فراوانی	جهش
KRAS - کدون‌های ژن:		
		C 12: Gly (G) > Ala (A)
		C 12: G > Arg (R)
۱۰	۴	C 12: G > Asp (D)
		C 12: G > Cys (C)
		C 12: G > Ile (I)
		C 12: G > Leu (L)
۵	۲	C 12: G > Ser (S)
		C 12: G > Val (V)
۲/۵	۱	C 13: G > Asp (A)
		C 13: G > Cys (C)
۱۷/۵	۷	نتیجه‌ی نهایی
BRAF - کدون ژن:		
۱۰	۴	V600E (Val > Glu)

شده است. بنابراین آمار دقیقی در این مورد در دسترس نیست.<sup>۱۵</sup> در مطالعه‌ی حاضر پس از بررسی سن بیماران، مشخص شد که حدود ۱۷/۵٪ از بیماران مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن کمتر از ۵۰ سال و حدود ۷۰٪ از مبتلایان بالای ۵۰ سال، سن دارند. همانطور که از نتایج مشخص است و سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند، این بیماری در سنین بالا بیشتر مشاهده می‌شود.

به‌عنوان مثال، در یک مطالعه که در ایران بر روی بیماران مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن انجام شد، حدود ۹۰٪ از بیماران، بزرگسال بودند. در این جمعیت، میزان تومورها در بخش تحت حنجره بیشتر از سایر نواحی (در حدود ۶۰٪) و همراه با درگیری غدد لنفاوی بود.<sup>۱۶</sup>

پس از گردآوری نمونه‌ها و بررسی جنسیت بیماران، مشاهده گردید که ۷۲/۵٪ از بیماران مبتلا به کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن مرد و حدود ۲۷/۵٪ زن هستند. بر اساس آمار منتشر شده از همان بررسی ۱۵ ساله بر کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن ایران، تعداد مردان مبتلا حدود ۱/۵ برابر تعداد زنان مبتلا بوده است.<sup>۱۶</sup> در مطالعه‌ی دیگر، از مجموع ۱۱۰۸ بیمار مبتلا به سرطان سر و گردن، ۹۶۵ نفر این عارضه را در بافت سنگفرشی داشتند که شامل

بعد بافت را با نیتروژن مایع و هاونگ چینی خرد و له شد. استخراج DNA از روش ترایزول بر پایه کلروفرم انجام شد.

نمونه‌ها برای توالی‌های مورد نظر حاوی کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS و کدون V600E ژن BRAF با روش Multiplex-PCR تکثیر شد. برای اطمینان از درستی و دقت PCR، محصول PCR با روش الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل آمید (PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. سپس محصولات PCR از طریق آزمون استریپ KRAS StripAssay® (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) برای جهش‌های یاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

در این مطالعه، بیماران انتخاب شده دارای میانگین سنی ۶۳/۸ سال و نسبت تعداد مردان به زنان مبتلا نیز ۲۹ به ۱۱ (حدود ۱:۳) بود. در ۱۱ نفر از بیماران جهش دو ژن KRAS و BRAF را مشاهده شد. میزان جهش‌ها به این صورت بود که حدود ۱۷/۵٪ جهش در آگزون ۲ ژن KRAS مشاهده شد که شامل ۱۰٪ جهش تبدیل گلیسین به اسپاراتات و نیز ۵٪ جهش گلیسین به سرین در کدون ۱۲ و ۲/۵٪ جهش تبدیل‌کننده‌ی گلیسین به اسپاراتات در کدون ۱۳ بود. در ژن BRAF نیز ۱۰٪ جهش مشاهده شد. در یک بیمار نیز، به‌طور همزمان، دو جهش در کدون ۱۲ مشاهده گردید که نشان از ناهمگن بودن (هتروژنیته) توده‌ی سرطانی داشت (جدول ۱).

### بحث

در یک مطالعه بر ۵۹ نفر از مبتلایان سرطان کولورکتال در ایران، بیماران مبتلا به دلیل جهش در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS حدود ۵۰-۲۰٪ بودند.<sup>۱۳</sup> در عین حال آمار و ارقام متناقضی از یک بیماری در سراسر دنیا به چشم می‌خورد که به‌دلیل تفاوت‌های اقلیمی، تفاوت در رژیم غذایی و میزان متفاوت مواجهه با مواد سرطان‌زا می‌باشد. به‌عنوان مثال، در یک بررسی بر ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال، در کشور مصر و به‌روش KRAS StripAssay حدود ۸۰٪ از مبتلایان با جهش در این ژن تایید شدند.<sup>۱۴</sup> تاکنون مطالعات کمی بر ژن‌های KRAS و BRAF در کارسینومای بافت سنگفرشی سر و گردن انجام

مطالعه‌ای که بر روی ۴۲۸ بیمار مبتلا به HNSCC در کشور کانادا انجام شد، هیچ جهشی در کدون ۱۳ این ژن یافت نگردید.<sup>۲۲</sup> وجود جهش‌های متفاوت به‌طور هم‌زمان در کدون ۱۲ در ژن KRAS نیز در پژوهشی در کشور ایتالیا گزارش و تایید شد. در این مطالعه، دو جهش شامل جایگزینی نقطه‌ای والین و سرین در کدون ۱۲ این ژن بود.

تاثیر جهش‌های متنوع در این ژن بر بقا توسط این حقیقت قابل توصیف است که ناهمگن بودن جهش‌ها، توانایی متفاوتی در استعداد سرطان‌زایی سلول جهش‌یافته ایجاد می‌کند، به‌طوری که رفتار تهاجمی‌تری در توده‌های دارای جهش p.G12V و بیش از آن در توده‌های دارای جهش p.G12D دیده می‌شود.<sup>۲۳</sup> در بررسی دیگری نیز، ۵۳/۸٪ از بیماران دارای جهش در دو کدون ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS بودند. از ۱۲۶ جهش یافت شده در این ژن ۵۷/۹٪ در کدون ۱۳ و ۲۳٪ در کدون ۱۲ اعلام شدند. ارزیابی با روش توالی‌یابی پایرو، آمار بالایی از وجود هم‌زمان جهش در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ را در یک تومور نشان داد.<sup>۲۴</sup>

در این پژوهش، از میان ۴۰ بیمار مورد بررسی، چهار جهش در ژن BRAF دیده شد که این آمار با مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر سازگاری نداشت. برای نمونه، یک مطالعه در کشور آلمان میزان جهش این ژن را در کارسینومای بافت سنگ‌فرشی سر و گردن ۳٪ و مطالعه‌ای دیگر در کشور آمریکا این میزان را ۲/۴٪ اعلام کردند.<sup>۲۵</sup> مطالعه‌ی حاضر نشان‌دهنده‌ی میزان به‌نسبت بالای جهش در دو ژن KRAS و BRAF در نمونه‌های مربوط به کارسینومای بافت سنگ‌فرشی سر و گردن بود که مشاهده‌ی ۱۷/۵٪ جهش در ژن KRAS و ۱۰٪ در ژن BRAF ما را به نتیجه‌ی مدنظر رساند. همچنین همانطور که انتظار می‌رفت میزان ابتلا در مردان در حدود سه برابر زنان بود و ابتلا در سنین بالای ۵۰ سال، حدود ۷۰٪ بود.

سپاسگزاری: این مقاله، حاصل پایان‌نامه با عنوان "بررسی جهش‌های شایع ژن‌های KRAS و BRAF در بیماران مبتلا به کارسینومای اسکواموس سل سر و گردن (HNSCC) است" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ و کد ۷۲ می‌باشد که با همکاری آزمایشگاه ژنتیک، مرکز جراحی سرطان و بانک تومور بیمارستان امام‌خمینی (ره)، مرکز جراحی بیمارستان ولیعصر (عج) و حمایت دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

۲۵۲ زن (۲۶/۱٪) و ۷۱۳ مرد (۷۳/۹٪) بودند. تعداد مردان حدود سه برابر زنان مبتلا بود که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت.<sup>۱۷</sup> از روش استریپ اسی و بررسی ۱۱ جهش شایع در دو ژن KRAS و BRAF چنین استنتاج شد که شش نفر از بیماران، معادل ۱۷/۵٪ دارای جهش KRAS و چهار نفر معادل ۱۰٪ دارای جهش BRAF بوده‌اند. شایعترین جهش‌ها در ژن KRAS شامل Codon 12 Asp در ۱۰٪، Codon 12 Ser در ۵٪، Codon 13 Asp در ۲/۵٪ و در ژن BRAF در کدون V600E در ۱۰٪ موارد بودند که از همه شایع‌تر، جایگزینی Asp به Gly در کدون ۱۲ ژن KRAS بود. نکته‌ی جالب توجه این بود که یک از بیماران دارای دو جهش در کدون ۱۲ ژن KRAS بود.

در مطالعات همه‌ی سرطان‌ها نظیر کولورکتال، شایعترین جهش‌ها در کدون‌های ۱۲ و ۱۳ اعلام شده و این جهش‌ها به‌عنوان پیش‌گوهایی منفی پاسخ به داروهای anti-EGFR تایید شده است. شایعترین جهش‌ها در ژن KRAS در کدون ۱۲ و شامل جایگزینی‌های آمینواسیدی G12D، G12S و G13D می‌باشد که جهش‌های G12D (جایگزینی ژنتیکی Asp به Gly) از بقیه شایع‌تر است. در کدون ۱۳ شایعترین جهش در پروتیین، p.G13D است. این نتایج با مشاهدات ما سازگار است.<sup>۱۸</sup> امروزه مطالعات محدودی برای تعیین وضعیت جهش در ژن KRAS کارسینومای بافت سنگ‌فرشی سر و گردن انجام می‌شود و نتایج آن‌ها نیز با هم متناقض هستند، همانند یک بررسی جدید توسط Smilek و همکاران بر ۲۷ بیمار، که تعداد جهش‌های این ژن را حدود ۱۵٪ اعلام کرد.<sup>۱۸</sup>

Weber و همکاران، میزان این جهش‌ها را ۶٪ اعلام کردند، درحالی‌که Van Damme و همکارانش این آمار را با بررسی ۲۲ بیمار تنها در یک نفر و حدود ۴/۵٪ یافتند.<sup>۱۹</sup> میزان جهش‌های ژن KRAS، در مطالعه‌ای دیگر ۱۵٪ اعلام شد. این مطالعه بر ۲۷ بیمار مبتلا به کارسینومای بافت سنگ‌فرشی سر و گردن انجام شده بود.<sup>۲۰</sup> به‌تازگی نیز، پژوهشی که با روش آنالیز منحنی ذوب (HRM) بر بیماران مبتلا به کارسینومای بافت سنگ‌فرشی سر و گردن انجام و با دو روش تعیین توالی و ارزیابی استریپ تایید شد میزان جهش‌های این ژن را ۷٪ اعلام کرد.<sup>۲۱</sup>

در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین تعداد جهش‌های کدون ۱۲ جایگزینی Asp بود که سایر مطالعات را تایید می‌کرد. ولی در

## References

- Dok R, Nuyts S. HPV positive head and neck cancers: molecular pathogenesis and evolving treatment strategies. *Cancers (Basel)* 2016;8(4). pii: E41.
- Dixit R, Weissfeld JL, Wilson DO, Balogh P, Sufka P, Siegfried JM, et al. Incidence of head and neck squamous cell carcinoma among subjects at high risk of lung cancer: results from the Pittsburgh Lung Screening Study. *Cancer* 2015;121(9):1431-5.
- Rooth C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. *Br J Nurs* 2013;22(17):S23-30.
- Gupta B, Johnson NW. Emerging and established global life-style risk factors for cancer of the upper aero-digestive tract. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(15):5983-91.
- Izzo A, Perrotta F, Cennamo A, Cerqua FS, Rinaldi L, Mazzella A, et al. Spirometry in elderly laryngectomized patients: A feasibility study. *Int J Surg* 2016;33 Suppl 1:S4-8.
- Walden MJ, Aygun N. Head and neck cancer. *Semin Roentgenol* 2013;48(1):75-86.
- Dal Maso L, Torelli N, Biancotto E, Di Maso M, Gini A, Franchin G, et al. Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *Eur J Epidemiol* 2016;31(4):385-93.
- Brook JS, Rubenstone E, Zhang C, Brook DW. Better late than never: the perceived benefits of smoking cessation among women in late midlife. *J Addict Dis* 2014;33(3):266-73.
- PDQ Cancer Information Summaries. Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer Prevention (PDQ®) [Internet] 28 Apr 2017 [Cited 2017 Sep 15]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65979/>
- Perera RT, Fleming AM, Johnson RP, Burrows CJ, White HS. Detection of benzo[a]pyrene-guanine adducts in single-stranded DNA using the  $\alpha$ -hemolysin nanopore. *Nanotechnology* 2015;26(7):074002.
- Phuchareon J, McCormick F, Eisele DW, Tetsu O. EGFR inhibition evokes innate drug resistance in lung cancer cells by preventing Akt activity and thus inactivating Ets-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(29):E3855-63.
- Greene FL. A cancer staging perspective: the value of anatomical staging. *J Surg Oncol* 2007;95(1):6-7.
- 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. *G3M* 2010;8(2):2011-8.
- Abd E Kader Y, Emera G, Safwat E, Kassem HA, Kassem NM. The KRAS StripAssay for detection of KRAS mutation in Egyptian patients with colorectal cancer (CRC): a pilot study. *J Egypt Natl Canc Inst* 2013;25(1):37-41.
- Bruckman KC, Schönleben F, Qiu W, Woo VL, Su GH. Mutational analyses of the BRAF, KRAS, and PIK3CA genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110(5):632-7.
- Mafi N, Kadivar M, Hosseini N, Ahmadi S, Zare-Mirzaie A. Head and neck squamous cell carcinoma in Iranian patients and risk factors in young adults: a fifteen-year study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(7):3373-8.
- Hoang T, Zhang C, Geye HM, Speer T, Yu M, Wiederholt PA, et al. Gender associations in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). ASCO Annual Meeting Proceedings; 2012.
- Smilek P, Neuwirthová J, Jarkovsky J, Dusek L, Rottenberg J, Kostrica R, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 2012;59(5):508.
- Van Damme N, Deron P, Van Roy N, Demetter P, Bols A, Van Dorpe J, et al. Epidermal growth factor receptor and K-RAS status in two cohorts of squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 2010;10:189.
- Weber A, Langhanki L, Sommerer F, Markwarth A, Wittekind C, Tannapfel A. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene* 2003;22(30):4757-9.
- Boeckx C, Weyn C, Vanden Bempt I, Deschoolmeester V, Wouters A, Specenier P, et al. Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response. *BMC Res Notes* 2014;7:337.
- Bissada E, Abboud O, Abou Chacra Z, Guertin L, Weng X, Nguyen-Tan PF, et al. Prevalence of K-RAS codons 12 and 13 mutations in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and impact on clinical outcomes. *Int J Otolaryngol* 2013;2013:848021.
- Improta G, Zupa A, Possidente L, Tartarone A, Pedicini P, Nappi A, et al. Coexistence of two different mutations in codon 12 of the Kras gene in colorectal cancer: Report of a case supporting the concept of tumoral heterogeneity. *Oncol Lett* 2013;5(5):1741-1743.
- Kosmidou V, Oikonomou E, Vlasi M, Avlonitis S, Katseli A, Tspiras I, et al. Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat* 2014;35(3):329-40.
- De Carvalho TG, De Carvalho AC, Maia DC, Ogawa JK, Carvalho AL, Vettore AL. Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013;30(1):334-40.

## Common mutations assay of KRAS and BRAF genes in patients affected with Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)

Razieh Zarifian Yeganeh  
M.Sc.<sup>1</sup>  
Abbas Shakoori Garakani M.D.,  
Ph.D.<sup>1,2</sup>  
Saman Mehrabi M.Sc.<sup>1</sup>  
Nader Ebadi Ph.D. Student<sup>1</sup>  
Maziar Motiee Langroudi  
M.D.<sup>3</sup>  
Mohammad Reza Noori Daloui  
Ph.D.<sup>1\*</sup>

1- Department of Medical Genetics,  
School of Medicine, Tehran  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran.

2- Genetic Laboratory, Cancer  
Institute, Imam Khomeini Hospital,  
Tehran University of Medical  
Sciences, Tehran, Iran.

3- Surgery Center, Cancer Institute,  
Imam Khomeini Hospital, Tehran  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran.

\* Corresponding author: Department of  
Medical Genetics, School of Medicine,  
Tehran University of Medical Sciences,  
Pour Sina Ave., Enqelab St., Tehran,  
Iran.  
Tel: +98- 21- 88953005  
E-mail: nooridaloui@sina.tums.ac.ir

### Abstract

Received: 10 May 2017 Revised: 13 Oct. 2017 Accepted: 21 Oct. 2017 Available online: 22 Oct. 2017

**Background:** Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the malignancy of squamous cells (the epidermal layer of skin) in cavities in head and neck includes: larynx, pharynx, paranasal sinuses and oral cavity. The main goal of this research was to understand the effect of mutations in two important genes (KRAS and BRAF) in RAS/MAP kinase (EGFR) signaling pathway in tumor cells with head and neck squamous cell carcinoma in Iran.

**Methods:** The present cross-sectional study performed from October 2015 to September 2016 on 40 patients suffering from head and neck squamous cell carcinoma, all confirmed by pathology department of Imam Khomeini hospital. Tumor samples were achieved from the surgical cancer department of Imam Khomeini hospital and stored in liquid nitrogen until starting tests. The tests done in genetic laboratory of Tehran University of Medical Sciences. Techniques we used in this research, were DNA extraction based on phenol-chloroform approach, Multiplex PCR (M-PCR) to amplify mentioned exons and KRAS/BRAF strip assays to detect mutations in mutated hotspots in exon 2 of KRAS and codon V600E in BRAF gene.

**Results:** In this study, we observed 7 mutations in codons 12 and 13 exon 2 in KRAS gene (about 17.5%) and 4 mutations in codon V600E in BRAF gene (about 10%) of obtained tumor samples. The hotspot mutation in codon 12 were Asp (10%) and Ser (5%) respectively. In BRAF, the most common mutation, as we expected according to other researches, was observed in codon V600E. We also observed that 29 people of these patients were male (about 72.5%) and 11 patients were female (about 27.5%). Moreover, 28 patients were over 50 years, while 7 patients were below the age of 50.

**Conclusion:** The results of this study showed that mutations in genes KRAS and BRAF especially in studied hotspots, and the effects on their molecules in EGFR signaling pathway are important in involving head and neck squamous cell carcinoma, as other cancers. These findings may be considered in choosing drugs for targeted chemotherapy.

**Keywords:** biological assay, BRAF, cross-sectional studies, head and neck squamous cell carcinoma, KRAS, mutation.