DOI: 10.48305/jims.v40.i693.0865

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهلم/شماره‌ی ۶۹۳/هفته‌ی اول دی ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۱ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۰ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۰/۷

آنتی‌ژن Ki-67؛ یک شناساگر زیستی پیشگویی‌کننده‌ی ارزشمند برای پیش‌آگهی لوسمی لنفوستیک مزمن

ولی‌اله مهرزاد[۱]، سمانه مددی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لوسمی لنفوسیتیک مزمن (Chronic lymphocytic leukemia) CLL، یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های خونی است. عمده سلول‌های درگیر در این بدخیمی در فاز G0 تقسیم سلولی قرار دارند و فعالیت تکثیری ندارند؛ با این وجود، آنچه شدت و پیش‌آگهی این بیماری را تعیین می‌کند، تکثیر سلولی است. آنتی‌ژن Ki-67، یک پروتئین هسته‌ی سلولی است که در تمامی فازهای تکثیر سلولی به جز فاز G0 حضور دارد. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی ارزش پیش‌آگهی بیان آنتی‌ژن Ki-67 در بیماران مبتلا به CLL و رفتار بیماری در آن‌ها اجرا شده است.

روش‌ها: مطالعه‌ی مقطعی حاضر بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به CLL در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. شدت بیماری بر اساس سیستم درجه‌بندی Rai شامل لنفادنوپاتی، ارگانومگالی و شمارش کامل خون (CBC diff) تعیین گردید که در ابتدای مطالعه و سپس در پیگیری شش ماهه ارزیابی شد. به علاوه سطح آنتی‌ژن Ki-67 با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شد و با نرم‌افزار FlowJo مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت، ارزش آنتی‌ژن Ki-67 جهت ارزیابی پیش‌آگهی CLL با استفاده از رسم منحنی ROC (Receiver operation curve) بررسی شد.

یافته‌ها: میانگین سنی افراد مورد ارزیابی ۱۰/۴۲ ± ۶۴/۱۲ سال بود. بیماران مورد مطالعه عمدتاً از آقایان (۶۸ درصد) تشکیل شده بودند. همچنین میانگین سطح آنتی‌ژن Ki-67 در این بیماران برابر با ۱/۷۳ ± ۲/۴۸ درصد به دست آمد. بدتر شدن سیستم درجه‌بندی Rai به ۳ و ۴، ارگانومگالی و دو برابر شدن تعداد گلبول‌های سفید با سطح بیان آنتی‌ژن Ki-67 ارتباط مستقیمی داشتند. حساسیت و اختصاصیت آنتی‌ژن Ki-67 در نقطه‌ی برش ۳/۴۴ درصد، برابر با ۸۷/۵ و ۹۲/۹ درصد به دست آمد. سطح زیر نمودار ROC، ۰/۹۴ (۹۵%CI: ۰/۰–۸۳۵/۹۸۸، P < ۰/۰۰۱) حاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: براساس این مطالعه، آنتی‌ژن Ki-67 یک شناساگر زیستی پیش‌آگهی‌دهنده‌ی ارزشمند برای پیش‌بینی الگوی پیشروندگی در CLL است. به علاوه، در نقطه‌ی برش ۳/۴۴ درصد، آنتی‌ژن Ki-67 ارزش پیش‌گویی‌کننده‌ی قابل قبولی در پیش‌بینی رفتار پیشرونده‌ی بیماری CLL دارد.

واژگان کلیدی: آنتی‌ژن Ki-67؛ بیو مارکر؛ لوسمی لنفوسیتیک مزمن؛ پیش‌آگهی‌دهنده

ارجاع: مهرزاد ولی‌اله، مددی سمانه. **آنتی‌ژن Ki-67؛ یک شناساگر زیستی پیشگویی‌کننده‌ی ارزشمند برای پیش‌آگهی لوسمی لنفوستیک مزمن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۹۳): ۸۷۲–۸۶۵

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic lymphocytic leukemia) CLL یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های خونی است که با تجمع سلول‌های B بالغ $CD5^+$ در خون محیطی، مغز استخوان و بافت‌های لنفاوی ثانویه مشخص می‌شود (۱). لذا، کارگاه بین‌المللی (International Workshop on CLL) iwCLL توضیحی برای CLL تحت عنوان وجود دائمی حداقل ۵۰۰۰ لنفوسیت B مونوکلونال در هر میکرولیتر از خون محیطی به مدت بیش از ۳ ماه ارائه کرد (۲).

از مدت‌ها پیش، CLL یک بیماری منفرد و اصولاً با پیشروندگی پایین و پیش‌آگهی خوب در نظر گرفته می‌شد، اما اخیراً ناهمگنی قابل توجهی در بیماران مبتلا به CLL از نظر مواردی نظیر سیتوژنز، تمایل به پیشرفت و پاسخ به درمان مورد توجه قرار گرفته است (۳). بنابراین، در کنار بررسی دقیق بالینی بیماران، شناساگرهای زیستی ژنتیکی برای افتراق میان بدخیمی‌ها با طبیعت خفیف در قیاس با موارد تهاجمی شدید مورد نیاز است. بر این اساس، چالش فزاینده‌ای برای انتخاب رویکرد درمانی برای بیماران پدید آمده است. علاوه بر

۱- دانشیار هماتولوژی و انکولوژی، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات پیشگیری از سرطان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- متخصص بیماری‌های داخلی، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سمانه مددی: متخصص بیماری‌های داخلی، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: samanemadadi@yahoo.com

این، بسیاری از رویکردهای درمانی امیدوارکننده، در دست بررسی هستند که باید بر اساس ماهیت و شدت پیشروندگی سرطان اتخاذ شوند (٤).

اینگونه برآورد می‌شود که اکثر سلول‌های درگیر در CLL، لنفوسیت‌های خاموش و در فاز G0 هستند (٥). با این حال، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد گروهی از سلول‌های لوسمیک دارای رفتاری تکثیریابنده بوده و باعث تکثیر روزانه ۰/۱-۱ درصد سلول‌های لوسمیک می‌شود. هرچند که بسیاری از این سلول‌های تکثیر شده به دنبال آپوپتوز خودبخودی از بین رفته و عمدتاً تعداد سلول‌ها متعادل باقی می‌ماند (٦-٨).

آنتی‌ژن Ki-67 که دو ایزوفرم پروتئینی با وزن مولکولی ۳٤٥ و ۳۹٥ کیلو دالتون را کد می‌کند، در ابتدا توسط Scholzer و Gerdes در اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ شناسایی شد (۹). این آنتی‌ژن، یک پروتئین هسته‌ای است که نیمه عمری ۱/٥-۱ ساعته دارد و در تمام مراحل فعال چرخه‌ی سلولی (G1، S، G2 و میتوز) بیان می‌شود، اما در سلول‌های خاموش در فاز G0 وجود ندارد (۱۰). آنتی‌ژن Ki-67 در طی میتوز وظیفه‌ی تشکیل لایه‌ی پری‌کروموزومی را دارد، که یک غلاف ریبونوکلئوپروتئینی بوده و کروموزوم‌های متراکم را پوشش می‌دهد. در این ساختار، Ki-67 از تجمع کروموزوم‌های میتوتیک و روی هم خوابیدن ساختارهای ژنتیکی طی میتوز جلوگیری می‌کند (۱۱). سطح بیان ژنی این آنتی‌ژن در طی فاز غیرتکثیریابنده‌ی سلولی، به سرعت کاهش می‌یابد. بنابراین، آن را به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای تعیین کسر رشد یک جمعیت سلولی معین فرض می‌نمایند. همین مشخصه توجه محققان را برای ارزیابی ارزش پیش‌آگهی این شناساگر زیستی برای شرایط بدخیم، به ویژه بیماری لنفوپرولیفراتیو، جلب کرده است (۱۲). لذا مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی ارزش پیش‌آگهی بیان آنتی‌ژن Ki-67 در بیماران مبتلا به CLL و رفتار بیماری در آن‌ها طراحی و اجرا شده است.

روش‌ها

مطالعه‌ی مقطعی حاضر بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به بدخیمی CLL مراجعه‌کننده به کلینیک‌های سرپایی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در سال ۱۳۹٦ انجام گرفت.

طرح پیشنهادی مطالعه‌ی حاضر که بر اساس معیارهای اخلاقی هلسینکی طراحی شده بود، به کمیته‌ی اخلاق در پژوهش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ارائه گردید و به تصویب این کمیته رسید. همچنین روش اجرای مطالعه برای بیماران و یا قیم قانونی ایشان توضیح داده شد، به ایشان در رابطه با محرمانه بودن اطلاعات شخصی اطمینان داده و رضایت کتبی جهت شرکت در مطالعه اخذ گردید.

بیماران بالای ۱۸ سال با تشخیص مستند CLL در مرحله‌ی صفر، یک و دو بیماری بر اساس سیستم مرحله‌بندی Rai (جدول ۱) (۱۳) که معیارهای نیاز به شروع درمان بر اساس دستورالعمل iwCLL (کم خونی پیشرونده، ترومبوسیتوپنی، اسپلنومگالی قابل توجه، لنفادنوپاتی قابل توجه، علائم constitutional شامل کاهش وزن، خستگی شدید، تب و تعریق شبانه) نداشتند، وارد مطالعه شدند. عدم تمایل به شرکت در مطالعه و یا فوت پیش از اتمام مطالعه، به عنوان معیار خروج از مطالعه تعریف گردید.

جدول ۱. مرحله‌بندی Rai جهت ارزیابی شدت لوسمی لنفوسیتیک مزمن (۱۳)

مرحله‌بندی	علائم و نشانه‌ها
۰	لنفوسیتوز بدون علائم بالینی
۱	لنفوسیتوز و لنفادنوپاتی
۲	لنفوسیتوز، لنفادنوپاتی و ارگانومگالی*
۳	لنفوسیتوز و آنمی با/ بدون لنفادنوپاتی و/ یا ارگانومگالی
۴	لنفوسیتوز و ترومبوسیتوپی با/ بدون لنفادنوپاتی، ارگانومگالی و/ یا آنمی

*ارگانومگالی: هپاتومگالی و/ یا اسپلنومگالی

تشخیص CLL اساساً با یافته‌هایی از جمله لنفوسیتوز در مطالعه‌ی آزمایشگاهی شمارش کامل خون (CBC diff) و یافته‌های موجود در اسمیر خون محیطی مطرح شده و در نهایت با مطالعه‌ی فلوسایتومتری سازگار با تظاهرات CLL، از جمله $CD5^+$، $CD19^+$، $CD20^+$ و $CD23^+$ تأیید گردید.

افراد مورد مطالعه با استفاده از روش نمونه‌گیری در دسترس (Convenience sampling) تا دستیابی به تعداد نمونه‌ی مورد نظر وارد مطالعه شدند.

رنگ‌آمیزی سلولی: در این‌جا، بیان آنتی‌ژن هسته‌ای Ki-67 با استفاده از فلوسایتومتری در ۵۰ بیمار مبتلا به CLL که قبلاً درمان نشده بودند، ارزیابی شد.

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells) PBMC به دست آمده از افراد مبتلا به CLL که قبلاً منجمد (Cryopreserved) شده بودند، ذوب شده و از نظر شناساگرهای زیستی CD5-APC (دانمارک، Dako)، CD19-PE، CD20-PE و CD-23 PE (BD Life Sciences، ایالات متحده آمریکا)، رنگ‌آمیزی سطحی شدند. سلول‌ها متعاقباً با یک antiKi-67 FITC (دانمارک، Dako) یا یک mAb کنترل ایزوتیپ IgG1 FITC (BD Life Sciences، ایالات متحده آمریکا) گرفته شده از موش) رنگ‌آمیزی شدند. در رنگ‌آمیزی آخر، نفوذپذیری و تثبیت با استفاده از کیت‌های معرف Fix and Perm

(Caltag Laboratories، انگلستان) انجام شد. در نهایت سلول‌ها با سیستم فلوسیتومتری (FACSCalibur، Becton Dickinson، ایالات متحده آمریکا) خوانش و با نرم‌افزار FlowJo مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۴).

جمع‌آوری داده‌ها: به منظور تعیین مرحله‌ی بیماری، همه‌ی بیماران به طور دقیق مورد معاینه بالینی قرار گرفتند تا وجود بالقوه‌ی لنفادنوپاتی در معاینه‌ی بالینی مشخص شود. همچنین برای تمامی بیماران سونوگرافی کامل شکم و لگن انجام گرفته و ایشان از نظر وجود هپاتومگالی و اسپلنومگالی بر اساس نظر رادیولوژیست ارزیابی شدند. لنفادنوپاتی احتمالی در شکم نیز با استفاده از سونوگرافی بررسی گردید. علاوه بر این، رادیوگرافی قفسه‌ی سینه برای ارزیابی مدیاستن و لنفادنوپاتی احتمالی در این ناحیه انجام شد. در نهایت مرحله‌ی بیماری با استفاده از سیستم مرحله‌بندی Rai تعیین شد.

پس از تکمیل اطلاعات دموگرافیک (سن و جنس)، نمونه‌ی خون برای ارزیابی بیان آنتی‌ژن Ki-67 بر حسب درصد گرفته شد.

بیماران هر دو ماه یکبار با معاینه‌ی فیزیکی کامل و شمارش کامل خون (CBC diff) برای ارزیابی مجدد مرحله‌ی بیماری تحت نظر قرار گرفتند و تعداد مطلق لکوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها بر اساس تعداد در میلی‌لیتر خون و نیز فراوانی نسبی لنفوسیت‌ها برحسب درصد در ایشان محاسبه گردید. در پایان مطالعه، تغییر در مرحله‌ی بیماری بر اساس سیستم مرحله‌بندی Rai و زمان لازم برای دو برابر شدن تعداد لنفوسیت‌ها بررسی شد و ارتباط آن با بیان آنتی‌ژن Ki-67 اندازه‌گیری گردید.

آنالیز آماری: داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) وارد شدند. در ابتدا توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های توصیفی به صورت میانگین، انحراف معیار، اعداد مطلق و درصد ارائه شدند. برای مقایسه‌ی فراوانی‌ها بین گروه‌ها از آزمون Chi-square استفاده شد و متغیرهای پیوسته با استفاده از آزمون t مقایسه شدند و برای ارزیابی روند تغییرات متغیرهای پیوسته از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با اندازه‌گیری مکرر و آزمون همبستگی Spearman استفاده شد. منحنی ROC (Receiver operation curve) برای ارائه‌ی مقادیر آنتی‌ژن Ki-67 جهت پیش‌بینی روند پیشرفت CLL با در نظر گرفتن سیستم مرحله‌بندی Rai (بیماران پایدار در مقابل بیماران با وخامت مرحله‌بندی Rai) به عنوان استاندارد طلایی به تصویر کشیده شد. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری تعریف گردید.

یافته‌ها

مطالعه‌ی حاضر بر روی ۵۰ بیمار CLL دارای میانگین سنی ۱۰/۴۲ ± ۶۴/۱۲ سال (محدوده: ۳۸–۸۹ سال) به انجام رسید. جمعیت مورد مطالعه به صورت غالب، مذکر (۳۴ نفر: ۶۸ درصد) بودند. میانگین بیان آنتی‌ژن Ki-67 در بیماران مورد مطالعه ۱/۷۳ ± ۲/۴۸ درصد (محدوده: ۰/۱۸–۸/۶۰) به دست آمد.

اکثر بیماران در شروع بیماری، در مرحله‌ی ۱ (۴۴ درصد) از سیستم امتیازدهی Rai بودند، در حالی که شایع‌ترین مراحل در ۶ ماه بعد، ۰ (۲۸ درصد)، ۱ (۲۸ درصد) و ۲ (۲۸ درصد) بودند. علاوه بر این، ۱۴ بیمار (۲۸ درصد) هیچ تغییری در مرحله‌بندی خود در ارزیابی پیگیری ۶ ماهه نشان ندادند. جدول ۲ اطلاعات با جزئیات را نشان می‌دهد.

جدول ۲. درجه‌بندی شدت بیماری لوسمی لنفوسیتیک مزمن **بر اساس سیستم Rai در جمعیت مورد مطالعه**

درجه‌بندی Rai	ابتدای مطالعه	پس از ۶ ماه
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۰	۱۳ (۲۶)	۱۴ (۲۸)
۱	۲۲ (۴۴)	۱۴ (۲۸)
۲	۱۵ (۳۰)	۱۴ (۲۸)
۳	۰ (۰)	۳ (۶)
۴	۰ (۰)	۵ (۱۰)
مجموع	۵۰ (۱۰۰)	۵۰ (۱۰۰)

در جدول ۳ روند تغییرات در تعداد مطلق لکوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و فراوانی نسبی لنفوسیتی به نمایش گذاشته شده است. برطبق یافته‌های این جدول در حالی‌که به صورت کلی طی یک دوره‌ی ۶ ماهه تعداد مطلق لکوسیت‌ها ($P < ۰/۰۰۱$) و لنفوسیت‌ها ($P < ۰/۰۰۱$) به صورت معنی‌داری افزایش یافته است؛ فراوانی نسبی لنفوسیت‌ها تغییر معنی‌داری را در یک دوره‌ی پیگیری ۶ ماهه بروز نداده است ($P = ۰/۳۵$).

جدول ۳. مقایسه‌ی تعداد لکوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و درصد فراوانی لنفوسیتی در بیماران مورد بررسی در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری

پارامتر خونی	بدو تشخیص	۲ ماه بعد	۴ ماه بعد	۶ ماه بعد	P
لکوسیت (تعداد در میلی‌لیتر خون)	۳۷۴۵۶ ± ۳۲۳۸	۳۸۳۷۳ ± ۳۷۶۶	۴۸۱۶۲ ± ۴۳۶۲	۵۶۷۷۳ ± ۴۷۳۱	<۰/۰۰۱
لنفوسیت (تعداد در میلی‌لیتر خون)	۲۴۸۹۹ ± ۲۰۵۲۴	۲۶۵۴۵ ± ۲۶۸۷	۳۵۹۹۴ ± ۳۱۴۴	۴۵۸۹۱ ± ۳۵۳۷	<۰/۰۰۱
فراوانی نسبی لنفوسیت (درصد)	۶۷/۲۴ ± ۹/۲۳	۶۸/۲۶ ± ۸/۳۰	۶۹/۱۱ ± ۷/۸۷	۶۹/۱۸ ± ۱۰/۷۵	۰/۳۵

*Repeated measure ANOVA test

جدول ٤. مقایسه‌ی سطح آنتی‌ژن Ki-67 به درصد در بیماران بر اساس ویژگی‌های بیماری لوسمی لنفوسیتیک مزمن **در ارزیابی اولیه و ٦ ماه بعد**

متغیر		تعداد	میانگین	انحراف معیار	P
		Ki-67 antigen (%)			
جنسیت	مذکر	۳۴	۲/۸۷	۱/۹۱	*۰/۲۷۴
	مؤنث	۱۶	۲/۲۹	۱/۶۳	
درجه‌بندی Rai در ابتدای مطالعه	۰	۱۳	۲/۳۲	۰/۷۳	**۰/۷۳۷
	۱	۲۲	۲/۳۷	۱/۶۲	
	۲	۱۵	۲/۷۷	۲/۴۳	
درجه‌بندی Rai ۶ ماه بعد	۲-۰	۴۲	۲/۱۷	۱/۵۰	*۰/۰۰۳
	۴-۳	۸	۴/۰۷	۲/۰۵	
لنفادنوپاتی در ابتدای مطالعه	بله	۳۰	۲/۵۱	۱/۹۵	*۰/۸۷۶
	خیر	۲۰	۲/۴۳	۱/۳۸	
لنفادنوپاتی ۶ ماه بعد	بله	۳۰	۲/۶۸	۱/۶۲	*۰/۳۰۴
	خیر	۲۰	۲/۱۷	۱/۸۷	
ارگانومگالی در ابتدای مطالعه	بله	۱۴	۲/۸۶	۲/۵۰	*۰/۴۶۴
	خیر	۳۶	۲/۳۳	۱/۳۳	
ارگانومگالی ۶ ماه بعد	بله	۱۹	۳/۴۲	۲/۲۰	۰/۰۱۰
	خیر	۳۱	۱/۹۰	۱/۰۳	
دو برابر شدن تعداد گلبول‌های سفید	بله	۸	۵/۱۸	۲/۰۹	*۰/۰۰۳
	خیر	۴۲	۱/۹۶	۱/۰۶	
بروز همزمان دو برابر شدن تعداد گلبول‌های سفید	بله	۴	۴/۹۷	۲/۶۹	*۰/۰۰۲
و بدتر شدن امتیازبندی Rai	خیر	۴۶	۲/۲۶	۱/۴۷	

*t-test; **ANOVA

یافته‌ها نشان داد که سطح آنتی‌ژن Ki-67 در بین بیمارانی که مرحله‌ی Rai آن‌ها در طی شش ماه پیگیری به ۳ یا ٤ افزایش یافته بود، به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. علاوه بر این، ارگانومگالی (P = ۰/۰۱۰)، دو برابر شدن تعداد WBC (P = ۰/۰۰۳) و همزمانی بدتر شدن وضعیت مرحله‌بندی Rai و پدیده‌ی دو برابر شدن تعداد WBC (P = ۰/۰۰۲) به صورت معنی‌داری با سطوح آنتی‌ژن Ki-67 اندازه‌گیری شده، مرتبط بود. با این‌حال، هیچ ارتباط آماری بین سطح آنتی‌ژن Ki-67 با جنسیت (P = ۰/۲۷٤) و پیگیری بیماران از نظر بروز لنفادنوپاتی (P = ۰/۳۰٤) مشاهده نشد (جدول ٤).

میانگین تعداد گلبول‌های سفید شش ماه پس از شروع مطالعه در بیماران با سابقه‌ی دو برابر شدن تعداد گلبول‌های سفید برابر با ۱۱۹٤۵۰ ± ۸٤۲۹٦ و در گروه بدون سابقه‌ی دو برابر شدن تعداد گلبول‌های سفید برابر با ۳۳۵۷ ± ۳۷۸۱۷ به دست آمد که به صورت معنی‌داری تفاوت داشت (P < ۰/۰۰۱). میانگین تعداد لنفوسیت‌ها و درصد فراوانی لنفوسیتی در بیماران با سابقه‌ی دو برابر شدن گلبول‌های سفید به ترتیب برابر با ٦۳۰۲ ± ۸۸۰۹٦ در هر میلی‌لیتر خون و ٦/۳۱ ± ۷۳/۲۵ درصد به دست آمد، درحالی که در گروه دیگر که تعداد گلبول‌های سفید طی مدت ٦ ماه دو برابر نشده بود، این اعداد به ترتیب معادل ۳۱۲۳٤ ± ۲۳٦٤ در هر میلی‌لیتر خون و ۱۰/۹٤ ± ٦٤/۸۳ درصد محاسبه شدند. دو گروه از نظر تعداد لنفوسیت‌ها (P < ۰/۰۰۱) و درصد فراوانی آن‌ها تفاوت آماری معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱) را نشان دادند.

ارزیابی‌های همبستگی Pearson هیچ ارتباطی بین آنتی‌ژن Ki-67 با متغیرها، از جمله سن و مارکرهای خونی نشان نداد (P > ۰/۰۵) (جدول ۵).

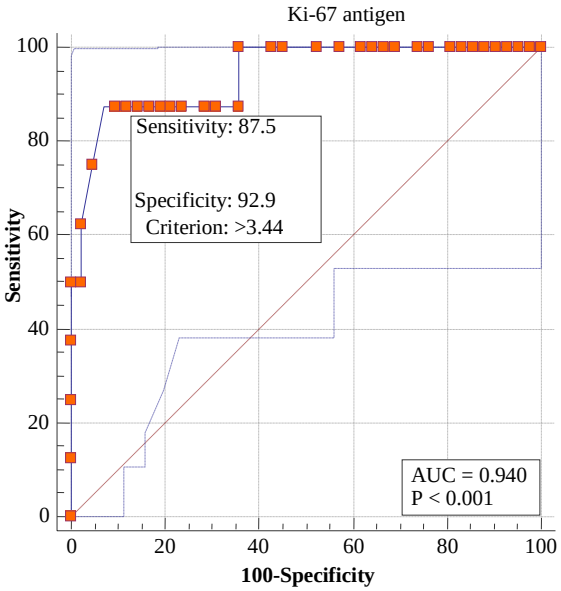
جدول ۵. ارتباط سطح آنتی‌ژن Ki-67 با سن و مارکرهای خونی

متغیرها	r	P*
سن (سال)	۰/۰۶۱	۰/۶۷۵
گلبول‌های سفید خون ($*10^3$/ml)	۰/۱۰۰	۰/۴۸۷
هموگلوبین (g/dl)	-۰/۲۴۴	۰/۰۸۸
پلاکت ($*10^6$/ml)	-۰/۰۴۰	۰/۷۸۴

*: ضریب همبستگی Spearman

طبق منحنی ROC، آنتی‌ژن Ki-67 یک پیش‌بینی‌کننده‌ی

ارزشمند برای پیشرفت مرحله‌بندی Rai در ٦ ماه پس از شروع بیماری است. همانطور که در شکل ١ نشان داده شده است، آنتی‌ژن Ki-67 در نقطه‌ی برش ٣/٤٤ درصد دارای حساسیت و ویژگی ٨٧/٥ درصد و ٩٢/٩ درصد با سطح زیر منحنی ٠/٩٤٠ (٠/٨٣٥-٠/٩٨٨ :٩٥ %CI، P < ٠/٠٠١) است.



شکل ١. نمودار ROC برای ارزیابی ارزش تشخیصی آنتی‌ژن Ki-67 برای تعیین پیش‌آگهی ٦ ماهه‌ی CLL؛ برطبق این نمودار آنتی‌ژن Ki-67 در نقطه‌ی برش ٣/٤٤ درصد دارای حساسیت ٨٧/٥ درصد و اختصاصیت ٩٢/٩ درصد با سطح زیر نمودار ٠/٩٤ و P < ٠/٠٠١ می‌باشد.

بحث

تعداد فزاینده‌ای از شواهد نشان می‌دهد که برخی از نشانگرهای زیستی می‌توانند نقش پیش‌آگهی‌کننده برای پیش‌بینی پیشرفت CLL داشته باشند و به پزشکان برای مدیریت و رویکرد درمانی بیماری کمک کنند. در این راستا، از مدت‌ها قبل، محققان نشانگرهای سلولی متنوعی را پیشنهاد کرده‌اند (١٧). بر این اساس، ما سعی کردیم آنتی‌ژن Ki-67 را ارزیابی کنیم، پروتئینی هسته‌ای که در تمام مراحل فعال چرخه‌ی سلولی (G1، S، G2 و میتوز) وجود دارد و در سلول‌های در حال استراحت (G0) بیان نمی‌شود؛ ویژگی‌ای که آن را به یک نشانگر عالی برای تعیین به اصطلاح کسر رشد یک جمعیت سلولی معین تبدیل می‌کند (١٨).

یافته‌های مطالعه‌ی ما نشان داد که بیان آنتی‌ژن Ki-67 با عوامل مرتبط با شدت CLL، از جمله مرحله‌بندی بیماری، ارگانومگالی، بروز دو برابر شدن گلبول‌های سفید و بدتر شدن مرحله‌بندی همزمان با دو برابر شدن گلبول‌های سفید مرتبط بود. همچنین در نقطه‌ی برش ٣/٤٤ درصد به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ٨٧/٥ و ٩٢/٩ درصد برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری در یک دوره‌ی ٦ ماهه بود.

از مدت‌ها قبل، سلول‌های CLL در فاز G0 چرخه‌ی سلولی سلول‌های ساکن و غیر تکثیرشونده در نظر گرفته می‌شدند. با این وجود، مطالعات اخیر متعددی نشان داده‌اند که برخی از سلول‌های CLL در گردش، تکثیرشونده هستند، یافته‌ای که با بیان بالای آنتی‌ژن Ki-67 در برخی سلول‌ها مورد تأکید قرار گرفته است (١٩).

Elgammal و همکاران سطوح بیان بالاتر قابل توجهی از آنتی‌ژن Ki-67 را در بین بیماران CLL در مقایسه با گروه شاهد سالم همسان از نظر سن و جنس نشان داد. علاوه بر این، آن‌ها یک همبستگی قوی مستقیم بین سطح بیان آنتی‌ژن Ki-67 با شدت CLL با توجه به مرحله‌بندی Rai و نشانگرهای زیستی مرتبط با پیش‌آگهی CLL مانند LDH، β2M و ZAP70 ارائه کردند (١٩). نتایج مشابهی در مطالعه‌ی دیگری توسط Ghadallah و همکاران نیز ارائه شده است (٢٠).

این یافته‌ها توسط Marcondes و همکاران نیز تأیید شد که در آن ارتباط قوی و مستقیمی را بین سطح بیان آنتی‌ژن Ki-67 با مراحل بالینی پیشرفت بیماری CLL بیان داشتند (١٢). مطالعه‌ای نیز توسط Khoudoleeva و همکاران به انجام رسید که بر این مسأله تأکید داشت که سطح بیان آنتی‌ژن Ki-67 در خون محیطی، غدد لنفاوی و مغز استخوان با شدت بیشتر بیماری CLL مرتبط است (٢١).

از یافته‌های قابل توجه دیگری که ارزش پیش‌آگهی‌دهنده‌ی آنتی‌ژن Ki-67 را بیشتر مشخص می‌کند می‌توان به یافته‌های مطالعه‌ی Elgammal و همکاران اشاره نمود که بر اساس آن، سطوح بالاتر Ki-67 با ابتلا به بیماری CLL مقاوم به درمان مرتبط بود (١٩).

مطالعات دیگری که ارزش پیش‌آگهی آنتی‌ژن Ki-67 را در CLL ارزیابی کردند، سطح آن را در بیماران مبتلا به ارگانومگالی یا لنفادنوپاتی بررسی نمودند و ارتباط قابل توجهی با علائم Constitutional، پیشرفت بالینی و پیامدهای ضعیف بیماری گزارش کردند (١٢، ١٩، ٢٢).

اگرچه ما هیچ مطالعه‌ای که نشان‌دهنده‌ی نقطه‌ی برش آنتی‌ژن Ki-67 برای پیش‌بینی احتمال پیشرفت CLL بر اساس مرحله‌بندی Rai باشد، پیدا نکردیم، تحقیقات متنوع آستانه‌هایی را بین موارد CLL در مورد پیشرفت بیماری و بقا ارائه کرده‌اند. Ciccone و همکاران بیان کردند که بیماران CLL با بیش از ٣٠ درصد بیان آنتی‌ژن Ki-67 به طور قابل توجهی مدت زمان کمتری از بقای عاری از بیماری (Disease-free survival) و بقای کلی (Overall survival) داشتند (٢٣). در مقابل، مطالعه‌ای دیگر، بیان

آنتی‌ژن Ki-67 را در ۱۰۰ بیمار CLL ارزیابی کرد و هیچ نقطه‌ی برش قابل توجهی برای بقا نداشت. با این حال، در بین بیماران با مراکز تکثیر گسترش یافته (Expanded proliferation centers)، ٦٥ درصد سلول‌ها بیان آنتی‌ژن Ki-67 داشتند، در حالی‌که در مراکز تکثیر با رشد معمول (Proliferation centers) این عدد به ٤٠ درصد کاهش یافت (٢٤).

به طور خلاصه، آنتی‌ژن Ki-67 به عنوان یک نشانگر زیستی میتوز سلولی یک عامل ارزشمند برای ارزیابی وضعیت CLL در نظر گرفته می‌شود. با این حال، دانش کمی در مورد نقطه‌ی برش آن برای تعیین پیش‌آگهی بیماری در دسترس است. بررسی‌های بیشتر در این زمینه قویاً توصیه می‌شود.

محدودیت‌ها: جمعیت نمونه‌ی کوچک این مطالعه و دوره‌ی کوتاه پیگیری از محدودیت‌های اصلی مطالعه‌ی حاضر بود. همچنین مطالعاتی با ارزیابی تأثیر جنسیت بیماران بر روند پیشرفت و بیان آنتی‌ژن‌های مختلف مرتبط با بیماری CLL توصیه می‌گردند. علاوه بر این، مطالعات جامع‌تری را می‌توان برای ارزیابی ارتباط آنتی‌ژن Ki-67با بقای عاری از بیماری، بقای کلی و رژیم‌های متنوع تجویز شده برای CLL طراحی کرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، آنتی‌ژن Ki-67 یک شناساگر زیستی پیش‌آگهی‌دهنده برای پیش‌بینی پیشرفت CLL در یک بازه‌ی زمانی ٦ ماهه است. علاوه بر این، در نقطه‌ی برش ٣/٤٤ درصد، آنتی‌ژن Ki-67 دارای حساسیت و ویژگی ٨٧/٥ و ٩٢/٩ درصد برای پیش‌بینی مرحله‌بندی Rai در فاصله‌ی زمانی ٦ ماهه بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مطالعه‌ی حاضر، نهایت تقدیر و تشکر خود را از کارمندان بخش هماتولوژی- انکولوژی بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مبذول می‌دارند. این طرح پژوهشی با شماره‌ی ٣٩٦٢٢١ و با کد اخلاق IR.MUI.REC.1396.3.221 در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به ثبت رسیده است.

References

1. Barrientos JC. Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2016; 2016(1): 128-36.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood 2008; 111(12): 5446-56.
3. Delgado J, Nadeu F, Colomer D, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia: From molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. Haematologica 2020; 105(9): 2205-17.
4. Stilgenbauer S, Furman RR, Zent CS. Management of chronic lymphocytic leukemia. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2015; 35(1): 164-75.
5. Schleiss C, Carapito R, Fornecker LM, Muller L, Nicodeme P, Tahar O, et al. A core proliferative program induced by B-Cell receptor stimulation in chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 2019; 134(Suppl 1): 3777.
6. Patten PE, Ferrer G, Chen SS, Kolitz JE, Rai KR, Allen SL, et al. A detailed analysis of parameters supporting the engraftment and growth of chronic lymphocytic leukemia cells in immune-deficient mice. Front Immunol 2021; 12: 627020.
7. Ponzoni M, Doglioni C, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. Semin Diagn Pathol 2011; 28(2): 161-6.
8. Burger JA. Treatment of chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2020; 383(5): 460-73.
9. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. J Cell Physiol 2000; 182(3): 311-22.
10. Maffei R, Fiorcari S, Vaisitti T, Martinelli S, Benatti S, Debbia G, et al. Macitentan, a double antagonist of endothelin receptors, efficiently impairs migration and microenvironmental survival signals in chronic lymphocytic leukemia. Oncotarget 2017; 8(52): 90013-27.
11. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma 2018; 127(2): 175-86.
12. Marcondes N, Fernandes F, Faulhaber G. Ki-67 expression in mature B-cell neoplasms: a flow cytometry study. Rev Assoc Med Bras 2018; 64(6): 525-9.
13. Roth CG. Educational case: Chronic lymphocytic leukemia. Acad Pathol 2018; 5: 2374289518776011.
14. Lenartova A. Chronic lymphocytic leukemia in Norway 1953-2012. [Thesis]. Oslo, Norway: University of Oslo; 2020.
15. Kratzer W, Fritz V, Mason RA, Haenle MM, Kaechele V, Group RS. Factors affecting liver size: a sonographic survey of 2080 subjects. J Ultrasound Med 2003; 22(11): 1155-61.
16. Konuş O, Ozdemir A, Akkaya A, Erbaş G, Celik H, Işik S. Normal liver, spleen, and kidney dimensions in neonates, infants, and children: evaluation with sonography. AJR Am J Roentgenol 1998; 171(6): 1693-8.
17. Nørgaard CH, Søgaard NB, Biccler JL, Pilgaard L, Eskesen MH, Kjartansdottir TH, et al. Limited value of routine follow-up visits in chronic lymphocytic leukemia managed initially by watch and wait: A

North Denmark population-based study. PloS One 2018; 13(12): e0208180.
18. Tan MF, Zhang ZH, Yu JJ, Qu JH. Expression of ki-67 in chronic lymphocytic leukemia and its clinical significance [in Chinese]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2015; 23(2): 318-21.
19. Elgammal MMA, El-Halawani NA, El-Sorady MES, El-Maghraby SM, Sallam GSM. Prognostic significance of BCL6 and KI67 in patients with chronic lymphocytic leukemia. Egypt J Haematol 2018; 43(4): 179.
20. Gadallah H, Hegab H, Elsalakawy WA, Samra MA, Farweez BA, Saad AE. Predictive value of the proliferation marker Ki-67 in patients with acute leukemia undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Egypt J Haematol 2018; 43(4): 222.
21. Khoudoleeva O, Gretsov E, Barteneva N, Vorobjev I. Proliferative index and expression of CD38, Zap-70, and CD25 in different lymphoid compartments of chronic lymphocytic leukemia patients. Pathol Lab Med 2011; 3: 7-16.
22. Qiu L, Xu J, Tang G, Wang SA, Lin P, Ok CY, et al. Mantle cell lymphoma with chronic lymphocytic leukemia-like features: a diagnostic mimic and pitfall. Hum Pathol 2022; 119: 59-68.
23. Ciccone M, Agostinelli C, Rigolin G, Piccaluga PP, Cavazzini F, Righi S, et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays. Leukemia 2012; 26(3): 499-508.
24. Giné E, Martinez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, Martinez D, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. Haematologica 2010; 95(9): 1526-33.

DOI: *10.48305/jims.v40.i693.0865*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 693, 1st Week, January 2023**

Received: 22.05.2022 Accepted: 02.10.2022 Published: 28.12.2022

Ki-67 Antigen; A Valuable Prognostic Biomarker for Chronic Lymphocytic Leukemia

Valiollah Mehrzad[1], Samaneh Madadi[3]

Original Article

Abstract

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common blood malignancies. The chief cells involved in this malignancy are in the G0 phase of cell division and have no proliferative activity; however, what determines the severity and prognosis of this disease is cell proliferation. Ki-67 antigen is a nuclear protein that is present in all cell proliferative phases except G0. The present study was aimed to investigate the prognostic value of Ki-67 antigen expression in patients with CLL and their disease behavior.

Methods: The current cross-sectional study has been conducted on 50 CLL patients in 2017. The disease severity based on Rai's staging system, lymphadenopathy, organomegaly, and complete blood count and differentiation (CBC diff) were assessed at study initiation and within six months. Besides, Ki-67 antigen level was assessed via flow-cytometry. Eventually, the prognostic value of Ki-67 antigen to determine CLL prognosis was assessed utilizing Receiver operation curve (ROC)

Findings: The study population had the mean age of 64.12 ± 10.42 years old and predominantly consisted of males (68%), and had the mean Ki-67 antigen level of 2.48 ± 1.73 (%). Rai's stage deterioration to 3 or 4, organomegaly, white blood cells (WBC) doubling and concurrent Rai's staging deterioration and WBC doubling ($P = 0.002$) were directly associated with Ki-67 antigen levels. At the cut-point of 3.44%, Ki-67 antigen had the sensitivity and specificity of 87.5% an 92.9%, with area under the curve (AUC) 0f 0.940 (95%CI: 0.835-0.988; $P < 0.001$).

Conclusion: According to this study, Ki-67 antigen is a valuable prognostic biomarker for CLL progression activity. Besides, at the cut-point of 3.44%, Ki-67 antigen had an acceptable predictive value for the progression manner of CLL disease.

Keywords: Biomarker; Ki-67 antigen; Chronic lymphocytic leukemia; Prognosis

Citation: Mehrzad V, Madadi S. **Ki-67 Antigen; A Valuable Prognostic Biomarker for Chronic Lymphocytic Leukemia.** J Isfahan Med Sch 2023; 40(693): 865-72.

1- Associate Professor of Hematology and Oncology, Department of Internal Medicine, School of Medicine AND Cancer Prevention Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Internal Medicine Specialist, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Samaneh Madadi, Internal Medicine Specialist, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: samanemadadi@yahoo.com