خون
فصلنامه پژوهشی
بهار ۸۴ دوره ۲ شماره ۳

# بررسی ارزش تشخیصی CD64 و CD14 در افتراق زیرگروه منوئید لوسمی‌های حاد میلوئید

مهین نیکوگفتار[۱]، دکتر مهناز آقایی‌پور[۲]، اعظم طباطبائیان[۳]، دکتر شهرام وائلی[۴]،
دکتر وحید فلاح‌آزاد[۵]، دکترمهتاب مقصودلو[۶]، فرزانه آتش‌رزم[۷]

## چکیده

### سابقه و هدف

علیرغم این که اساس تشخیص و درمان لوسمی‌های حاد میلوئید هنوز هم تقسیم‌بندی FAB می‌باشد، تحقیقات نشان داده که این گروه‌بندی دارای محدودیت‌هایی است و به همین جهت اخیراً ایمونوفنوتایپینگ به‌وسیله فلوسایتومتری به‌طور گسترده‌ای در این تشخیص به‌کار برده می‌شود. طبق بررسی‌های انجام شده در گروه لوسمی‌های حاد میلوئید، ایمونوفنوتایپ با بررسی حضور یا عدم حضور CD14 کمک برجسته‌ای در افتراق زیرگروه میلوئید (M0, M1, M2, M3, M6, M7) از زیرگروه منوئید (M4, M5) داشته است. با این‌حال در چندین مطالعه نشان داده شده که CD14 دارای حساسیت بالایی نمی‌باشد. باتوجه به این که CD64 (FCγRI) نیز رسپتور اختصاصی سلول‌های ردهٔ منوئید بوده و در شمار نادری از سلول‌های میلوئید بروز می‌یابد، در این مطالعه به بررسی ارزش تشخیصی CD14 و CD64 در افتراق زیرگروه منوئید از غیر منوئید پرداختیم.

### مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده تشخیصی بود. جمعیت مورد بررسی شامل ۲۱۶ مورد لوسمی حاد میلوئید ثابت شده به‌وسیلهٔ معیارهای FAB و ایمونوفنوتایپینگ بودند که به روش sequential از مراجعین به بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران درطی ۲۹ ماه انتخاب شدند. نمونه‌های بیماران با آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر علیه گیرنده‌های CD64 و CD14 که با فلورسانس Phyco Erythrin در اتصال بودند رنگ و با دستگاه فلوسایتومتری Epics-xl بررسی شدند. اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تحت آزمون کای‌دو (Chi-square) تجزیه و تحلیل آماری شدند.

### یافته‌ها

نتایج حاصله حکایت از اختصاصیت ۸۸٪ و حساسیت ۶۷٪ برای CD64 و اختصاصیت ۹۶٪ و حساسیت ۳۱٪ برای CD14 با ضریب اطمینان ۹۵٪ در تشخیص زیرگروه منوئید از غیر منوئید دارد.

### نتیجه گیری

حساسیت کم و اختصاصیت بالای CD14 و از طرف دیگر حساسیت و اختصاصیت بالای CD64 با درجات متفاوتی در منابع نیز گزارش شده است. با توجه به این‌که حساسیت CD64 به مراتب بالاتر از CD14 است، لذا استفاده از CD64 برای تشخیص زیرگروه منوئید لوسمی‌های حاد میلوئید الزامی بوده و پیشنهاد می‌شود که در تمامی پروتکل‌های ایمونوفنوتایپ به‌عنوان مارکر حساس و اختصاصی این رده منظور گردد.

**کلمات کلیدی:** لوسمی‌های حاد، FAB، ایمونوفنوتایپینگ، فلوسایتومتری، لوسمی حاد میلوئید، لوسمی حاد منوئید، CD14 ، CD64

---

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد هماتولوژی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲- متخصص آسیب شناسی بالینی و تشریحی- استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- کارشناس بیولوژی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- دکترای علوم آزمایشگاهی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵- متخصص آسیب شناسی تشریحی و بالینی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶- متخصص پزشکی اجتماعی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷- کارشناس علوم آزمایشگاهی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-01-23 ]

## مقدمه

سرطان‌های خون دسته‌ای از بیماری‌های بدخیم مغزاستخوان هستند که سلول‌های خون‌ساز را درگیر کرده وازنظر عوامل مسبب، بیماری‌زایی، پیش‌آگهی ونحوهٔ پاسخ به درمان متفاوتند. این تفاوت سبب شده که درسال۱۹۷۶ گروه FAB ( French ،American ،British group ) طبقه‌بندی خاصی را براساس مورفولوژی سلول‌های بدخیم ارایه دهند که این گروه‌بندی امروزه نیز استاندارد طلایی به‌شمار می‌رود، هر چند که محدودیت‌هایی را به همراه دارد (۱). به‌کارگیری روش های ایمونوفنوتایپینگ و سیتوژنتیک و سیتوشیمی سعی در دفع این محدودیت‌ها داشته است (۲). از زمان معرفی آنتی‌بادی‌های منوکلونال، به‌کارگیری ایمونوفنوتایپینگ با فلوسایتومتری از طریق بررسی گیرنده‌های سطحی و داخل سلولی، کمک بسیاری به این گروه‌بندی کرده است. این روش مخصوصاً در افتراق دو گروه لنفوئید از میلوئید و هم‌چنین شناسایی زیرگروه منوئید، ارزش بسیاری دارد (۳). سال‌هاست که CD14 به‌عنوان مارکر اختصاصی ردهٔ منوئید معرفی شده است و در تمامی پروتکل‌های ایمونوفنوتایپ قرار دارد (۴). لیکن مطالعات اخیر نشان داده که CD14 از حساسیت بالایی برخوردار نبوده و در موارد متعدد قادر به تشخیص این زیرگروه نمی‌باشد (۵). لذا بررسی بر روی سایر گیرنده‌های اختصاصی منوسیت‌ها آغاز شده و CD64 به‌عنوان گیرنده اختصاصی سلول‌های منوئید مطرح شده است. این گیرنده نقش عمده‌ای در فاگوسیتوز و سمیت سلولی وابسته به آنتی‌بادی در ماکروفاژها و منوسیت‌ها دارد (۶). از آنجا که در مسیر تکامل، منوسیت‌ها در مراحل ابتدایی‌تر ظاهر می‌شوند شاید در مواردی که CD14 هنوز بروز نیافته، مثبت شدن CD64 کمک کننده‌تر باشد.

به همین جهت این تحقیق به منظور تعیین ارزش تشخیصی CD14 و CD64 و اهمیت انجام آن در تشخیص لوسمی‌های حاد منوئید صورت گرفت و بر روی نمونه‌هایی‌که براساس معیارهای طبقه‌بندیFAB جزو گروه میلوئیددسته‌بندی شدند، حضورگیرنده‌های سطحی CD64، CD14 بررسی ومیزان حساسیت واختصاصیت این گیرنده‌ها دردوگروه منوئید وغیرمنوئید لوسمی‌های حاد میلوئید محاسبه شدند.

## مواد و روش‌ها

مطالعهٔ انجام شده تشخیصی بوده و تعداد ۲۳۰ بیمار مبتلا به لوسمی حاد که در طول ۲۹ ماه (از ۸۰/۸/۱ لغایت ۸۲/۱۲/۲۹) به بخش فلوسایتومتری انتقال خون مراجعه نمودند و تشخیص AML برای آن‌ها داده شده بود، به روش sequential انتخاب و ۱۴ مورد به دلیل نقص اطلاعات از مطالعه حذف شدند.

روش انجام کار به این صورت بود که حداقل ۱ میلی‌لیتر از نمونهٔ آسپیراسیون مغزاستخوان بیماران در ضد انعقاد EDTA دریافت و از هر یک ۳ اسمیر تهیه و رنگ‌آمیزی رایت و سیتوشیمی، شامل پراکسیداز (Merck cat No:16303) و α نفتل استات استراز (Merck cat No:16301) انجام شد. نحوهٔ رنگ‌آمیزی سیتوشیمی برطبق بروشور کیت‌های ذکر شده بود و رنگ‌آمیزی رایت نیز براساس SOP مربوط به رنگ‌آمیزی رایت موجود در بخش فلوسایتومتری انجام شد. سپس اسمیرهای رنگ شده از نظر مورفولوژی برطبق معیارهای FAB بررسی و همراه با ایمونوفنوتایپینگ زیر گروه‌بندی مجدد شدند. از آنتی‌بادی منوکلونال CD14 (DAKO, cat No:FR700) و CD64 (DAKO, cat No:R7219) از منبع موش که برعلیه سلول‌های انسانی تهیه شده بود، جهت نشان‌دار کردن سلول‌ها استفاده شد، این آنتی‌بادی‌ها در اتصال با فلورسانس PE بودند.

جهت کنترل منفی از ایزوتایپ کنترل آنتی‌بادی‌های مذکور IgG2a، IgG1 که بر علیه سلول‌های خرگوش تولید شده و با همان رنگ فلورسانس در اتصال بودند استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه آسپیراسیون مغزاستخوان بیمار را با ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های ذکر شده و آنتی‌بادی کنترل منفی در لوله‌های جداگانه به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد مجاور کردیم. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱٪ اسید فرمیک (جهت لیز گلبول‌های قرمز) و ۲۵۰ میکرولیتر از

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-01-23 ]

بافر فسفات (جهت خنثی شدن اثر طولانی مدت محلول لیزکننده اسیدفرمیک) و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱٪ پارافرمالدئید (جهت ثابت شدن سلول‌ها) را به لوله‌ها افزودیم. در این مرحله نمونه‌ها جهت آنالیز با فلوسایتومتری آماده شدند. نمونه‌های مذکور با دستگاه سه رنگی Epics-xl با لیزرآرگون و تحت نرم‌افزار cytometry آنالیز شدند، دستگاه به‌طور هفتگی با محلول استاندارد Immuno check کنترل کیفی شد.

در هر مورد ۵۰۰ سلول آنالیز و واکنش‌های غیراختصاصی با آنالیز نمونه‌های کنترل منفی از حیطهٔ شمارش حذف شد و زمانی یک نمونه از جهت عرضهٔ گیرنده‌های CD14 یا CD64 مثبت تلقی می‌شد که حداقل ۲۰٪ از سلول‌ها، گیرندهٔ مورد نظر را بروز داده باشند(۷). نتایج حاصله تحت نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند و اختصاصیت و حساسیت گیرنده‌های مورد نظر براساس فرمول استاندارد محاسبه شد. روش آماری مورداستفاده نیزدرآنالیز اطلاعات حاصله آزمون کای‌دو بود.

## یافته‌ها

در بررسی ۲۱۶ مورد AML، ۱۱۰ مورد (۵۰/۹٪) در گروه غیرمنوئید و ۱۰۶ مورد (۴۹/۱٪) در گروه منوئید قرار گرفتند که از این گروه ۵۳ مورد M4 (۵۰٪)، ۳ مورد M4e(۳٪)، ۳۸ مورد M5a (۳۶٪) و ۱۲ مورد M5b (۱۱٪) بودند. در مرحله بعدی به بررسی واکنش CD64 در دو گروه منوئید و غیرمنوئید پرداختیم که طبق جدول شماره۱، ۶۷٪ (۷۱ از ۱۰۶ مورد) از جمعیت منوئید از نظر CD64 مثبت وتنها ۱۰/۹٪ (۱۲ از ۱۱۰ مورد) از جمعیت غیرمنوئید CD64 را عرضه کردند که به این ترتیب این مارکر ازحساسیت۶۷٪ واختصاصیت۸۸٪ برخورداراست. اختلاف بین این دو گروه از نظر توزیع CD64 بر اساس آزمون کای‌دو معنی‌دار است (p<۰/۰۵)، هم‌چنین PPV=٪۸۵/۵ و NPV=٪۷۳/۸ در مورد CD64 حاصل شده است.

هم‌چنین ازنظر توزیع CD14 طبق جدول شمارهٔ ۲ در گروه منوئید، ۳۱/۱٪ (۳۳ از ۱۰۶ مورد) CD14 مثبت، و ۶۸/۹٪ (۷۳ از ۱۰۶ مورد) CD14 منفی بودند و در گروه غیرمنوئید تنها ۴/۵٪ (۵ از ۱۰ مورد) مثبت بودند.

**جدول۱ : توزیع بیماران بر اساس واکنش CD64 و گروه‌بندی FAB در مراجعین به بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران درطول ۲۹ ماه که تشخیص AML برای آن‌ها داده شده است.**

| گروه‌بندی FAB / CD64 | غیرمنوئید مثبت | | منوئید منفی | | جمع | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| مثبت | (۳۳) ۷۱ | | (۶) ۱۲ | | (۳۹) ۸۳ | |
| منفی | (۱۶) ۳۵ | | (۴۵) ۹۸ | | (۶۱) ۱۳۳ | |
| جمع | (۴۹) ۱۰۶ | | (۵۱) ۱۱۰ | | (۱۰۰) ۲۱۶ | |

**جدول ۲ : توزیع بیماران بر اساس واکنش CD14 و گروه‌بندی FAB در مراجعین به بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران در طول ۲۹ ماه که تشخیص AML برای آن‌ها داده شده است.**

| گروه‌بندی FAB / CD14 | غیرمنوئید مثبت | | منوئید منفی | | جمع | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| مثبت | (۱۵) ۳۳ | | (۲) ۵ | | (۱۷) ۳۸ | |
| منفی | (۳۴) ۷۳ | | (۴۹) ۱۰۵ | | (۸۳) ۱۷۸ | |
| جمع | (۴۹) ۱۰۶ | | (۵۱) ۱۱۰ | | (۱۰۰) ۲۱۶ | |

به این ترتیب توزیع CD14 در دو گروه منوئید و غیرمنوئید دارای اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). این مارکر از حساسیت ۳۱/۱ ٪ و اختصاصیت ۹۶٪ برخوردار بوده و دارای ۸۶/۸ ٪=PPV و ۶٪=NPV می‌باشد.

## بحث

نتایج حاصله در جامعه تحت بررسی نشان داد که CD14 ازحساسیت۳۱/۱٪ و اختصاصیت ۹۶٪ در تشخیص زیرگروه منوئید برخوردار است، درحالی‌که در یک بررسی که توسط آلیسا و همکارانش صورت گرفته، حساسیت ۷۳٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ برای CD14 مطرح شده است (۷). هم‌چنین در سایر مطالعات، حساسیت از ۳۶٪ تا ۸۰٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ نیز گزارش شده است (۵ ،۴). اختصاصیت بالای این گیرنده درتمامی مطالعات تأیید شده اما در مورد حساسیت CD14 نتایج کمی متفاوت بوده و بیشتر مطالعات حکایت از حساسیت کم این گیرنده برای شناسایی ردهٔ منوئید می‌کند. در مورد CD64 نیز حساسیت ۶۷٪ و اختصاصیت ۸۸٪ به‌دست آمده است و آلیسا و



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-01-23 ]

همکارانش نیز حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۸۸٪ را گزارش کرده‌اند (۷). سایر مطالعات نیز حساسیت و اختصاصیت بالایی را برای CD64 مطرح نموده‌اند (۸). CD64 یک گیرندهٔ اولیه و اختصاصی در مسیر بلوغ سلول‌های میلوئید است، به‌طوری‌که در یک مطالعه دیده شده کلنی‌های خون‌ساز که CD34 مثبت و CD64 مثبت هستند، به سوی تولید سلول‌های میلومنوسیتی متمایل شده و تنها ۲٪ از آن‌ها سلول‌های اریتروئید را تولید کرده‌اند (۸). از طرف دیگر اعتقاد بر این است که CD14 گیرنده‌ای در سلول‌های منوئید است که بیشتر در مراحل تکامل یافته‌تر این رده بروز می‌کند (۷). این مسأله روشنگر این مطلب است که چون سلول‌های بدخیم منوئید، غالباً سلول‌های نارس و اولیه هستند، میزان بروز CD64 در آن‌ها بیشتر از میزان بروز CD14 می‌باشد و به همین دلیل این گیرنده از حساسیت بالاتری نسبت به CD14 در تشخیص این زیر گروه برخوردار است. اختلاف مختصر بین نتایج حاصله می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد افراد جامعه تحت بررسی باشد، به‌طوری که در مطالعات قبل ۲۲ مورد، ۴۰ مورد و حداکثر ۸۵ مورد بررسی شده‌اند (۸، ۷).

هم‌چنین در مطالعه‌ای گزارش شده که CD64 در موارد نادری در AML-M3 و هم‌چنین نوتروفیل‌های فعال شده و نوتروفیل‌های دیس پلاستیک هایپو گرانوله هم بروز می‌کند (۹). چون این جمعیت‌ها ممکن است از نظر پراکندگی در نمودار سایز در برابر گرانولیتی (FS/SS) با بلاست‌های منوئید تداخل کنند لذا درجه اختصاصیت این گیرنده را کاهش می‌دهند، چرا که انتخاب جمعیت سلولی بدخیم برای آنالیز توسط کاربر دستگاه صورت می‌گیرد و ممکن است در مواردی که نمونه‌ها از جمعیت همگن بدخیم برخوردار نباشند در انتخاب سلول‌ها اختلافاتی به‌وجود آید که نتایج را تا حدی تغییر دهد. هم‌چنین در موارد ذکر شده تعداد ملکول CD64 که در سطح سایر سلول‌ها بروز می‌کند، بسیار کمتر (نسبت ۱/۳) از تعدادی است که در سطح بلاست‌های منوئید ظاهر می‌شود و شمار زیادی از این سلول‌ها به ناچار از دایره شمارش مثبت حذف خواهند شد (۸).

ازطرف دیگر به‌دلیل این که بررسی مورفولوژی سلول‌ها برای گروه‌بندی FAB یک متغیر کیفی است ممکن است اختلاف نظر مختصری در انجام گروه‌بندی نمونه‌ها وجود داشته باشد.

در پایان با این که CD14 اختصاصیت بالاتری نسبت به CD64 دارد ولی به دلیل حساسیت به‌مراتب بالاتر CD64، انجام آن برای تشخیص زیرگروه منوئید لوسمی‌های حاد میلوئید الزامی بوده و باید در تمامی پروتکل‌های ایمونوفنوتایپ به‌عنوان گیرندهٔ حساس این رده منظور شود. هم‌چنین با توجه به این که نمونه‌های آسپیراسیون بیماران مورد نظر گاهی شامل جمعیت‌های طبیعی نیز می‌باشد، توصیه می‌شود که در مطالعات بعدی با توجه به عرضهٔ کم CD45 در سطح بلاست‌ها، از این خاصیت در انتخاب سلول‌های نارس، جهت تعیین دقیق فنوتیپ آن‌ها استفاده گردد (۷).

## تشکر و قدردانی

هزینه‌های این تحقیق توسط مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تأمین گردیده است.

از همکاران محترم واحد پژوهش به‌خصوص سرکار خانم دکتر وفائیان و از همکاری بی‌دریغ سرکار خانم بابا حسینی، تکنسین بخش فلوسایتومتری تشکر و قدردانی می‌گردد.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-01-23 ]

## منابع

1- Bain B J. Acute leukemia in leukemia diagnosis. 2nd ed, Malden, MA: Blackwell Science, 1999.
2- Tra week ST. Immunophenotypic analysis of acute Leukemia. AM J Clin Path 1993; 99: 504-512.
3- Hassan SK. The immunophenotype of adult AML. AM J Clin path 1988; 109(2): 211-220.
4- Scott CS, Richords SJ, Master PS, *et al*. Flow cytometric analysis of membrane CDllc and CD14 expression in acute myeloid Leukemia. Eur J Hematol 1990; 44:24-29.
5- Scott CS, Stark AN, Limbert HJ, *et al*. Diagnostic and prognostic factors in acute monocytic leukemia. Br J Hematology 1988; 69:247-252.
6- Grage-Criebenow E, Zawatzky R, Koahlert H, *et al*. Identification of a novel dendritic cell-like subest of CD64 + / CD16 + blood monocytes. Eur J Immunol 2001; 31(1) : 48-56.
7- Alyssa M, Kra sinskas, MD, Mariuz A, *et al*. The usefulness of CD64 and other monocyte associated antigens in the sub-classification of Acute Myeloid Leukemias. Hematopathology 1998; 110: 797-805.
8- Olweus J, Land-Johansen F, w.m.m. Terstappen L, *et al*. CD64 is a Granulo-monocytic lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood 1915; 85(9): 2402-2413.
9- Guyre PM, Von Dem Borne AEG. CD64 cluster workshop report. 1995 : 874-875.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-01-23 ]

# The diagnostic value of CD14 and CD64 expression in differential diagnosis of monoid subtype of acute myeloid leukemia

***Nikougoftar M.[1] , Aghaeipour M.[1], Tabatabaian A.[1], Vaeli Sh.[1], Fallah Azad V.[1], Maghsudlu M.[1], Atashrazm F.[1]***

*[1]Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*

## Abstract

***Background and Objectives***

Although the French-American-British (FAB) Classification system is the basis for the diagnosis and treatment of AML, it has its own limitations. During recent years immunophenotyping by flow cytometry is widely used for the identification of AML'S subtypes. Immunophenotyping has been especially helpful in discrimination of AML with monocytic differentiation (M4-M5) from nonmonocytic subtypes (M0- M1- M2- M3- M6- M7). However several studies have indicated that CD14 mostly is negative when applied to leukemias with monocyte differentiation.

***Materials and Methods***

Some studies have shown that CD64 (FCγRI) is an early and specific myelo-monoid marker. In this study we evaluated CD14 and CD64 antibodies to identify cells of monocytic lineage in 216 cases of AML who were referred to IBTO flow cytometry laboratory. These monoclonal antibodies prepared by DAKO company and were conjugated with Phyco Erythrin. The samples were analysed by Epics-x1 Flow cytometer. The markers were considered positive if 20% or more of the cells expressed it. The Chi-square test was also used in SPSS software.

***Results***

Results revealed that CD64 was highty specific (88%) and sensitive (67%) and CD14 was highty specific (96%) but not sensitive (31%) with >95% confidence rate. These results are compatible with other studies.

***Conclusions***

Finally because of high sensitivity of CD64, it should be considered in all of immunophenotyping protocols as a sensitive and specific marker for monoid cells.

***Key words:*** Acute leukemia, FAB, Immunophenotyping, Flow cytometry, Acute myeloid leukemia, Acute monocytic leukemia, CD14, CD64.

*Correspondence:* Nikougoftar M., M.S. IBTO-Research Center
Tel.: (+9821) 8601501-20; Fax : (+9821) 8601555
E-mail: *mnikoo2004@hotmail.com*

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-01-23 ]