

**PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM MỘT SỐ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN GENE  
*KRAS*, *BRAF* VÀ *HSP110* Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ ĐẠI TRỰC TRÀNG**

*Vũ Sơn Giang*<sup>1\*</sup>, *Nguyễn Thị Thân*<sup>1</sup>, *Nguyễn Linh Toàn*<sup>2</sup>, *Hồ Văn Sơn*<sup>1</sup>

**Tóm tắt**

**Mục tiêu:** Xác định tỷ lệ đột biến gene *KRAS*, *BRAF*, *HSP110* và mối tương quan với phân type mô bệnh học ở nhóm bệnh nhân (BN) polyp đại trực tràng so sánh với ung thư đại trực tràng (UTĐTT). **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang sử dụng kỹ thuật Real-time PCR xác định tỷ lệ đột biến *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* trên 149 BN được chẩn đoán mắc UTĐTT và 109 BN polyp tại Bệnh viện Quân y 175 từ năm 2022 - 2024. **Kết quả:** Đã xác định được tần suất đột biến *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* ở nhóm UTĐTT tương ứng là 36,9%, 5,4% và 17,4% so với nhóm polyp lần lượt là 21,1%, 2,8% và 37,6%; sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Đột biến *KRAS* có mối tương quan với phân type mô bệnh học ( $p = 0,049$ ). Ngoài ra, đột biến *KRAS* có xu hướng xuất hiện cùng đột biến *HSP110*, trong khi không có mẫu bệnh phẩm nào dương tính với cả *KRAS/BRAF* hay *HSP110/BRAF*. **Kết luận:** Tỷ lệ mang đột biến *KRAS*, *BRAF* tăng lên ở BN UTĐTT trong khi đột biến gene *HSP110* giảm. Có sự khác biệt giữa tỷ lệ đột biến *KRAS* ở các nhóm BN khác nhau về phân type mô bệnh học. Các đột biến *BRAF* và *HSP110* là ngẫu nhiên giữa các nhóm BN UTĐTT.

**Từ khóa:** Ung thư đại trực tràng; Đột biến gene; *KRAS*; *BRAF*; *HSP110*.

**ANALYSIS OF CHARACTERISTICS OF *KRAS*, *BRAF*, AND *HSP110*  
GENETIC ALTERATIONS IN COLORECTAL CANCER PATIENTS**

**Abstract**

**Objectives:** To determine the rate of *KRAS*, *BRAF*, and *HSP110* gene mutations and their correlation with histopathological subtypes in the group of patients with colorectal polyps compared to those with colorectal cancer (CRC).

<sup>1</sup>Bệnh viện Quân y 175

<sup>2</sup>Học viện Quân y

\*Tác giả liên hệ: Vũ Sơn Giang (bsgiang175@gmail.com)

Ngày nhận bài: 25/9/2024

Ngày được chấp nhận đăng: 03/12/2024

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i2.1034>

**Methods:** A cross-sectional descriptive study using the Real-time PCR technique to determine the rate of *KRAS*, *BRAF*, and *HSP110* mutations was conducted on 149 patients diagnosed with CRC and 109 patients with colorectal polyps at Military Hospital 175 from 2022 to 2024. **Results:** The frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *HSP110* mutations in the CRC group were 36.9%, 5.4%, and 17.4%, respectively, compared to the polyp group of 21.1%, 2.8%, and 37.6%, respectively; the differences were statistically significant with  $p < 0.05$ . *KRAS* mutations were correlated with histopathological subtype ( $p = 0.049$ ). In addition, *KRAS* mutations tended to appear with *HSP110* mutations, while no specimens were positive for both *KRAS/BRAF* or *HSP110/BRAF*. **Conclusion:** The rate of *KRAS* and *BRAF* mutations increased in patients with CRC while the *HSP110* gene decreased. There was a difference between the rate of *KRAS* mutations in different patient groups according to histopathological subtype. *BRAF* and *HSP110* mutations were random among CRC patient groups.

**Keywords:** Colorectal cancer; Gene mutation; *KRAS*; *BRAF*; *HSP110*.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Đột biến gene *KRAS*, *BRAF* trong con đường tín hiệu *RAS/RAF/MAPK* đã được chứng minh là yếu tố tiên lượng gây nên tính kháng với kháng thể đơn dòng, yếu tố tăng trưởng biểu bì (anti-EGFR-mAb) như Cetuximab và Panitumumab [3]. BN không mang đột biến *KRAS*, *BRAF* sẽ nhạy cảm với các liệu pháp này. Do đó, xét nghiệm đột biến gene *KRAS/BRAF* có vai trò quan trọng trong việc lựa chọn phác đồ điều trị, cho phép bác sĩ lâm sàng dự đoán hiệu quả của thuốc và đặc điểm phân tử của khối u [1]. Gene tổng hợp các protein khi cơ thể bị kích thích như tăng thân nhiệt, thiếu oxy, cũng như các yếu tố bệnh lý như ung thư, nhiễm trùng,... được biết đến là nhóm gene *HSP110* [2]. Gần đây,

đã có báo cáo về tần suất đột biến *HSP110 T17* cao xảy ra tại intron 8 (*HSP110DE9*) trong các trường hợp CRC dương tính với MSI [3, 4]. BN CRC chứa đột biến *HSP110* làm tăng độ nhạy cảm với 5-Fluorouracil và oxaliplatin [2, 3, 4]. Bên cạnh đó, Dorard và CS (2014) kết luận BN mang đột biến *HSP110* sẽ đáp ứng hóa trị tốt hơn BN không có đột biến [5]. Do đó, phân tích đột biến *HSP110* trở thành xét nghiệm các trường hợp CRC MSI cao để có phác đồ điều trị phù hợp cho BN. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: *Xác định tỷ lệ đột biến gene KRAS, BRAF, HSP110 giữa BN polyp đại trực tràng và UTĐTT và đánh giá sơ bộ về mối tương quan giữa trạng thái đột biến KRAS, BRAF, HSP110 và một số đặc điểm mô bệnh học.*

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng nghiên cứu

149 BN được chẩn đoán UTĐTT và 109 BN polyp trong giai đoạn từ năm 2022 - 2024 tại Bệnh viện Quân y 175.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Thiết kế nghiên cứu*: Nghiên cứu mô tả cắt ngang sử dụng một số kỹ thuật sinh học phân tử như:

- Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu đúc FFPE sử dụng bộ kit QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Valencia, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ, độ tinh sạch DNA tổng số được xác định bằng máy quang phổ Nanodrop 2000 (Thermo).

- Xác định đột biến *KRAS*, *BRAF*: Bộ kit *KRAS/BRAF/NRAS Detection Mutations Kit* (Amoy) được sử dụng để phát hiện đồng thời các biến đổi trên

2 gene *KRAS* và *BRAF* bằng kỹ thuật Real-time PCR với khuôn là các phân tử DNA thu từ mẫu FFPE. Bộ kit giúp phát hiện các đột biến thường gặp như đột biến tại các codon G12S/D; G12C/R/V/A; G13C; G13D trên exon 2; đột biến tại codon A59T, Q61K; Q61L/R/H trên exon 3 và các đột biến tại codon K117N, A146T/V/P trên exon 4 của *KRAS*; và đột biến V600E trên exon 15 của *BRAF*.

- Xác định đột biến *HSP110* bằng kỹ thuật Real-time PCR: Tham khảo các công bố về cấu trúc và trình tự gene *HSP110* [mã số NM\_006644.4] sử dụng phần mềm FastPCR, chúng tôi thiết kế các primer/probe đặc hiệu phát hiện đột biến mất đoạn gene *HSP110*. Các probe giúp phân biệt chính xác DNA bị đột biến, DNA không mang đột biến. Trình tự primer/probe và điều kiện qPCR tối ưu được trình bày trong bảng 1.

**Bảng 1.** Trình tự primer và Probe sử dụng trong nghiên cứu.

Primer	Trình tự (5' - 3')	Điều kiện
Hsp110 F8	AGATATTAGCACAACTCAATGC	50°C 20'; 95°C 2'; [95°C 30'' 60°C 30''] *40
Hsp110 R10	GAGCAGCATGGTTTCGACTAA	
Probe	R1:FAM-AGTATTGCACACTGTAATGCACATCCTCTG R2:Hex-CTCATGAACACTGTAATGCACATCCTCTG	chu kỳ, đọc tín hiệu tại 60°C

\* *Xử lý và phân tích số liệu*: Số liệu được xử lý, phân tích bằng phần mềm thống kê GraphPath Prism 9.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức Bệnh viện Quân y 175 (GCN số 58/GCN-HĐĐĐ ngày 10/01/2023). Số liệu nghiên cứu được Bệnh viện Quân y 175 cho phép sử dụng và công bố. Thông tin của BN được đảm bảo giữ bí mật. Các kết quả xét nghiệm chỉ có giá trị trong nghiên cứu và không áp dụng trong điều trị hay cho bất kỳ mục đích thương mại. Nhóm nghiên cứu cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Đặc điểm BN trong nghiên cứu

Đặc điểm BN UTĐTT và polyp đại trực tràng trong nghiên cứu được đánh giá theo các đặc điểm độ tuổi, giới tính, vị trí u và phân type mô bệnh học. Độ tuổi trung bình của BN là  $59,64 \pm 11,66$  và  $58,45 \pm 9,65$ . Phần lớn mẫu bệnh phẩm được thu ở đại tràng và ở các trường hợp là nam giới (68,46% đối với UTĐTT và 83,49% đối với nhóm polyp). Theo phân type mô bệnh học, ung thư biểu mô tuyến chiếm ưu thế ở BN UTĐTT và u tuyến chiếm phần lớn.

**Bảng 2.** Đặc điểm nhóm mẫu nghiên cứu.

	Đặc điểm	UTĐTT, n (%)	Polyp, n (%)
Tuổi	< 40	8 (5,37)	6 (50,00)
	40 - 60	61 (40,94)	49 (44,95)
	≥ 60	80 (53,69)	54 (49,54)
	Trung vị	61	59
	Khoảng tuổi	27 - 83	31 - 78
Giới tính	Nam	102 (68,46)	91 (83,49)
	Nữ	47 (31,54)	18 (16,51)
Vị trí u	Đại tràng	83 (55,70)	88 (80,73)
	Trực tràng	66 (44,30)	20 (18,35)
Thể mô bệnh học	UTBM tuyến	116 (77,85)	
	UTBM tuyến nhày	33 (22,15)	
	U tuyến		91 (83,49)
	Polyp tăng sản		15 (13,76)
	Polyp dạng viêm		2 (1,83)
	Polyp Peutz-Jegher		1 (0,92)

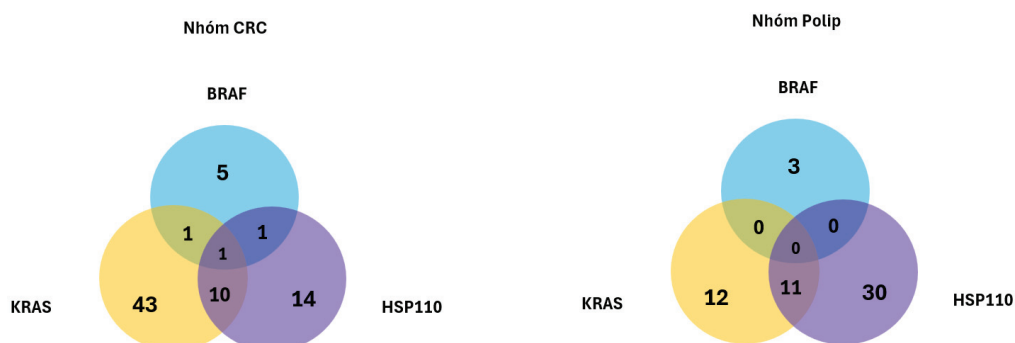
## 2. Tỷ lệ đột biến gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110*

Tỷ lệ biến đổi các gene ở BN UTĐTT trong nghiên cứu bao gồm *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* lần lượt là 36,9%, 5,4% và 17,4% (Bảng 3). Có sự khác biệt về tỷ lệ mang đột biến *KRAS* và *HSP110* ở BN UTĐTT và polyp đại tràng ( $p < 0,05$ ); trong khi, không quan sát thấy sự khác biệt về tỷ lệ mang đột biến *BRAF* ở BN UTĐTT và polyp.

**Bảng 3.** Tỷ lệ đột biến các gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110*.

Đặc điểm		UTĐTT n (%)	Polyp n (%)	p (Fisher's exact test)
Đột biến <i>BRAF</i>	Không	141 (94,6)	106 (97,2)	0,3649
	Có	8 (5,4)	3 (2,8)	
Đột biến <i>KRAS</i>	Không	94 (63,1)	86 (78,9)	0,0063
	Có	55 (36,9)	23 (21,1)	
Đột biến <i>HSP110</i>	Không	123 (82,6)	68 (62,4)	0,0003
	Có	26 (17,4)	41 (37,6)	

Có 62/149 BN UTĐTT mang một trong ba loại đột biến (41,6%). Tỷ lệ mang đột biến *KRAS* là cao nhất (28,86%). Có duy nhất 1 BN mang đồng thời cả ba đột biến *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* hoặc mang hai đột biến *BRAF/HSP110* hoặc *BRAF/KRAS* và không quan sát thấy hiện tượng này ở BN polyp. Các gene tham gia cùng đường truyền tín hiệu, chẳng hạn như *RAS/RAF/MAPK* hay *PI3K/AKT/mTOR* thường có tính loại trừ lẫn nhau, nên tỷ lệ BN mang đồng thời các đột biến rất thấp. Tuy nhiên, đột biến *KRAS* có xu hướng cùng tồn tại với đột biến *HSP110*.



**Hình 1.** Biểu đồ Venn thể hiện số mẫu dương tính đột biến gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110*.

*KRAS* có 5 dạng đột biến ở các codon 12, 13, 61, 117 và 146. Loại đột biến gene *KRAS* thường gặp nhất xảy ra tại exon 2. Gene *BRAF* có 1 loại đột biến V600E, gene *HSP110* có một loại đột biến mất đoạn xảy ra trên intron 8. Tần suất BN mang đột biến *BRAF*, *KRAS* ở UTĐTT cao hơn các trường hợp mắc polyp; trong khi, đột biến *HSP110* có xu hướng ngược lại, BN polyp lại mang tỷ lệ đột biến cao hơn UTĐTT (Bảng 4).

**Bảng 4.** Các dạng đột biến gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110*.

Gene	Loại đột biến	Vị trí	Biến thể	UTĐTT n (%)	Polyp n (%)
<i>KRAS</i>	Đột biến thay thế	Exon 2	G12S/D	15 (27,27)	9 (39,13)
			G12C/R/V/A; G13C	22 (40,00)	11 (47,83)
			G13D	12 (21,82)	2 (8,70)
		Exon 3	A59T, Q61K	0 (0,00)	0 (0,00)
			Q61L/R/H	5 (9,09)	1 (4,35)
Exon 4	K117N, A146T/V/P	1 (1,82)	0 (0,00)		
<i>BRAF</i>	Đột biến thay thế	Exon 15	V600E	8 (5,40)	3 (2,80)
<i>HSP110</i>	Đột biến mất đoạn	Intron8		26 (17,40)	41 (37,60)

### 3. Mối liên quan giữa biến đổi gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* với một số đặc điểm của BN

Mối liên quan giữa những biến đổi di truyền liên quan đến các gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* và một số đặc điểm của BN trong nghiên cứu bao gồm độ tuổi, giới tính, vị trí u và phân type thể mô bệnh học được trình bày trong bảng 4. Kết quả cho thấy đột biến *KRAS* có xu hướng xảy ra phổ biến ở phân type ung thư biểu mô tuyến hơn ung thư biểu mô tuyến nhầy ( $p = 0,049$ ). Đột biến *BRAF* có xu hướng xuất hiện ở đại tràng hơn trực tràng. Không có sự khác biệt về biến đổi di truyền của *BRAF*, *HSP110* giữa BN theo độ tuổi, giới tính và phân type mô bệnh học (Bảng 5).



**Bảng 5.** Mối liên hệ giữa đột biến gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* với đặc điểm mô bệnh học.

Đặc điểm	Đột biến <i>BRAF</i>			Đột biến <i>KRAS</i>			Đột biến <i>HSP110</i>			
	Không	Có	p	Không	Có	p	Không	Có	p	
Tuổi	< 40	8	0	5	3		7	1		
	40 - 60	57	4	0,826*	41	20	0,723*	50	11	1*
	≥ 60	76	4		48	32		66	14	
Giới tính	Nam	96	6	1*	67	35	0,333**	82	20	0,307**
	Nữ	45	2		27	20		41	6	
Vị trí u	Đại tràng	76	7	0,077*	49	34	0,250**	66	17	0,274**
	Trực tràng	65	1		45	21		57	9	
Thể mô bệnh học	UTBM tuyến	111	5	0,376*	78	38	0,049**	97	19	0,603*
	UTBM tuyến nhầy	30	3		16	17		26	7	

(\*Fisher's exact test; \*\*Chi-square test)

### BÀN LUẬN

Con đường tín hiệu *EGFR* tham gia vào nhiều hoạt động quan trọng của tế bào. Rối loạn con đường tín hiệu này được quan sát ở nhiều loại ung thư, trong đó có UTĐTT. Dựa trên sự biến đổi này, liệu pháp điều trị đích sử dụng kháng thể đơn dòng kháng *EGFR* cải thiện đáng kể kết quả điều trị. Tuy vậy, các báo cáo chỉ ra một số đột biến trên gene *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA* và *AKT* liên quan đến việc đáp ứng kém với liệu pháp kháng thể kháng *EGFR*.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ đột biến *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* trên mẫu polyp lần lượt là 21,1%, 2,8% và 37,6%; tỷ lệ mang đột biến *KRAS* và *BRAF* tăng lên ở BN UTĐTT (36,9% và 5,4%), trong khi tỷ lệ đột biến gene *HSP110* lại giảm xuống 17,4%. Tần suất đột biến *KRAS* ở BN UTĐTT rất khác nhau giữa các quần thể trên thế giới, dao động từ 13 - 66% [6, 7, 8, 9]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tỷ lệ đột biến *KRAS* ở BN UTĐTT là 36,9% phù hợp với tỷ lệ các nước châu Á (22 - 66%) [6, 7]. Đột biến *BRAF*

xảy ra trên exon 15 (V600E) là đột biến phổ biến nhất, chiếm đến 90% ở BN UTĐTT [10]. Tần suất mang đột biến *BRAF* dao động từ 1,1 - 25% trên thế giới [6, 7, 8, 9]. Chúng tôi phát hiện 8/149 (5,4%) BN mang đột biến *BRAF*, phù hợp với tỷ lệ được quan sát ở châu Á (1,1 - 5,8%). Như vậy, có sự khác biệt về tần suất có đột biến giữa các nghiên cứu có thể do yếu tố chủng tộc, kỹ thuật phân tích đột biến, cỡ mẫu và đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu. Đặc biệt, kết quả nghiên cứu cho thấy những biến đổi gene *KRAS* và *BRAF* có xu hướng loại trừ nhau trong khi đột biến *KRAS* có xu hướng xảy ra đồng thời với đột biến *HSP110*. Các gene tham gia cùng đường truyền tín hiệu, chẳng hạn như *RAS/RAF/MAPK* hay *PI3K/AKT/mTOR* có tính loại trừ lẫn nhau. Việc phát hiện BN mang đột biến kép có thể chứng tỏ khối u đã tích lũy nhiều biến đổi về phân tử, cũng như tiến triển của bệnh và tiên lượng xấu. Tuy nhiên, do hiếm gặp, việc nhận định vai trò của những đột biến này cần được nghiên cứu thêm.

Trong UTĐTT, đột biến trên gene *KRAS* chiếm tỷ lệ cao nhất (36,9%) cũng như nhiều loại đột biến nhất, 5 dạng đột biến chủ yếu xảy ra trên exon 2 và exon 3. Tuy nhiên, do chúng tôi sử dụng bộ kit “*KRAS/BRAF/NRAS*Detection

Mutations Kit” giúp phát hiện đồng thời đột biến *KRAS/BRAF/NRAS* nên không thể phân tích rõ loại đột biến nào chiếm ưu thế trên exon 2 như các nghiên cứu khác, phân tích riêng lẻ đột biến *KRAS*. Đột biến *BRAF* V600E và *HSP110* chỉ mang duy nhất một loại đột biến, đây cũng là loại đột biến phổ biến trong nghiên cứu khác.

Đột biến *KRAS* có xu hướng xảy ra phổ biến ở phân type ung thư biểu mô tuyến hơn ung thư biểu mô tuyến nhày (25,5% với 11,4%). Kết quả của chúng tôi thu được tương đồng với công bố của Lee và CS (2022) khi phân tích đột biến *KRAS* trên BN ung thư đại tràng ở người Hàn Quốc [10]. Những biến đổi di truyền trên *BRAF*, *HSP110* hoàn toàn ngẫu nhiên với các yếu tố độ tuổi, giới tính, vị trí u và phân type mô bệnh học, thống nhất với đa phần các báo cáo [6, 7, 8, 9, 10]. Vì vậy, để có đánh giá chính xác hơn về sự biến đổi về tỷ lệ đột biến, sự tích lũy đồng thời các đột biến cũng như mối liên quan giữa đột biến và đặc điểm mô bệnh học trong nghiên cứu, cần tăng cỡ mẫu cũng như mở rộng phạm vi nghiên cứu.

## KẾT LUẬN

Tỷ lệ đột biến gene *KRAS*, *BRAF* và *HSP110* trên mẫu UTĐTT lần lượt là 36,9%, 5,4% và 17,4%; tỷ lệ mang đột



biến *KRAS*, *BRAF* giảm xuống ở BN polyp đại trực tràng (21,1% và 2,8%) trong khi tỷ lệ đột biến gene *HSP110* tăng trên mẫu polyp (37,6%). Có sự khác biệt giữa tỷ lệ đột biến *KRAS* ở các nhóm BN khác nhau về phân type mô bệnh học. Đột biến *BRAF* và *HSP110* là ngẫu nhiên giữa các nhóm BN UTĐTT. Quan sát thấy hiện tượng khối u đã tích lũy nhiều biến đổi về mặt phân tử khi BN UTĐTT mang đột biến kép *KRAS* và *HSP110*.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới Khoa Sinh hóa, Viện Ung bướu và Y học hạt nhân và Khoa Giải Phẫu bệnh lý, Bệnh viện Quân y 175 đã hỗ trợ và tạo điều kiện để thực hiện nghiên cứu này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Matsubara N. Epigenetic regulation and colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2012; 55(1):96-104. DOI: 10.1097/DCR.0B013E318233A1EF.

2. Kim KJ, Lee TH, Kim JH, Cho NY, Kim WH, Kang GH. Deletion in HSP110 T17: Correlation with wild-type HSP110 expression and prognostic significance in microsatellite-unstable advanced gastric cancers. *Hum Pathol*. 2017; 67:109-118. DOI: 10.1016/J.HUMPATH.2017.08.001.

3. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients with colorectal tumors

with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Gastroenterology*. 2014; 146(2). DOI: 10.1053/J.GASTRO.2013.10.054.

4. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Durães R, de Oliveira MA, Guimarães D, Reis RM. Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2018; 9(47):28691. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.25611.

5. Dorard C, De Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med*. 2011; 17(10):1283-1289. DOI: 10.1038/NM.2457.

6. Mao C, Zhou J, Yang Z, et al. KRAS, BRAF and PIK3CA mutations and the loss of PTEN expression in Chinese patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2012; 7(5). DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0036653.

7. Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, et al. Simultaneous identification of 36 mutations in KRAS codons 61 and 146, BRAF, NRAS, and PIK3CA in a single reaction by multiplex assay kit. *BMC Cancer*. 2013; 13. DOI: 10.1186/1471-2407-13-405.

8. Bisht S, Ahmad F, Sawaimoon S, Bhatia S, Das BR. Molecular spectrum of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutation: Determination of frequency, distribution pattern in Indian colorectal carcinoma. *Med Oncol.* 2014; 31(9):1-13. DOI: 10.1007/S12032-014-0124-3.

9. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in

metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2014; 53(7):852-864. DOI: 10.3109/0284186X.2014.895036.

10. Lee HW, Song B, Kim K. Colorectal cancers with a residual adenoma component: Clinicopathologic features and KRAS mutation. *PLoS One.* 2022; 17(9). DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0273723.