

بررسی رژیم دارویی فلودارابین - سیکلوفسفامید در درمان بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

کامران مشفق^۱ (M.D)، قاسم مسیبی^{۲*} (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه انکولوژی

۲- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه ایمونولوژی

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه، بررسی اثر داروی فلودارابین - سیکلوفسفامید در درمان بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن نوع B می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه که از اردیبهشت ۱۳۹۰ تا خرداد ۱۳۹۱ انجام شد، ۲۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن (میانگین سنی ۶۳ سال) وارد مطالعه شدند و تحت درمان با رژیم استاندارد دارویی فلودارابین (۲۵ میلی گرم) و سیکلوفسفامید (۲۵۰ میلی گرم) به صورت خوراکی به مدت شش ماه قرار گرفتند. تغییرات کلینیکی و درصد سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ در خون محیطی قبل از شروع درمان و ۶ ماه بعد از درمان با روش فلوسیتومتری مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فراوانی سلول‌های CD5⁺، CD5⁺/CD19⁺ و CD19⁺ در خون محیطی تمام بیماران بین ۷۰ تا ۹۰ درصد می باشد. بعد از درمان درصد سلول‌های CD2 و CD3 (مشخصه T-cells) به طور معنی داری افزایش پیدا کرد (p=۰/۰۰۰۱). هم‌چنین درصد سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ در خون محیطی بعد از درمان (۲۳±۳۵٪) نسبت به قبل از درمان (۲۶±۶۸٪) به طور معنی داری کاهش یافت (p=۰/۰۰۱). علائم کلینیکی بیمار نیز نشان از بهبودی بیمار داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی داروی فلودارابین - سیکلوفسفامید می تواند به درمان بیماران ایرانی مبتلا به B-CLL کمک کند.

واژه‌های کلیدی: سلول تی، سرطان خون، لنفوسیتی مزمن، سنجش جریان سلولی، سیکلوفسفامید

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن نوع-B (B-CLL) بیماری است که با اختلال در روند رشد و نمو لنفوسیت‌ها همراه است و درصد لنفوسیت‌های B در خون محیطی و مغز استخوان به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد [۱]. لوسمی لنفوسیتی مزمن دارای رشد بطنی بوده و معمولاً در افراد ۶۰ سال به بالا اتفاق

می‌افتد. میزان شیوع بیماری بین ۴ تا ۵ در هر ۱۰۰ هزار نفر می‌باشد. مراحل اولیه بیماری معمولاً بدون علامت است. اگر چه ظاهر سلول‌ها ممکن است طبیعی به نظر آید ولی قابلیت مبارزه با عفونت را آن‌طور که باید داشته باشند، ندارند. به تدریج با گذشت زمان تعداد لنفوسیت‌های-B در خون محیطی افزایش یافته و بزرگ شدن غدد لنفاوی، طحال و کبد،

بیماری خودایمن داشتند، از مطالعه خارج شدند. ۲۰ بیمارار مبتلا به B-CLL ۶ دوره داروی فلودارابین (۲۵ میلی‌گرم/مترمربع - سیکلوفسفامید (۲۵۰ میلی‌گرم/مترمربع) به مدت ۳ روز و فواصل ۴ هفته را دریافت نمودند [۱۰]. مقدار دارو بر اساس دوز استاندارد مصرفی می‌باشد. تعیین اثربخشی به دارو با روش فلوسایتومتری بر اساس تعداد سلول‌های CD5/CD19 کم‌تر از ۱ درصد می‌باشد [۱۱]. درصد مارکرهای لنفوسیتی قبل از شروع درمان و یک ماه پس از قطع دوره کامل درمانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه از روش فلوسیتومتری مستقیم و چند رنگ (سه رنگ) جهت بررسی مارکرهای سطحی استفاده شد. سلول‌های تک هسته‌ای به‌دست آمده از خون محیطی با غلظت یک میلیون سلول در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین تهیه شد. جهت تعیین هر یک از مارکرها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در لوله‌های مربوطه ریخته شد و مقدار مناسبی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال مربوطه (۱ تا ۵ میکرولیتر) اضافه گردید تمامی آنتی‌بادی‌ها از شرکت BD تهیه شد (جدول ۱). نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه انکوبه شد. نمونه‌ها دو بار با بافر فسفات شستشو داده شده و برای حذف گلبول‌های قرمز از بافر لیزکننده استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله توسط دستگاه فلوسیتومتری سه رنگ Becton-Dickinson (آمریکا) از نظر مارکرهای سطحی مورد بررسی قرار گرفتند.

خستگی مزمن و خون‌ریزی‌هایی که به سادگی اتفاق می‌افتند، از دیگر مشخصه‌های بیماری می‌باشد [۳،۲]. از روش‌های مختلف شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و ایمونوتراپی در درمان استفاده می‌شود. یکی از روش‌های استاندارد جهت درمان استفاده از ترکیب فلودارابین - سیکلوفسفامید می‌باشد [۵،۴]. درصد پاسخ به درمان در مطالعات مختلف متفاوت است. در برخی مطالعات ۳۰ درصد و در برخی تا ۸۰ درصد بیمارار به درمان خوب جواب داده‌اند. علت تفاوت در این مطالعات می‌تواند نژاد بیمارار نوع ترکیب دارویی و روش‌های تعیین پاسخ به درمان باشد [۷،۶،۲]. جهت اثربخشی دارودرمانی از معاینات بالینی، تست‌های آزمایشگاهی روتین و عکس‌برداری از بافت‌ها استفاده می‌شود. دقت این روش‌ها در تعیین پاسخ به درمان مناسب نیست و بیش از ۳۰ تا ۴۰ درصد بیمارار با داشتن علائم ظاهری نرمال و قطع درمان، بیماری مجدد عود می‌کنند [۸]. استفاده از فلوسایتومتری در پایان درمان می‌تواند به عنوان یک تست تعیین‌کننده MRD (Minimal Residual Disease) جهت اثربخشی دارو در نظر گرفته شود [۹]. هر چند این روش درمانی نیز در کشور ما به صورت روتین انجام می‌شود، ولی بر اساس بررسی‌های به‌عمل آمده در خصوص اثر داروی فلودارابین - سیکلوفسفامید در جامعه بیمارار B-CLL ایرانی مطالعه‌ای یافت نشد. بنابراین بر آن شدیم تا اثربخشی این دو دارو را در جمعیت مبتلا در استان مرکزی با روش فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه مشاهده‌ای - تحلیلی است که بعد از تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص و بر اساس معیارهای ۱- لنفوسیتوز خون محیطی بیش‌تر از ۴ هزار، ۲- لنفوسیتوز مغز استخوان بیش‌تر از ۳۰ درصد، ۳- فلوسایتومتری، بیمارار و آزمایشات کلینکی و پاراکلینکی، بیمارار مبتلا به B-CLL تحت درمان با داروی فلودارابین - سیکلوفسفامید قرار گرفتند. بیمارانی که قبلاً درمان دارویی دریافت کرده بودند و یا بیماری‌های دیگر لنفوپرولیفراتیو یا

جدول ۱. مشخصات آنتی‌بادی‌های مورد استفاده

آنتی‌بادی	کونژوگه	آنتی‌بادی	کونژوگه
Anti-CD2	FITC	Anti-CD19	PerCP
Anti-CD3	FITC/ PerCP	Anti-CD20	FITC
Anti-CD5	PE	Anti-CD23	PE
Anti-CD10	FITC		

از نرم‌افزار SPSS جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون T-test و جهت بررسی تغییرات مارکرها قبل و بعد از درمان از آزمون Paired sample t test استفاده شد.

نتایج

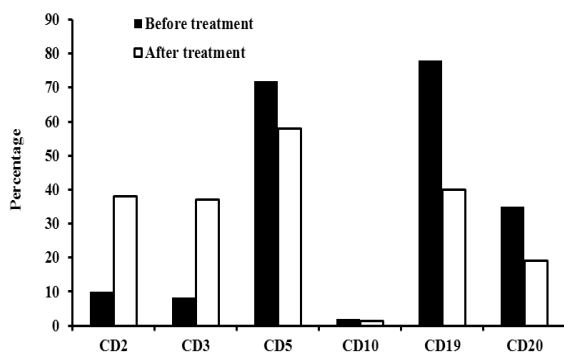
بیماران دارای درصد بالایی لنفوسیت در خون محیطی بودند و نتایج اسمیر خون محیط و مغز استخوان نشان از درصد بالای لکوسیتی بود (جدول ۲).

نتایج توصیفی بیماران نشان داد که بیش از ۶۶ درصد از بیماران مرد و حدود ۳۳ درصد زن می‌باشند. میانگین سنی بیماران 64 ± 10 سال سن بود.

جدول ۲. مشخصات دموگرافیک و کلینیک بیماران مبتلا به B-CLL

مشخصات دموگرافی/کلینیکی	حداکثر	حداقل	میانگین	انحراف معیار
سن (بر حسب سال)	۷۷	۴۲	۶۴	۸/۶
اندازه طحال (بر حسب سانتیمتر)	۲۳	۱۲	۱۳	۸
میزان پلاکت (در میکرولیتر)	۲۸۷۰۰۰	۶۴۰۰۰	۱۴۶۷۶۱	۶۳۳۷۸
تعداد گلبول سفید (در میکرولیتر)	۲۴۹۰۰۰	۱۵۴۰۰	۶۰۱۰۰	۶۰۸۴۲
درصد لنفوسیت	۹۸	۴۰	۷۵/۷	۱۴/۵
درصد هموگلوبین	۱۶	۹/۸	۱۲/۹	۱/۷
سرعت رسوب اریتروسیت (میلیمتر بر ساعت)	۳۶	۲	۱۷/۷	۱۲
لاکتات د-هیدرو ژناز (واحد بین لمل در لیتر)	۶۸۰	۱۱۶	۴۲۴	۱۵۰
میوگلوبین (میکروگرم در لیتر)	۴/۵	۲/۸	۳/۵	۰/۵

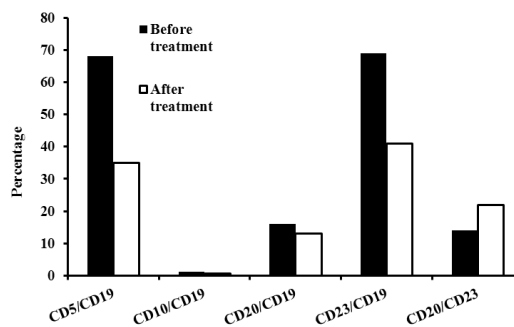
نتایج نشان داد که درصد لنفوسیت‌های واجد مارکر CD2 و CD3 بعد از درمان به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p=0/0001$)، (شکل ۱). از طرفی شش ماه پس از درمان دارویی، درصد سلول‌های دارای مارکر CD5، CD19، CD20 و CD23، به‌طور معنی‌داری در خون محیطی کاهش پیدا کردند (شکل ۱). درصد سلول‌های $CD5^+/CD19^+$ نیز از حدود ۶۸ درصد به ۳۵ درصد کاهش یافت که از نظر آماری این کاهش معنی‌دار بود ($p=0/001$) (جدول ۳ و شکل ۲). درصد سایر مارکرهای سطحی قبل و بعد از درمان تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. (شکل ۲).



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد مارکرهای سطح لنفوسیتی (تک رنگ) در خون محیطی بیماران مبتلا به B-CLL قبل و بعد از درمان

جدول ۳. مقایسه میانگین مارکرهای سطحی در بیماران مبتلا به B-CLL قبل از درمان (B) و شش ماه بعد از درمان (A)

مارکر سلولی	میانگین	انحراف معیار
CD2B	۱۰	۸/۴
CD2A	۳۷	۲۲/۴
CD3B	۸/۴	۸/۳
CD3A	۳۷	۲۰
CD5B	۷۲/۴	۲۵/۵
CD5A	۵۸/۵	۲۳
CD10B	۲	۱/۸
CD10A	۱/۳	۱/۲
CD19B	۷۷/۷	۱۸
CD19A	۳۹/۶	۲۲/۷
CD20B	۳۵/۴	۱۸
CD20A	۱۹/۳	۱۲/۶
CD23B	۵۸	۳۳
CD23A	۳۳	۲۵
CD23/CD19B	۶۹/۳	۲۵
CD23/CD19A	۴۱	۲۳
CD5/CD19B	۶۸	۲۶/۵
CD5/CD19A	۳۵/۴	۲۳
CD10/CD19B	۱/۱	۱
CD10/CD19A	۰/۶	۰/۶
CD20/CD19B	۱۷	۱۱/۵
CD20/CD19A	۱۳/۵	۱۱
CD20/CD23B	۱۴	۱۷
CD20/CD23A	۲۲	۲۰



شکل ۲. مقایسه میانگین درصد مارکرهای سطح لنفوسیتی (دو رنگ) در خون محیطی بیماران مبتلا به B-CLL قبل و بعد از درمان

بحث و نتیجه گیری

یکی از مشخصه‌های مهم در B-CLL افزایش درصد لنفوسیت‌های B بالغ در خون محیطی است. در خون محیطی حدود ۳۰ درصد از لنفوسیت‌ها از نوع B-cell می‌باشند و دارای مارکر CD19 هستند. در افراد نرمال درصد لنفوسیت‌های B که علاوه بر شاخص CD19 دارای شاخص CD5 می‌باشند کم‌تر از ۵ درصد می‌باشند و تحت عنوان سلول‌های B1 نام‌گذاری می‌شوند [۱۲]. در بیماران مبتلا به B-CLL این درصد افزایش و حتی بیش از ۹۰ درصد لنفوسیت‌های خون محیطی را شامل می‌شود [۱۳، ۱۴]. نتایج این مطالعه نشان داد که درصد سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ (B1) قبل از درمان بیش از ۷۰ درصد لنفوسیت‌ها را شامل می‌شود. درصد لنفوسیت‌ها T واجد مارکر CD3 کم‌تر از ۱۰ درصد بود، در حالی که درصد این سلول‌ها در افراد نرمال بیش از ۷۰ درصد لنفوسیتی می‌باشد. از طرفی افزایش مارکرهای بلوغ مانند CD20 و CD23 در خون این بیماران نشان از تکثیر و فعال شدن غیر متعارف این دسته از سلول‌ها در این نوع لنفوم دارد.

مطالعات کلینیکی نشان می‌دهد یکی از شاخصه‌های مهم پاسخ به درمان و بهبودی و اثربخشی دارو، کاهش تعداد سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ در خون محیطی یا مغز استخوان می‌باشد. در تعیین حداقل بقاء بیماری (Minimal Residual Disease) شمارش یا درصد سلول‌های CD5⁺CD19⁺ با روش فلوسیتومتری نقش کمک‌کننده دارد [۱۱].

بیماران بعد از یک پروتکل درمانی ۶ ماه با فلودارابین-سیکلوفسفامید مجدد یک ماه بعد از پایان درمان از نظر تغییرات مارکرهای سلولی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که به جز سه مورد، درصد سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ در خون محیطی حدود ۴۰ درصد کاهش می‌یابد و این نشان‌دهنده اثربخش بودن درمان می‌باشد. در مطالعات مختلف نیز نشان داده شده است که اثر ترکیبی این دو دارو باعث ۵ تا ۱۰ درصد بهبودی کامل و ۳۰ تا ۷۰ درصد باعث بهبودی نسبی می‌شود [۱۵-۱۷]. گزارش حاضر نیز نشان داد که در ۷۰ درصد بیماران بر اساس درصد سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ و علائم کلینیکی، تجویز این دو دارو سبب بهبودی می‌گردد. علت مغایرت اثربخشی فلودارابین-سیکلوفسفامید در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه و همچنین تفاوت در دوز داروی و طول درمان باشد.

به هر حال به دلیل حجم کم نمونه در طول مقطع زمانی، بررسی وضعیت بهبودی کامل و درصد عود مجدد ممکن نبود. با توجه به این که اثربخشی برخی داروها در جوامع مختلف متغیر می‌باشد و تا حدودی متاثر از نژاد و سایر فاکتورهای دموگرافیک می‌باشد، لازم است مطالعات با حجم نمونه بیش‌تر و مدت زمان طولانی‌تری در بخش‌های مختلف کشور انجام گیرد.

نتایج نشان داد که تجویز فلودارابین-سیکلوفسفامید با کاهش معنی‌دار سلول‌های CD5⁺/CD19⁺ به عنوان یک شاخص بهبودی می‌تواند در درمان بیماران ایرانی مبتلا به B-CLL موثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 776-785.

[10] Kater AP, Tonino SH. Standards for the treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia: a case-based study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2010; 10: S34-41.

[11] Majolino I, Ladetto M, Locasciulli A, Drandi D, Benedetti F, Gallamini A, et al. High-risk fludarabine-pretreated B-cell chronic lymphocytic leukemia's high response rate following sequential DHAP and alemtuzumab administration though in absence of molecular remission. *Med Oncol* 2006; 23: 359-368.

[12] Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2105-2111.

[13] Garcia-Munoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol* 2012; 91: 981-996.

[14] Vroblova V, Smolej L, Vrbacky F, Jankovicova K, Hrudkova M, Maly J, Krejsek J. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta medica (Hradec Kralove)* 2009; 52: 3-8.

[15] Montillo M, Tedeschi A, Petrizzi VB, Ricci F, Crugnola M, Spriano M, et al. An open-label, pilot study of fludarabine, cyclophosphamide, and alemtuzumab in relapsed/refractory patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 4079-4085.

[16] Kowal M, Dmoszynska A, Lewandowski K, Hellmann A, Wegrzyn J, Skotnicki AB, et al. Efficacy and safety of fludarabine and cyclophosphamide combined therapy in patients with refractory/recurrent B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)-Polish multicentre study. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1159-1165.

[17] Liso V, Molica S, Capalbo S, Pogliani E, Battista C, Brocchia G, et al. Response to fludarabine in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients previously treated with chlorambucil as up-front therapy and a CHOP-like regimen as second line therapy. *Haematologica* 2001; 86: 1165-1171.

[1] Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122: 3432-3438.

[2] Hayat A, McGuckin S, Conneally E, Brown PV, McCann SR, Lawler M, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and rituximab: an effective chemoimmunotherapy combination with high remission rates for chronic lymphocytic leukaemia. *Ir J Med Sci* 2009; 178: 441-446.

[3] Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381: 1943-1955.

[4] Smolej L. Modern concepts in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* 2009; 14: 249-254.

[5] O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki AB, Koziner B, et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5208-5212.

[6] O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1414-1420.

[7] Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4079-4088.

[8] Tadmor T, Polliack A. Optimal management of older patients with chronic lymphocytic leukemia: some facts and principles guiding therapeutic choices. *Blood Rev* 2012; 26: 15-23.

[9] Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Shanafelt TD, Hoyer JD, Remstein ED, Hanson CA. Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma

Therapeutic effects of fludarabine-cyclophosphamide combined therapy in Iranian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia

Kamran Moshfeghi (M.D)¹, Ghasem Mosayebi (Ph.D)^{*2}

1 – Dept. of oncology, School of Medicine Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran .

2 – Dept. of Immunology, School of Medicine & Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 9 Feb 2014; Accepted: 6 Jul 2014)

Introduction: The aim of this study was to investigate the efficacy of fludarabine-cyclophosphamide combination in treatment of Iranian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL).

Materials and Methods: Between April 2011 and July 2013, 20 patients with B-CLL (median age 63 years) received a regimen that consisted of fludarabine 25 mg/m² and cyclophosphamide 250 mg/m², days 1-3, orally, every 4 weeks, for a maximum of 6 courses. Clinical appearances and percentage of CD5+/CD19+ cells as minimal residual disease detected by flow cytometry before and 6 months after treatment.

Results: The frequency of CD5+, CD5+/CD19+ and CD19+-cells were significantly high (70-90 %) in the peripheral blood of all the patients, before treatment. The percentage of CD2 and CD3+-cells were significantly increased after treatment ($p < 0.0001$). There were significantly different in the percentage of CD5+/CD19+-cells before (68 ± 26) and after (35 ± 23) treatment ($p = 0.001$). Also, the clinical features were modulated after treatment.

Conclusion: The results showed that combination of fludarabine and cyclophosphamide could be helpful in treatment of B-CLL in Iranian patients.

Keywords: Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell, Cyclophosphamide, Flow cytometry

* Corresponding author. Fax: +98 86 34173526; Tel: +98 86 34173502
gmosayebi@yahoo.com

How to cite this article:

Moshfeghi K, Mosayebi G. Therapeutic effects of fludarabine-cyclophosphamide combined therapy in Iranian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. koomesh. 2015; 16 (2) :202-206

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-1134-2&slc_lang=fa&sid=1