

# Kliničko laboratorijska obilježja akutne mijeloične leukemije u djece

---

**Kolenda, Sanda**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:020006>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sanda Kolenda**

**Kliničko-laboratorijska obilježja akutne  
mijeloične leukemije u djece**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2015.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za dječju hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr sc. Ljubice Rajić te je predan na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

## **Popis kratica**

AML – akutna mijeloična leukemija

ATRA – trans-retinoična kiselina

FAB – French-American-British (radna skupina za citološku analizu akutnih leukemija)

inv – inverzija

KKS - kompletna krvna slika

KMS – krvotvorna matična stanica

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

t – translokacija

TKMS – transplantacija krvotvornih matičnih stanica

WHO-klasifikacija – klasifikacija prema World Health Organization

HLA sustav – (engl. *Human Leukocyte Antigen*) antigeni tkivne podudarnosti

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. Sažetak                                       |    |
| 2. Summary                                       |    |
| 3. Uvod .....                                    | 1  |
| 3.1. Akutna mijeloična leukemija.....            | 1  |
| 3.1.1. Definicija.....                           | 1  |
| 3.1.2. Epidemiologija.....                       | 1  |
| 3.1.3. Etiopatogeneza.....                       | 1  |
| 3.1.4. Klasifikacija.....                        | 2  |
| 3.1.5. Klinička slika.....                       | 5  |
| 3.1.6. Rizične skupine.....                      | 5  |
| 3.1.7. Laboratorijska dijagnostika.....          | 5  |
| 3.1.7.1. Citomorfologija .....                   | 6  |
| 3.1.7. 2. Imunofenotipizacija.....               | 6  |
| 3.1.7.3. Citogenetika.....                       | 7  |
| 3.1.7. 4. Molekularno-genetičke pretrage.....    | 8  |
| 3.1.8. Terapija akutne mijeloične leukemije..... | 8  |
| 4. Cilj rada.....                                | 9  |
| 5. Bolesnici i metode.....                       | 9  |
| 6. Rezultati.....                                | 10 |
| 7. Rasprava.....                                 | 35 |
| 8. Zaključak.....                                | 37 |
| 9. Literatura.....                               | 38 |
| 10. Životopis.....                               | 39 |
| 11. Zahvale.....                                 | 40 |

## 1. SAŽETAK

### **Kliničko-laboratorijska obilježja akutne mijeloične leukemije u djece**

Sanda Kolenda

Akutna mijeloična leukemija (AML) ubraja se u zloćudne novotvorine krvotvornog sustava i čini oko 20% svih dječjih leukemija. Riječ je o bolesti u kojoj dolazi do maligne alteracije krvotvorne stanice mijeloičnog reda krvotvornog sustava. Različiti čimbenici utječu na prezentaciju, tijek i ishod akutne mijeloične leukemije bolesti pa stoga ne možemo govoriti o jedinstvenoj bolesti. Naime, pojedini oblici AML karakteriziraju se različitim citogenetskim, imunofenotipskim i molekularno-genetičkim značajkama o kojima će biti riječ u ovom radu.

Retrospektivnom analizom medicinske dokumentacije iz bolničkih arhiva i bolničkog informacijskog sustava analizirane su značajke akutne mijeloične leukemije od sveukupno 55 djece oboljele od AML u razdoblju između siječnja 2005. i siječnja 2015. godine. Bolesnici u ovom radu bili su liječeni u Klinici za pedijatriju KBC Zagreb, Klinici za dječje bolesti Zagreb, Klinici za pedijatriju KBC Split te u Klinici za pedijatriju KBC Rijeka. Analizirani su sljedeći laboratorijski nalazi: kompletna krvna slika (KKS), citološki i citokemijski nalaz punkcije koštane srži, kao i nalazi citogenetike, imunofenotipizacije i molekularno-genetičke analize stanica koštane srži bolesnika s AML. U kliničkoj slici analiziran je nalaz organomegalije i limfadenopatije pri postavljanju dijagnoze. U radu se dodatno analizira ishod liječenja djece oboljele od akutne mijeloične leukemije nakon kemoterapije te djece liječene alogeničnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (KMS).

**Ključne riječi:** djeca, akutna mijeloična leukemija, citomorfologija, citogenetika, imunofenotipizacija, molekularna-genetika, ishod liječenje

## 2. SUMMARY

### **Clinical and laboratory features of acute myeloid leukemia in children**

Sanda Kolenda

Acute myeloid leukemia is one of the malignant neoplasms of the hematopoietic system. It accounts for approximately 20% of all childhood leukemia. During the hematopoietic process, the myeloid cell alters malignantly causing the disease. Different factors can affect the course of the disease, so we cannot speak of a unique disease course for all myeloid leukemias, mainly because of their cytogenetical, immunophenotypic and molecular differences, which will be dealt with **i**n this study.

Retrospectively, we analyzed medical data from medical archives to find characteristics of AML in total of 55 patients, in the period between Jan 2005 and Jan 2015. Patients were diagnosed and treated at the ~~Clinic~~ of Pediatric Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, School of Medicine and University Hospital Center Zagreb, Clinic of Pediatric Hematology and Oncology, Department of Pediatric Hospital Center Split and the ~~Clinic~~ of Pediatric Hematology and Oncology, Department of Pediatrics Hospital Center Rijeka. We analyzed the cytogenetics, immunophenotyping and citology, leukocyte, thrombocyte and hemoglobin count, organomegaly and lymphadenopathy presence at the time of the diagnosis. We took in consideration the age and the sex of the patients, FAB subtype, hematopoietic stem cell transplantation and final outcome of the treatment.

Key words: children, acute myeloid leukemia, cytomorphology, cytogenetics, immunophenotyping, molecular genetics, treatment outcomes

### **3. UVOD**

#### **3.1. Akutna mijeloična leukemija**

##### **3.1.1. Definicija**

Akutne leukemije predstavljaju skupinu zloćudnih hematoloških bolesti koje karakterizira nekontrolirano bujanje maligno promijenjenih i nepotpuno diferenciranih leukocita. S obzirom na stanično podrijetlo, akutne leukemije se dijele na limfoblastične i mijeloične. Razlikujemo još i akutne leukemije nejasnog podrijetla u koju spadaju mješovite akutne leukemije (engl. *mixed phenotype acute leukemia*) i nediferencirane akutne leukemije. Naziv akutna mijeloična leukemija podrazumijeva vrlo heterogenu skupinu bolesti kojima je zajedničko obilježje proliferacija malignog klona podrijetlom od mijeloične loze koštane srži. One se međusobno razlikuju prema citomorfološkim, citokemijskim, imunofenotipskim, citogenetskim i molekularno-genetičkim obilježjima. Klonskom ekspanzijom malignog klona potiskuju se normalni hematopoetski procesi u koštanoj srži s posljedičnom pancitopenijom.

##### **3.1.2. Epidemiologija**

Akutne leukemije su najčešći zloćudni tumori dječje dobi, a akutne mijeloične leukemije čine 20% ukupnog broja dječjih leukemija. (Rajić Lj, 2009.). Od leukemije godišnje oboli prosječno 30 djece na 100 000 djece u dobi do 14 godina (Mardešić, 2003.), a bolest je nešto češća u dječaka nego u djevojčica.

##### **3.1.3. Etiopatogeneza**

Etiologija akutne mijeloične leukemije još uvijek je nerazjašnjena, iako se povećani rizik za nastanak AML povezuje s različitim virusima, kemijskim tvarima, zračenjem, kao i nasljednim stečenim bolestima. Postoji niz nasljednih bolesti u kojima je pokazana povećana sklonost za razvoj leukemije, kao npr. Downov sindrom, Fanconijeva anemija, Kostmannov sindrom, Bloomov sindrom i Diamond-Blackfanova anemija. Sekundarna akutna mijeloična leukemija može se razviti iz mijelodisplastičnih i mijeloproliferativnih sindroma te nakon izloženosti različitim kemoterapeuticima. Lijekovi koji se povezuju s nastankom sekundarne akutne mijeloične leukemije su ciklofosamid, etopozid, klorambucil, melfalan i ifosfamid. Rizik od leukemije se povećava ako se uz citostatike primjenjuje i radioterapija, pa je u bolesnika s



Hodgkinovom bolesti rizik od nastanka akutne leukemiju oko 30 puta veći od očekivanog ako se nakon ozračenja provede i citostatska terapija (Labar, 2008.).

Maligna alteracija u AML povezuje se s poremećajem ravnoteže gena koji kontroliraju proliferaciju stanica i programiranu smrt stanice, posebice protoonkogeni i onkogeni. Zbog različitih genomskih promjena leukemijske stanice pokazuju poremećaj sazrijevanja, pa one zaostaju u diferencijaciji na razini nezrelih stanica, tzv. blasta (uključujući i promijelocite i promonocite). Klonsku populaciju leukemijskih stanica karakterizira izuzetna sposobnost proliferacije, preživljavanja i samoobnavljanja, a često pokazuju i progresiju, tj. s vremenom se zbog nestabilnog genoma razviju dodatne citogenetske i molekularne promjene, kao i leukemijski subklonovi.

#### **3.1.4. Klasifikacija**

Postoje dvije temeljne klasifikacije akutnih leukemija pa tako i akutne mijeloične leukemije. Starija je FAB (French-American-British) klasifikacija koja je stvorena 70.-tih godina prošlog stoljeća i još uvijek je u uporabi u kliničkoj praksi. Ona se temelji na citomorfološkim značajkama leukemijskih stanica (Tablica 1) (Labar B, 2008).

WHO-klasifikacija (prema engl. World Health Organization) izdala je 2008. svoju klasifikaciju koja se temelji na morfološkim, imunofenotipskim, citogenetičkim i molekularnim obilježjima leukemijskih stanica, a koja imaju prognostički značaj (Tablica 2). To se posebice odnosi na citogenetičke promjene za koje je pokazano da imaju izrazito jak prognostički/prediktivni značaj za tijek i ishod bolesti. Četvrto po redu izdanje WHO-klasifikacije inkorporira nove spoznaje koje su proizašle iz znanstvenih i kliničkih studija od zadnje revizije iz 2001. godine.

Nakon postavljene sumnje na hemoblastozu, konačna dijagnoza akutne mijeloične leukemije se postavlja na temelju citomorfološke, citokemijske, imunofenotipske, citogenetičke i molekularno-genetičke analize punktata koštane srži, kao i citomorfološkom i citokemijskom analizom razmaza periferne krvi.

Tablica 1. FAB-klasifikacija akutnih mijeloičnih leukemija (prema Labar B, 2008.)

| Oznaka | Naziv                                 | Osobitost  |
|--------|---------------------------------------|--|
| AML-M0 | AML minimalno diferencirana           | Leukemijski blasti bez obilježja mijeloidne loze   |
| AML-M1 | AML bez sazrijevanja                  | Slabo diferencirani blasti   |
| AML-M2 | AML sa sazrijevanjem                  | Sazrijevanje do promijelocita, rijetko zreliji oblici  |
| AML-M3 | Akutna promijelocitna leukemija (APL) | Stanice nalik na promijelocite   |
| AML-M4 | AML, mijelomonocitna                  | Nalik na nezrele stanice granulocitne i monocitne loze   |
| AML-M5 | AML, monocitna (AmoL)                 | Stanice nalik na monoblaste (nezreliji oblik M5a) ili promonocite i monocite (zreliji oblik M5b) |
| AML-M6 | AML, eritroidna                       | >30% eritroblasta u koštanoj srži  |
| AML-M7 | AML, megakarioblastna                 | Morfološki se ne razlikuje od mijeloblasta (stoga je potrebno dokazati biljeg CD42b)             |

Tablica 2. WHO-klasifikacija akutne mijeloične leukemije\*

---

**1.AML with certain genetic abnormalities**

---

- AML with a translocation between chromosomes 8 and 21
  - AML with a translocation or inversion in chromosome 16
  - AML with a translocation between chromosomes 9 and 11
  - APL (M3) with a translocation between chromosomes 15 and 17
  - AML with a translocation between chromosomes 6 and 9
  - AML with a translocation or inversion in chromosome 3
  - AML (megakaryoblastic) with a translocation between chromosomes 1 and 22
- 

**2.AML with myelodysplasia-related changes**

---

**3.AML related to previous chemotherapy or radiation**

---

**4.AML not otherwise specified** (This includes cases of AML that don't fall into one of the above groups, and is similar to the FAB classification)

- AML with minimal differentiation (M0)
- AML without maturation (M1)
- AML with maturation (M2)
- Acute myelomonocytic leukemia (M4)
- Acute monocytic leukemia (M5)
- Acute erythroid leukemia (M6)
- Acute megakaryoblastic leukemia (M7)
- Acute basophilic leukemia
- Acute panmyelosis with fibrosis

**5.Myeloid sarcoma (also known as granulocytic sarcoma or chloroma)**

---

**6.Myeloid proliferations related to Down syndrome**

---

**7.Undifferentiated and biphenotypic acute leukemias** (leukemias that have both lymphocytic and myeloid features). These are also known as *mixed phenotype* or *mixed lineage* leukemias. In children, these leukemias are generally treated like ALL and usually respond to treatment like ALL.

---

\* preuzeto sa <http://www.cancer.org/cancer/leukemiaainchildren/detailedguide/childhood-leukemia-how-classified>

### **3.1.5. Klinička slika**

Klinička prezentacija AML posljedica je infiltracije koštane srži i ostalih organa leukemijskim stanicama. Predilekcijska mjesta infiltracije, pored same koštane srži, su jetra (hepatomegalija), slezena (splenomegalija) i limfni čvorovi (limfadenopatija). Proliferacijom u koštanoj srži maligni klon suprimira rast i razvoj normalne hematopoeze pa se simptomi pojavljuju posljedično manjku i slabosti funkcije određenih staničnih loza. Zbog potiranja eritrocitopoeze pojavljuje se anemija, dijete je blijedo, tahikardno, dispnoično, slabo i bez apetita. Zbog manjka trombocita dijete je podložnije krvarenjima pa se stvaraju hematomi, dolazi do razvoja epistakse i petehija, a u djevojčica i produženih menstrualnih krvarenja. Zbog leukopenije infekcije su učestalije i teže uz odgovarajuće simptome određenih lokalizacija ili generaliziranih infekcija uz razvitak vrućice. Ekspanzijom malignog klona pojavljuju se i migrirajući bolovi u kostima i zglobovima zbog čega se djeca u početku liječenja znaju voditi pod pogrešnom radnom dijagnozom juvenilnog artritisa, pogotovo ako u krvnoj slici nema izrazite leukocitoze. U AML se također razvijaju i metaboličke komplikacije, kao što su acidoza, promjene elektrolita, dehidracija, hiperuricemija i urična nefropatija (Labar, Interna), a tokom davanja citostatske terapije treba uvijek misliti i na toksične učinke same terapije.

### **3.1.6. Rizične skupine**

Prema prognostičkim faktorima prije početka liječenja, djeca s akutnom leukemijom svrstavaju se u određenu skupinu rizika za tijek i ishod bolesti. Razlikujemo skupinu standardnog rizika i skupinu visokog rizika. Na osnovi stratifikacije u rizične skupine određuje se intenzitet i trajanje liječenja. Prognostički kriteriji za AML uključuju citomorfologiju i udio blasta u koštanoj srži 15. dana liječenja. U djece s akutnom mijeloičnom leukemijom petogodišnje preživljenje bez znakova bolesti postiže se u 54% djece, s time da preživljenje u skupini standardnog rizika iznosi >67%, a u skupini visokog rizika 47% (Rajić Lj, 2001.)

### **3.1.7. Laboratorijska dijagnostika akutne mijeloične leukemije**

Nakon postavljanja sumnje na hemoblastozu, konačna dijagnoza akutne mijeloične leukemije postavlja se na temelju krvne slike te specijalnih pretraga koštane srži koje uključuju citomorfologiju i citokemiju, protočnocitometrijsku imunofenotipizaciju, citogenetsku analizu (uključujući i FISH) te molekularno-genetičku analizu (mutacije i preuredbe gena).

U krvnoj slici najčešće se nalazi trombocitopenija i anemija, dok broj leukocita može biti normalan, povećan ili smanjen. U oko 20% djece s akutnom mijeloičnom leukemijom nalazi se i povećan broj bazofilnih granulocita (Rajić Lj, 2009.)

Kompletna laboratorijska analiza punktata koštane srži prije davanje bilo kakve terapije je ključan čimbenik za točnu klasifikaciju AML prema podrijetlu i stupnju diferencijacije stanica. Važno je napomenuti da je zbir svih laboratorijskih nalaza ključan za postavljanje konačne dijagnoze, a time i za izbor optimalne terapije i procjenu prognoze bolesti. Prema tome, pravilno izvedena laboratorijska dijagnostika je preduvjet za pravilno razvrstavanje bolesnika u određene rizične skupine, a samim time i preduvjet optimalne terapije.

### **3.1.7.1. Citomorfologija i citokemija**

Temelj dijagnoze leukemije čini citomorfologija stanica koštane srži i/ili periferne krvi s određivanjem postotka blasta brojanjem 200 stanica s jezgrom u razmazu periferne krvi ili 500 stanica s jezgrom u koštanoj srži obojenoj prema metodi May-Grunwald-Giemsa (MGG). Prema WHO-klasifikaciji, nalaz minimalno 20% blasta označuje akutnu leukemiju. Izuzetak čine bolesnici čiji blasti pokazuju specifične citogenetske abnormalnosti -  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13q22)$ ,  $t(16;16)(p13;q22)$  i  $t(15;17)(q22;q12)$  - pa se neovisno o broju blasta može postaviti dijagnoza AML. Međutim, ulogu u odluci provođenja terapije ne igra samo granica od 20% blasta, nego se odluka temelji i na kliničkoj slici i svim ostalim informacijama i pokazateljima bolesti skupljenim tijekom obrade. Citomorfološke razlike između pojedinih oblika AML posljedica su stadija razvoja u kojem se nalazi leukemijski klon i proliferacijsko-diferencijacijske osobitosti zloćudnog klona (Tablica 1). Citokemijske analize pomažu u određivanju loze stanica zloćudnog klona budući da određena bojanja upućuju na određene podtipove leukemijskih stanica. Standardne citokemijske analize pri postavljanju dijagnoze akutne mijeloične leukemije uključuju reakciju na mijeloperoksidazu (MPO), Sudan black B (SBB) i nespecifičnu esterazu (alfa-naftil butirir ili alfa-naftil acetat esterazu, NSE) u kombinaciji s natrijevim fluoridom (NaF).

### **3.1.7.2. Imunofenotipizacija**

Imunofenotipizacija stanica krvotvornog tkiva je standardizirana laboratorijska pretraga koja se danas izvodi protočnim citometrom. Temelji se na otkrivanju specifičnih staničnih biljega iz skupine HLDA (engl. *human leukocyte differentiation antigens*) s pomoću monoklonalnih protutijela. Biljezi stanične membrane i citoplazme su svrstani u jedinstveni sustav razlikovnih skupina – CD (engl. *clusters of differentiation*), a ovisno o razvojnem stadiju i aktivnosti leukemijskog klonu ti se biljezi pojavljuju ili nestaju sa stanica. Dakle, HLDA mogu biti specifični za staničnu lozu, stupanj diferencijacije stanica ili pak odražavaju posebna biološka svojstva stanica kao što su aktivacija ili proliferacija. Nalaz imunofenotipizacije pomaže u razlikovanju akutne limfoblastične leukemije (ALL) od AML i mješovitih oblika akutnih leukemija, a u slučaju AML pomaže u razlikovanju AML-M0, AML-M1, AML-M2 i rijetkih oblika leukemije dendritičnih stanica. Suvremena imunofenotipizacija uporabom protočnih citometara s 3 ili više lasera metoda je izbora za određivanje loze stanica kao i za detekciju aberantnih antigenskih profila koji mogu biti korisni za kasnije praćenje rezidualne bolesti tijekom liječenja (Vardiman et al, 2008.). Pored toga, imunofenotipizacija krvotvornih stanica je bitna za usmjeravanje daljnjih pretraga i utvrđivanje povezanosti s rekurentnim citogenetskim i molekularnim aberacijama (Batinić D, Dubravčić K, 2013.)

### **3.1.7.3. Citogenetika**

Citogenetska analiza daje važnu informaciju o prisutnosti kromosomskih aberacija u leukemijskom klonu. Promjene koje zahvaćaju kromosome se analiziraju konvencionalnom citogenetikom i fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH). Velik udio (ali ne sve!) AML karakteriziraju različite promjene kromosoma koje mogu biti numeričke i strukturne, a u bolesnika se često nalaze kompleksne kromosomske promjene zloćudnog klonu koje obuhvaćaju i numeričke i strukturne anomalije. Stanice jednog klonu ne moraju biti citogenetski homogene, već se tijekom razvoja bolesti mogu pojaviti dodatne promjene i razvoj supklonova.. Najčešće citogenetske promjene su translokacije, delecije i inverzije. Informacija koju nam pruža citogenetika predstavlja jedan od bitnijih prognostičkih faktora bolesti. Primjerice, nalaz translokacije t(15;17) povezuje se s APL i povoljnim ishodom, dok nalaz monosomije 7 u krvotvornim stanicama predstavlja loš prognostički znak (Manola KN i sur., 2013.).

#### **3.1.7. 4. Molekularno-genetičke pretrage**

Molekularno-genetičke pretrage lančanom reakcijom polimeraze (PCR) danas služe za otkrivanje mutacija, amplifikacija i delecije gena, kao i otkrivanje fuzijskih gena nastalih translokacijom kromosoma. U AML postoji visoka učestalost pozitivnih rezultata molekularne analize fuzijskih prijepisa AML1/ETO, CBF $\beta$ /MYH11 i PML/RAR $\alpha$  uz negativne citogenetske nalaze za t(8;21, inv(16)/t(16;16) i t(15;17). Djelomična duplikacija gena MLL pojavljuje se u 90% AML s trisomijom 11 i u 10% bez citogenetskih promjena (Zadro, 2008.).

#### **3.1.8. Terapija akutne mijeloične leukemije**

Terapijom AML-a nastoji se u što kraćem vremenu uništiti što više leukemijskih stanica, a istovremeno, koliko je to najviše moguće, umanjiti neželjena djelovanja same terapije. U liječenju se primjenjuje kemoterapija, radioterapija, imunoterapija, kao i tzv. ciljane („targeted“) terapija lijekovima koji ciljaju određenu molekularnu promjenu koja se vezuje za tumorski rast. Zbog nedostatne hematopoeze potrebna je i obilna potporna terapija koncentratima eritrocita i trombocita te antibiotska terapija. Liječenje se vrši prema protokolima liječenja u kojima su sadržane doze određenih lijekova, vrijeme i način primjene i potporne mjere liječenja. Protokoli sadrže uvodnu terapiju kojom se postiže remisija bolesti, te terapiju u remisiji. Uvodna terapija, tzv. faza indukcije sastoji se od primjene citozin-arabinozida (Ara-C, standardnim ili visokim dozama), antraciklina s etopozidom ili bez njega, osim u AML-M3 koja se najprije liječi trans-retinoičnom kiselinom (ATRA). Tijekom induksijske terapije provodi se i profilaksa središnjeg živčanog sustava intratekalnom primjenom lijekova i/ili kranijalnim zračenjem. Remisija je stanje kad se laboratorijskom dijagnostikom više ne može dokazati bolest, odnosno kada je broj granulocita  $>0,5 \times 10^9/L$ , broj trombocita  $>75 \times 10^9/L$ , udio blasta u koštanoj srži  $<5\%$ , te negativni markeri praćenja). Nakon indukcije obično se primjenjuje još jedan ciklus intenzivne kemoterapije, tzv. konsolidacija, a zatim transplantacija alogernih ili autolognih matičnih stanica sa ili bez imunoterapije (Labar, 2008). Terapijom održavanja se nastoji spriječiti relaps bolesti, koji se liječe ponavljanjem intenzivne kemoterapije. Kako bi procijenili učinkovitost terapije akutne leukemije koristimo citogenetičke i molekularne metode za određivanje minimalnu ostatnu bolest (minimal residual disease, MRD) u onih bolesnika u kojih je utvrđen specifični marker pri postavljanju dijagnoze.

## **4.Cilj rada**

Cilj rada bio je utvrditi ukupan broj djece u dobi od 1 mj do 18 godina liječene zbog akutne mijeloične leukemije na dječjim hematološkim odjelima u Hrvatskoj u razdoblju od siječnja 2005. do prosinca 2014., potom analizirati citološke, citogenetske, imunofenotipizacijske i molekularno genetičke karakteristike AML u te djece pri postavljanju dijagnoze, te kliničku prezentaciju bolesti ( organomegaliju, limfadenopatiju) i konačno ishod liječenja.

## **5.Ispitanici i metode**

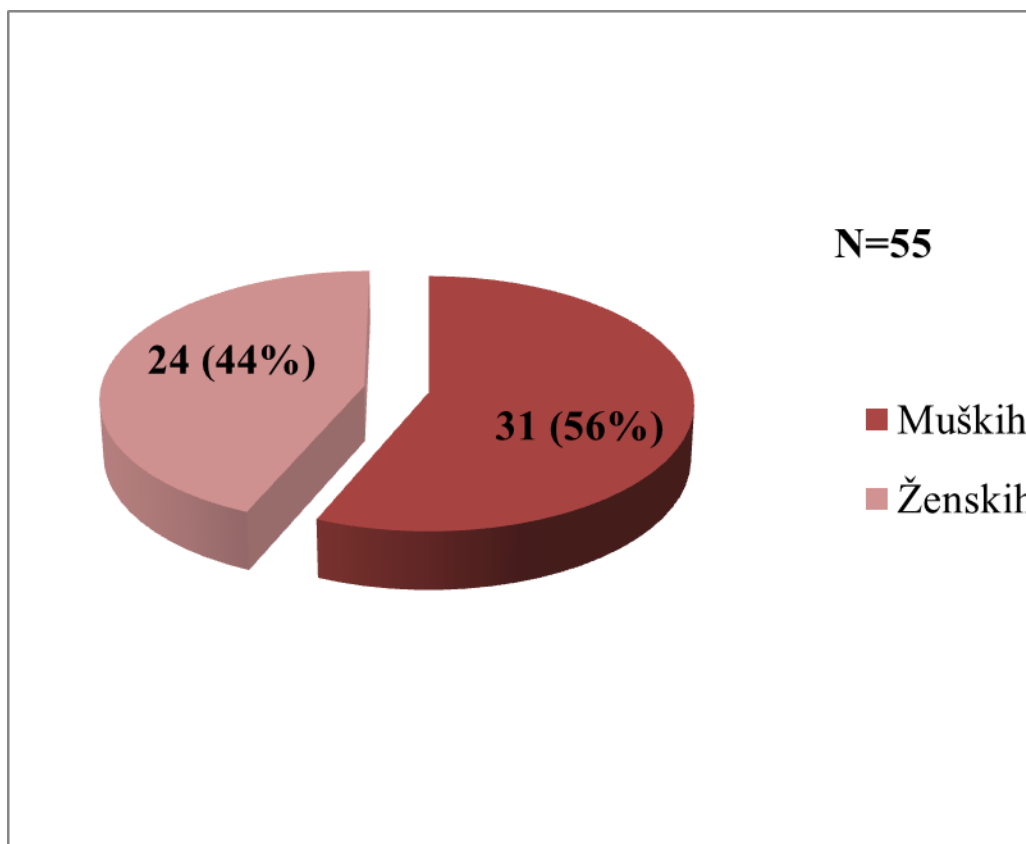
Podatke o bolesnicima smo dobili retrospektivnom analizom medicinske dokumentacije u bolničkim arhivama i informacijskim sustavima. Uključena su djeca u dobi od 1 mj do 18 godina oboljela i liječena zbog akutne mijeloične leukemije u razdoblju od siječnja 2005.- prosinca 2014. Djeca su liječena u Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC Zagreb, u Zavodu za hematologiju Klinike za pedijatriju KBC Rijeka, u Zavodu za hematologiju Klinike za pedijatriju KBC Split te u Klinici za dječje bolesti Klaićeva Zagreb.



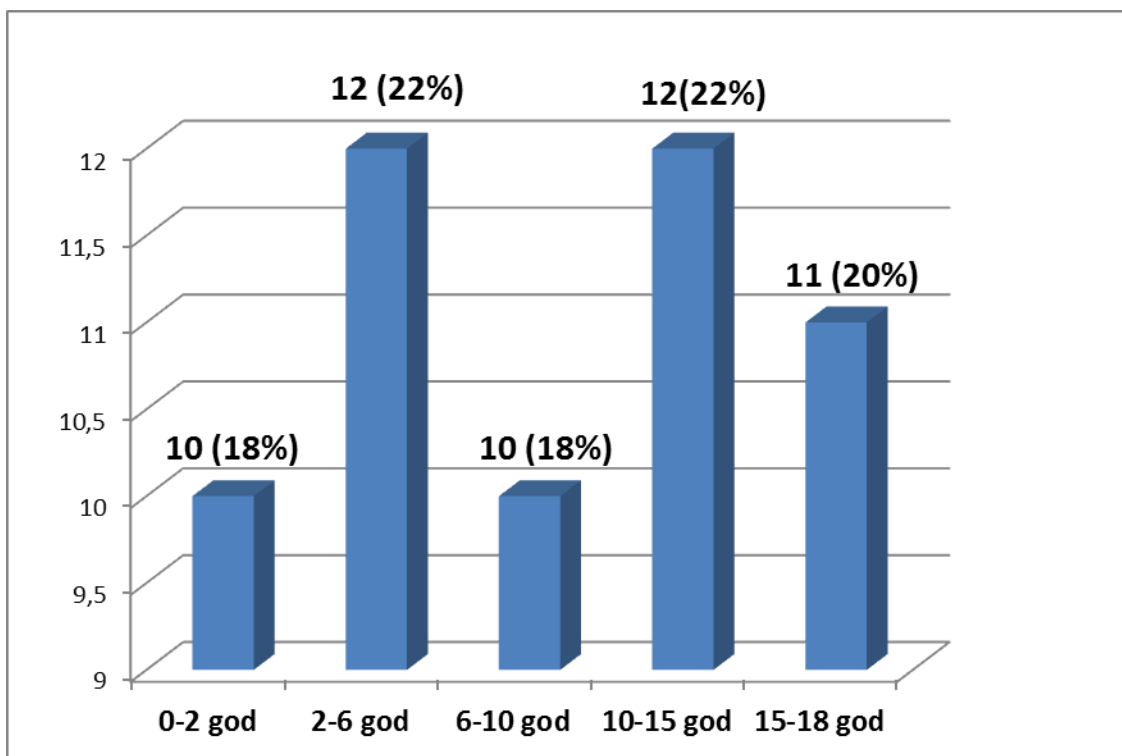
## 6.Rezultati

U razdoblju od siječnja 2005. do prosinca 2015. je u Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC Zagreb, u Zavodu za hematologiju Klinike za pedijatriju KBC Rijeka, u Zavodu za hematologiju Klinike za pedijatriju KBC Split te u Klinici za dječje bolesti, *Klaićeva* Zagreb dijagnosticirano i liječeno ukupno 55 djece oboljele od akutne mijeloične leukemije. Od tog broja 31(56%) je bilo muških, 24 (44%) ženskih bolesnika Prosječna dob pri dijagnozi je bila 8 godina. Dobna i spola raspodjela je prikazana u tablicama 3 i 4.

*Tablica 3. Spolna raspodjela djece oboljele od AML 2005.-2015*

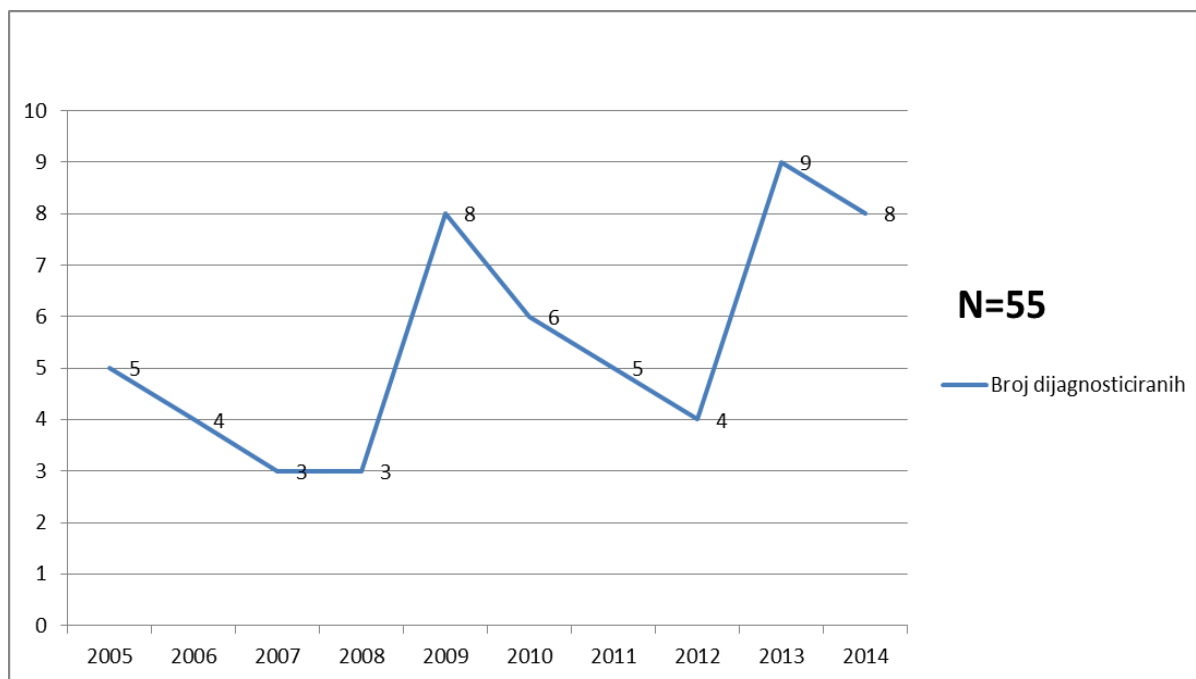


Tablica 4 Dobna raspodjela djece oboljele od AML



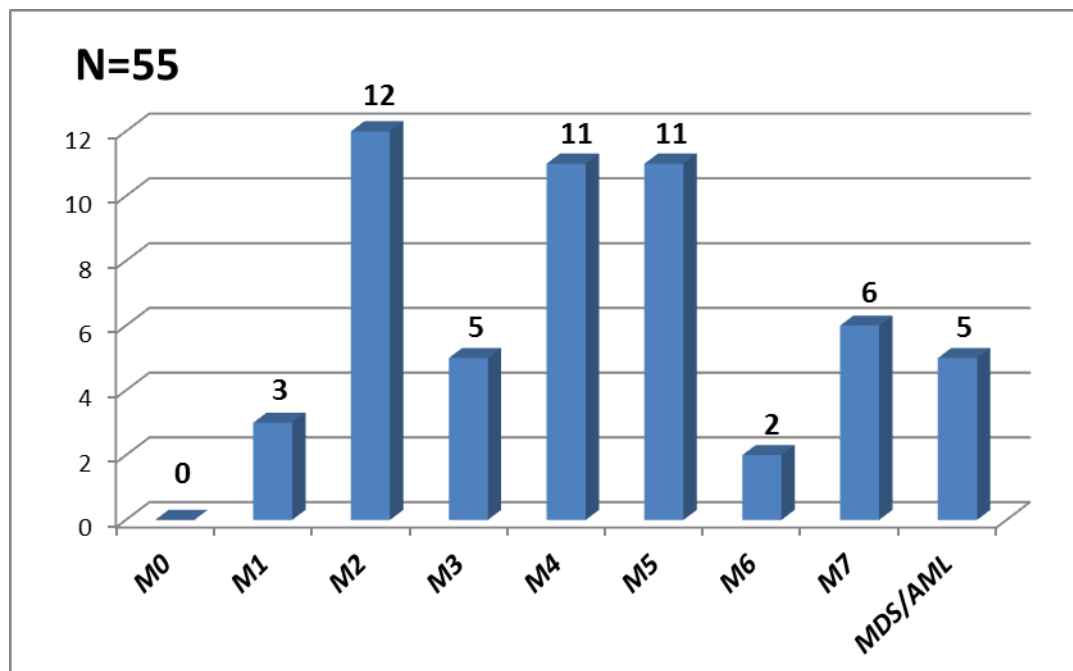
Zastupljenost oboljelih po dobnim skupinama je bila podjednaka. Najmanje oboljelih je bilo u skupinama 0-2 god (10/55) i 6-10 god (10/55), a najviše u skupinama 2-6 god (12/55) i 10-15 god (12/55).

Tablica 5. Godišnje incidencije djece oboljele od AML



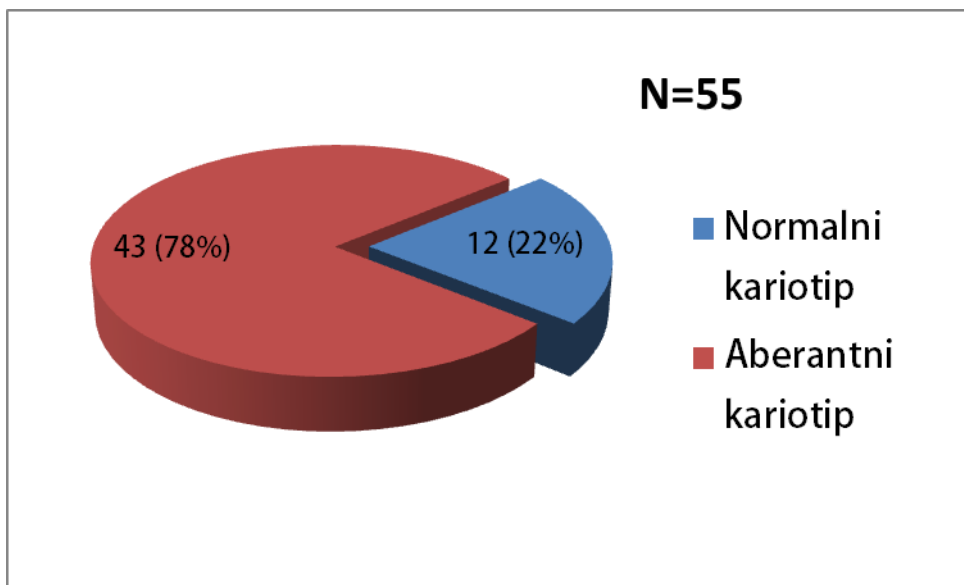
Godišnja incidencija oboljelih se kretala između 3 i 9 i prikazana je na tablici 5. Najmanje oboljelih je zabilježeno u 2007. i 2008. (3), a najviše 2013. godine (9).

Tablica 6. Udio pojedinih podtipova AML



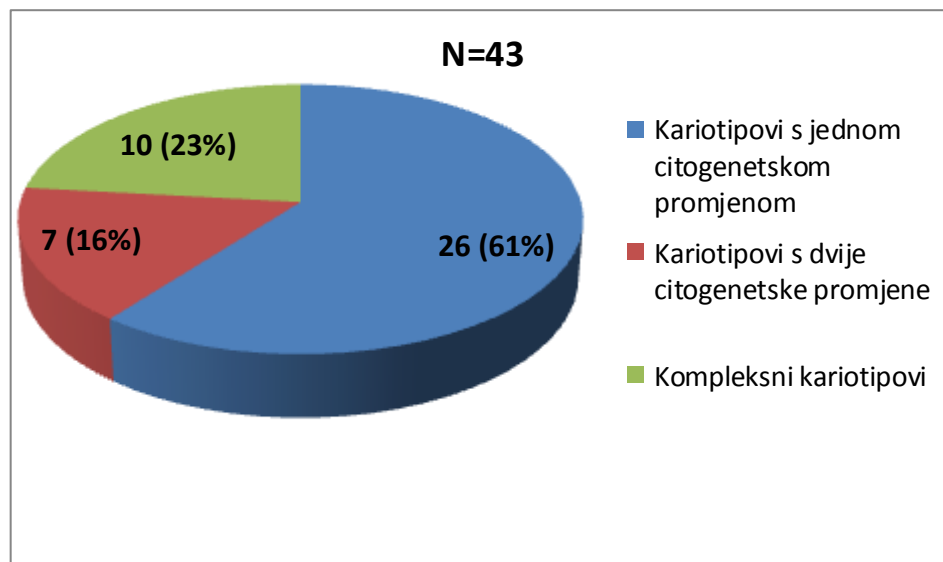
Udio pojedinih FAB podtipova je prikazuje Tablica 6. Najviše su zastupljeni podtipovi M2, M4 i M5, dok su M0, M1 i M6 najmanje zastupljeni. Kod 5 bolesnika imali smo AML sa znakovima mijelodisplazije. Od 55 oboljelih, imali smo 2 sekundarne AML (1 nakon liječenja Ewingovog sarkoma i 1 nakon terapije Wilmsovog tumora).

Tablica 7. Raspodjela normalnih i aberantnih kariotipa



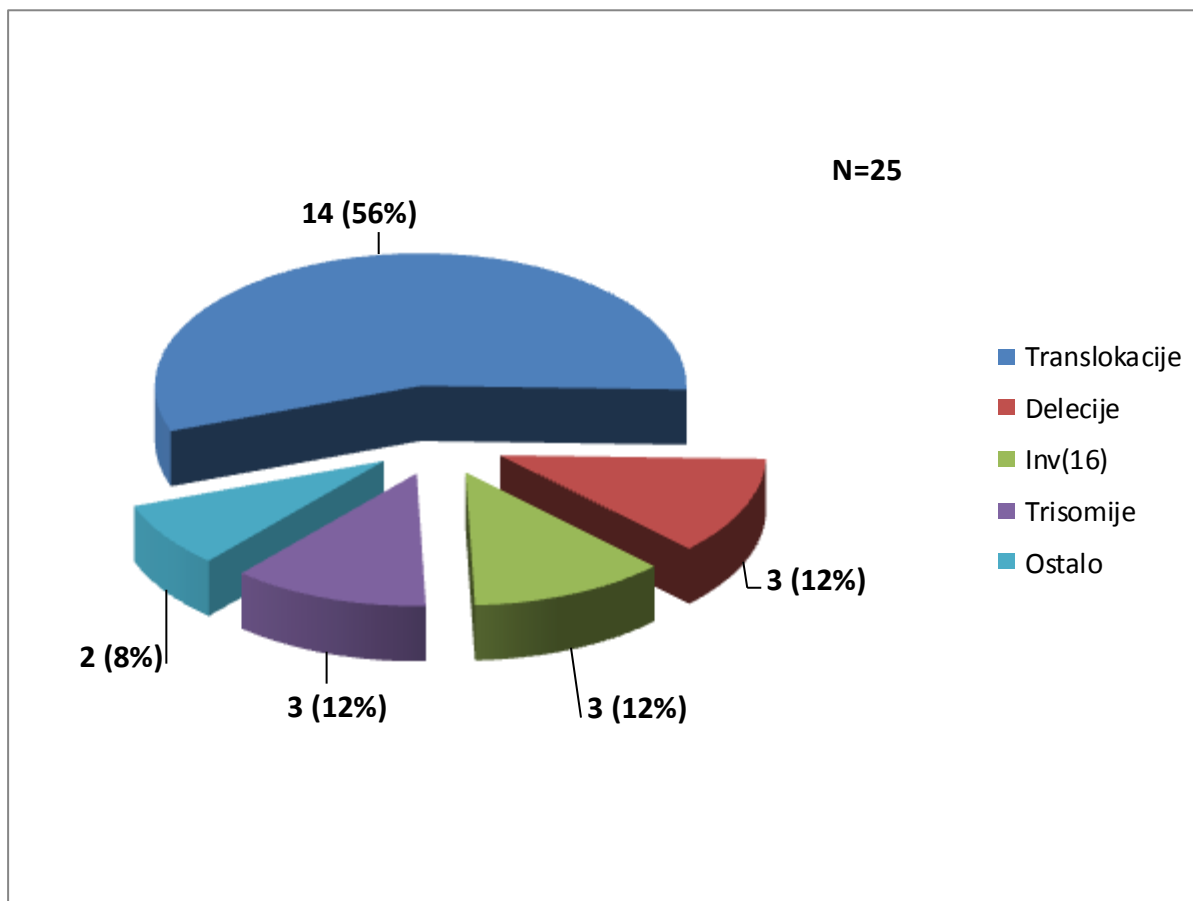
Analizom citogenetskih nalaza pri postavljanju dijagnoze, utvrđeno je da od 55 oboljelih od AML, 43(78%) bolesnika imala aberantni kariotip, dok je normalni kariotip imalo tek 12 (22%) bolesnika. Konstitucijskih trisomija je bilo ukupno 5, od čega su 4 imale i dodatne klonske promjene .

Tablica 8. Udio kariotipova s jednom, dvije te više citogenetskih promjena



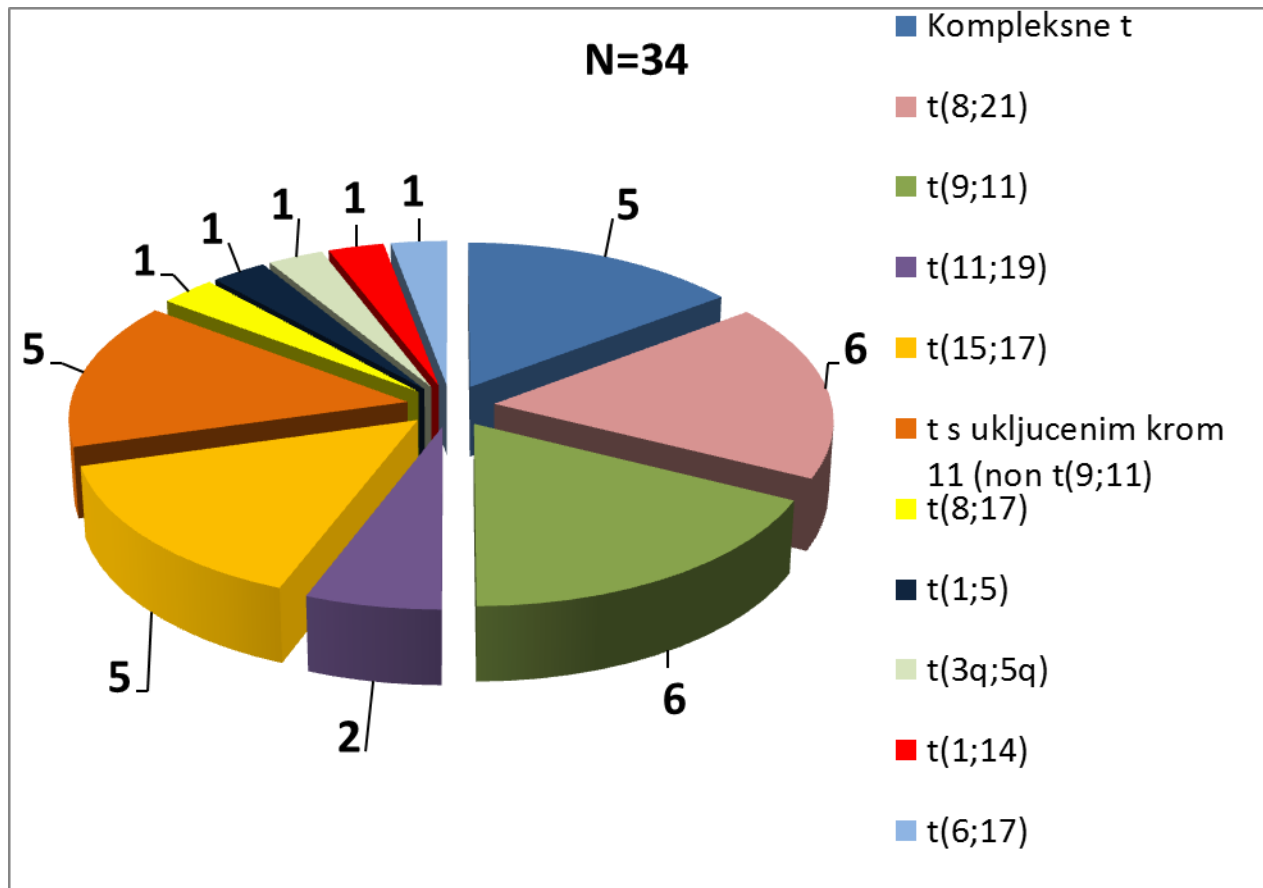
Od aberantnih kariotipa, 43/ 55, najveći udio su činili kariotipovi s jednom citogenetskom promjenom 26/43 (61%), dok su kariotipovi s dvije citogenetske promjene činili 7/43 (16%) a kompleksni kariotipovi bili su zastupljeni sa 10/43 ( 23% ) ukupnog broja aberantnih kariotipova.

Tablica 9. Udio pojedinih aberacija kod kariotipova s jednom citogenetskom promjenom



Tablica 9. prikazuje udio pojedinih citogenetskih promjena u kariotipovima koji su sadržavali samo jednu, izoliranu citogenetsku promjenu, 25/55. Najveća je bila učestalost translokacija 14/25 (56%). Delecije, inverzija kromosoma 16 i trisomije su bile zastupljene sa po 3/25 (12%) ukupnog broja (N=25).

Tablica 10. Udio pojedinih translokacija u aberantnim kariotipovima djece oboljele od AML



U aberantnim kariotipovima djece oboljele od AML je bilo prisutno ukupno 34 translokacije. Od toga su t(8;21) i t(9;11) činile po 17% (6/34). Kompleksne translokacije cu činile 15 % (5/34).

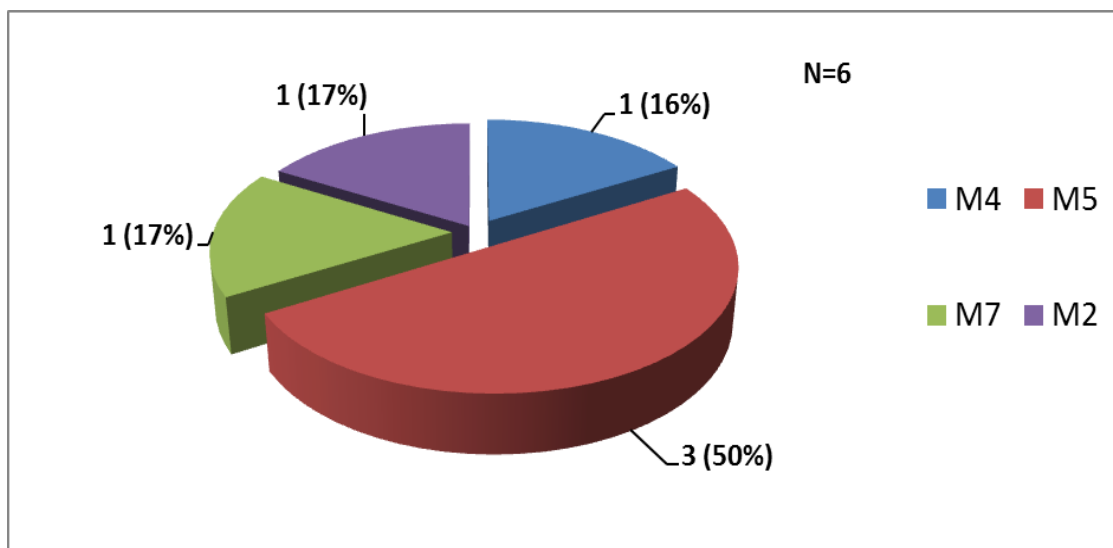
t(15;17) je bila prisutna u 5/34 kariotipova (15%). Translokacije s uključenim kromosomom 11 (s iznimkom t(9;11)) su bile prisutne u 5/34 aberantnih kariotipova (15%).

t(11;19) je bila prisutna u 2 kariotipa.

t(8;17), t(1;5), t(3q;5q), t(1;14) i t(6;17) su bile pronađene u po jednom kariotipu.

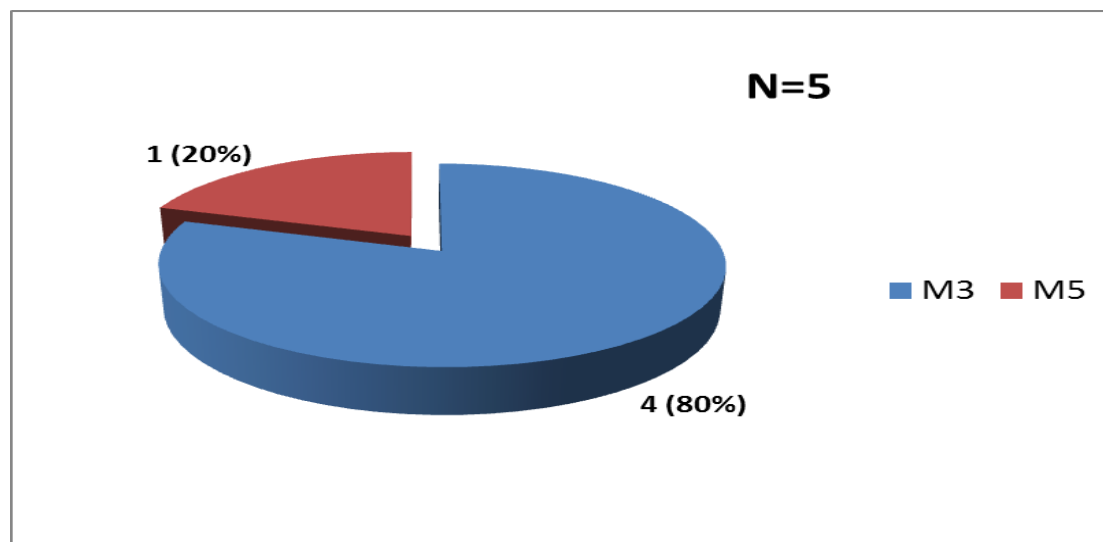


Tablica 11. Udio  $t(9;11)$  u pojedinim FAB podtipovima AML u djece



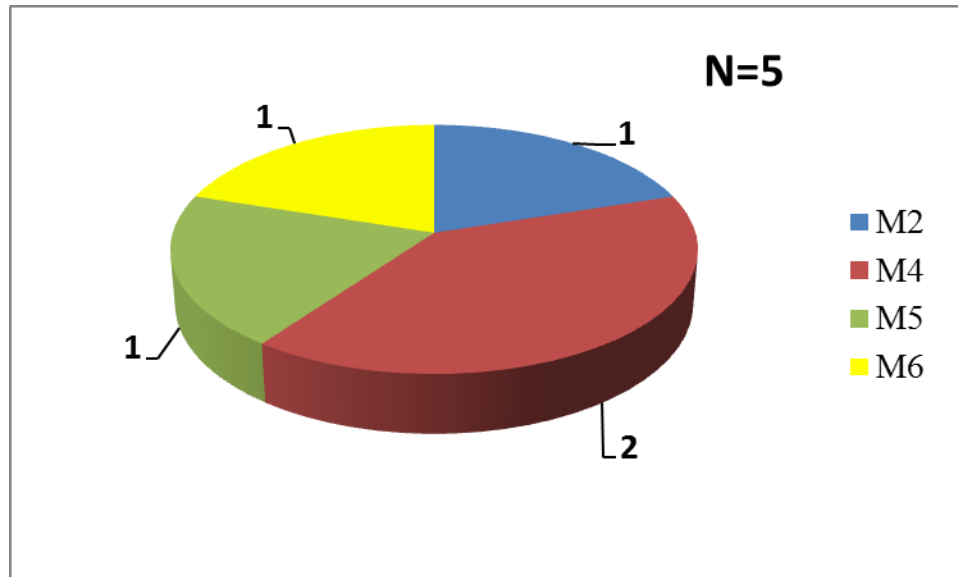
$t(9;11)$  je bila prisutna u 6 aberantnih kariograma, od toga najviše u podtipu M5 (3 /6).

Tablica 12. Udio  $t(15;17)$  u pojedinim FAB podtipovima AML u djece



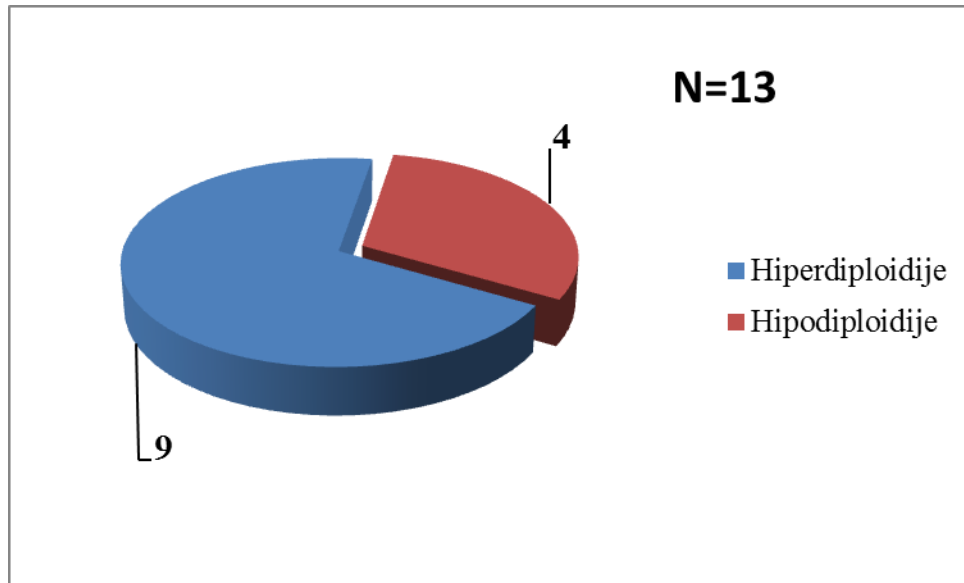
$t(15;17)$  je bila prisutna u 5 aberantnih kariograma, od toga su 4/5 bile u podtipu M3.

Tablica 13. Raspodjela kompleksnih translokacija po podtipovima AML



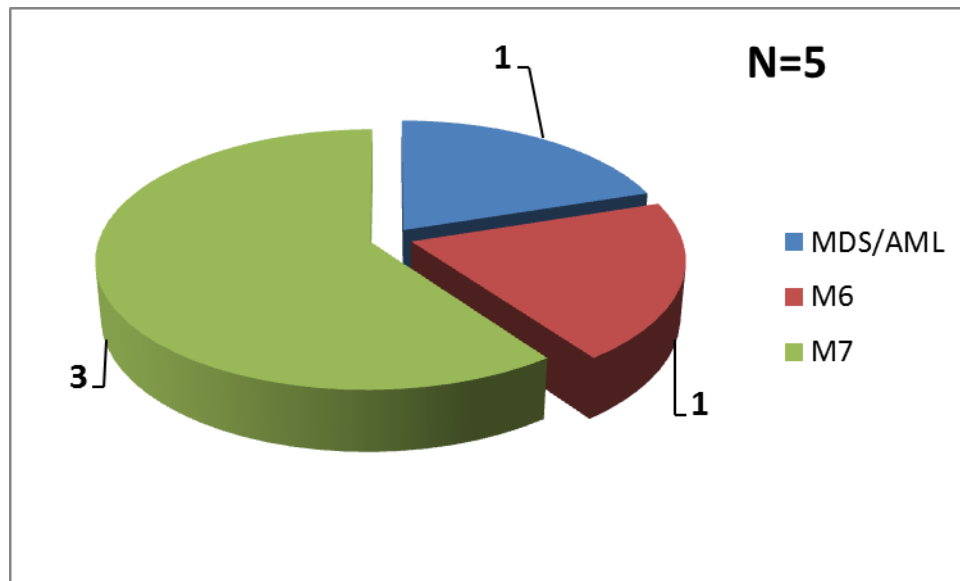
U aberantnim kariotipovima, 43/55, je bilo prisutno i 5 kompleksnih translokacija, čija je raspodjela po podtipovima prikazana na Tablici 13.

Tablica. 14. Raspodjela aneuploidija u kariotipovima djece oboljele od AML



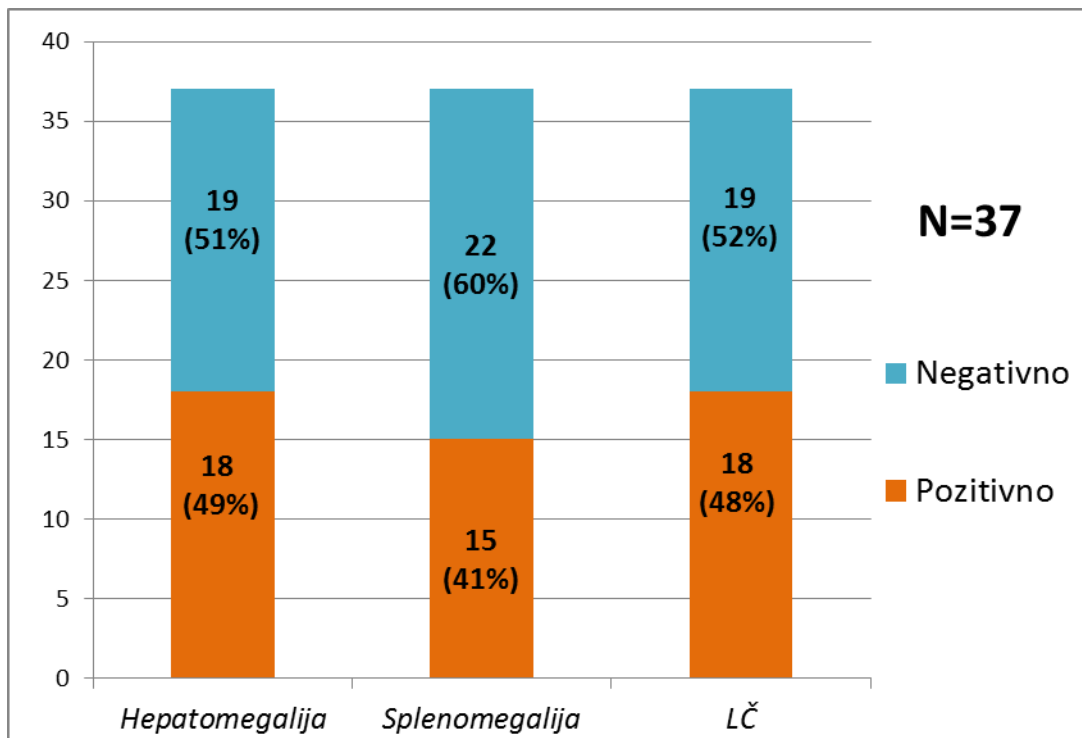
\*Napomena : 5/9 hiperdiploidija podrazumijevaju konstitucijsku trisomiju 21, od kojih samo 1 nema dodatne citogenetske promjene.

Tablica 15. Raspodjela konstitucijske trisomije 21 (Sy Down) u podtipovima AML



Sy Down je bio najviše zastupljen u podtipu M7 (3/5)

Tablica 16. Prisutnost/odsutnost organomegalije i limfadenopatije pri dijagnozi

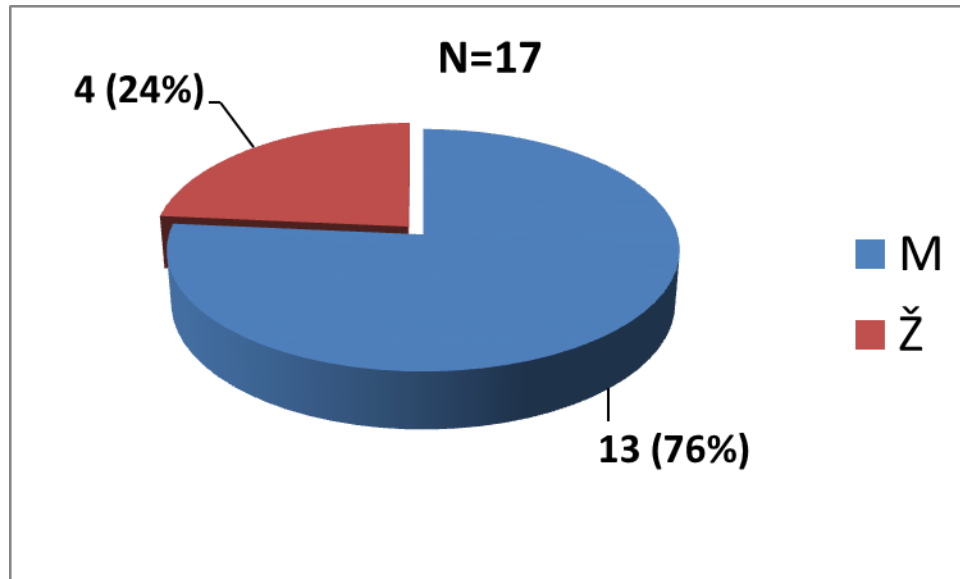


Podatke o jasnim kliničkim prezentacijama u smislu hepatomegalije, splenomegalije i limfadenopatije smo uspjeli pronaći kod 37 od 55 bolesnika. Hepatomegaliju (jetru veću od 2 cm ispod DRL) je imalo 18/37 (49%) bolesnika, splenomegaliju (slezena veća od 2 cm ispod LRL) 15/37 (41%), a limfadenopatija (limfni čvorovi veći od 1 cm) je bila prisutna u 18/37 (48%) djece (Tablica 16).

Analizom imunofenotipizacijskih nalaza za svih 55 bolesnika, prosječni broj leukemijskih stanica pri dijagnozi je iznosio 51 %, prosječan broj blasta u citološkim nalazima je iznosio 45%.

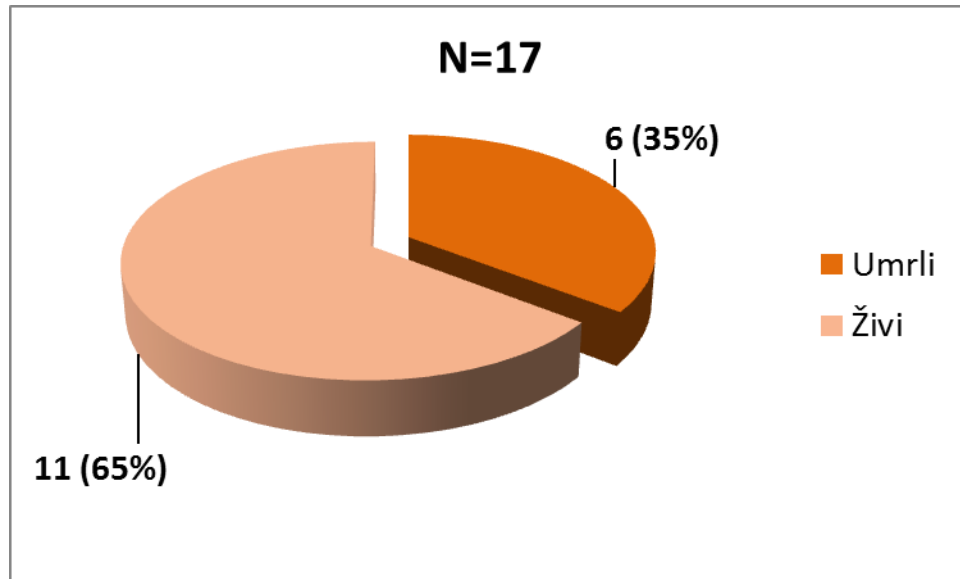
Nalazi krvne slike pri postavljanju dijagnoze su bili dostupni za 36/55 bolesnika . U tih bolesnika, prosječni broj leukocita je iznosio  $31,4 \times 10^9/l$ . Najniža vrijednost je iznosila  $1,2 \times 10^9/l$  a najviša  $215 \times 10^9/l$ . Prosječni broj trombocita je bio  $83,5 \times 10^9/l$ , s najnižom vrijednošću od  $4 \times 10^9/l$ , najvišom  $310 \times 10^9/l$ . Prosječna vrijednost hemoglobina je iznosila 93,19 g/L, najniža vrijednost 47 g/L, najviša 142 g/L.

Tablica. 17. Spolna raspodjela djece u kojih je učinjena alogenična TKMS



Od ukupnog broja djece kojima je učinjena alogenična TKMS (N=17), njih 13/17 (76%) je bilo ženskog spola, dok je 4/17 (24%) bilo muškog spola.

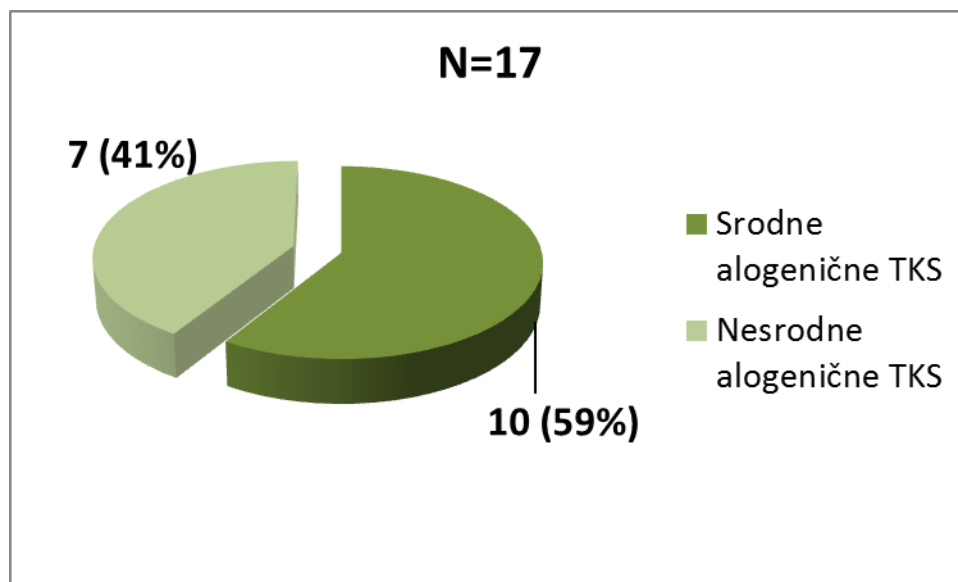
Tablica. 18. Ishodi liječenja alogeničnom transplantacijom KMS djece oboljele od AML



Od ukupnog broja djece liječene transplantacijom KMS (N=17), njih 11/17 (65%) je živo, a 6/17 (35%) je umrlo.

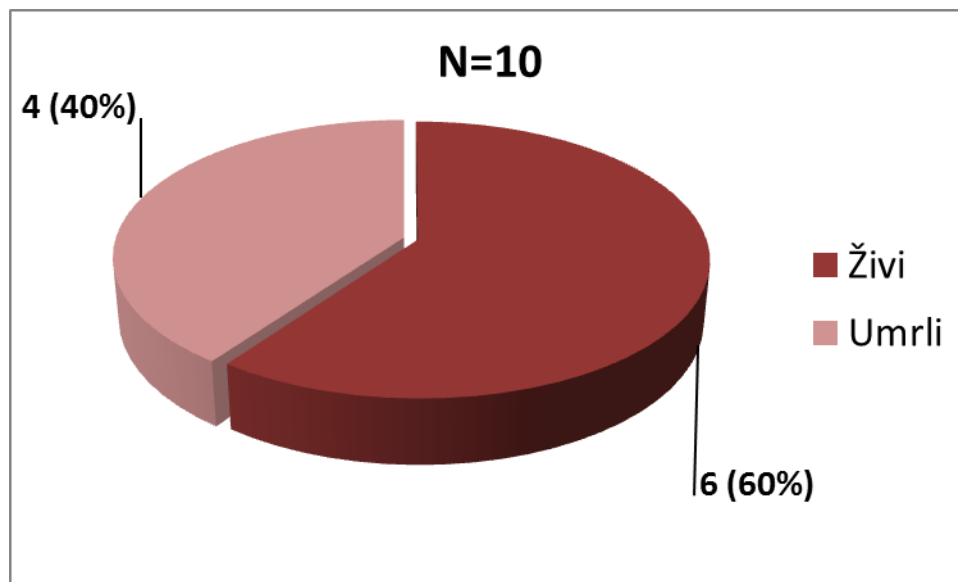


Tablica 19. Raspodjela srodnih i nesrodnih alogeničnih TKS u djece oboljele od AML



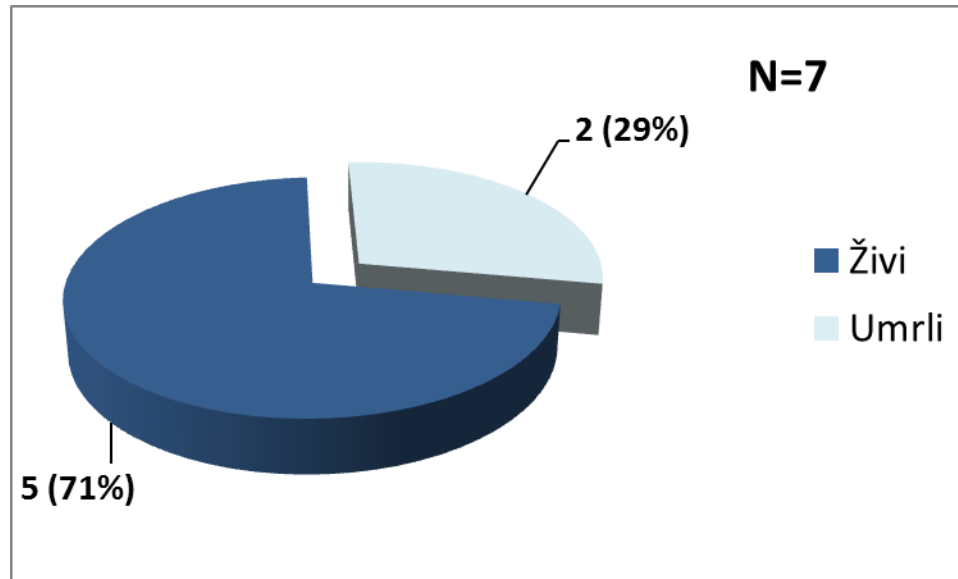
Srodne alogenične TKS su činile 59% ukupnog broja provedenih transplantacija (10/17), dok su nesrodne alogenične TKS činile 41% (7/17) ukupnog broja.

Tablica 20. Ishodi liječenja nakon srodne alogenične TKMS



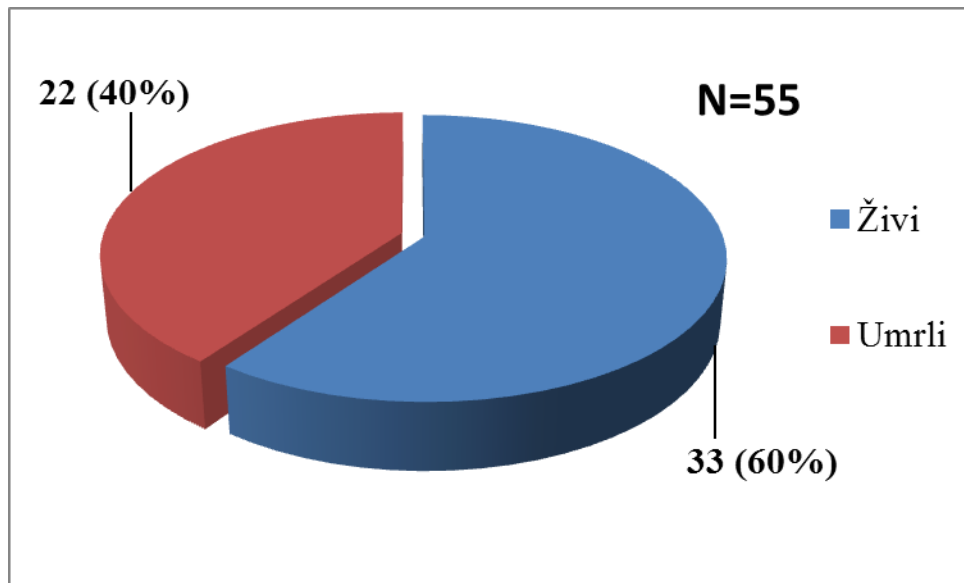
Nakon provedene srodne alogenične TKMS, 60% (6/10) djece je živo, a 40%(4/10) je umrlo.

Tablica. 21. Ishodi liječenja nakon nesrodne alogenične TKMS



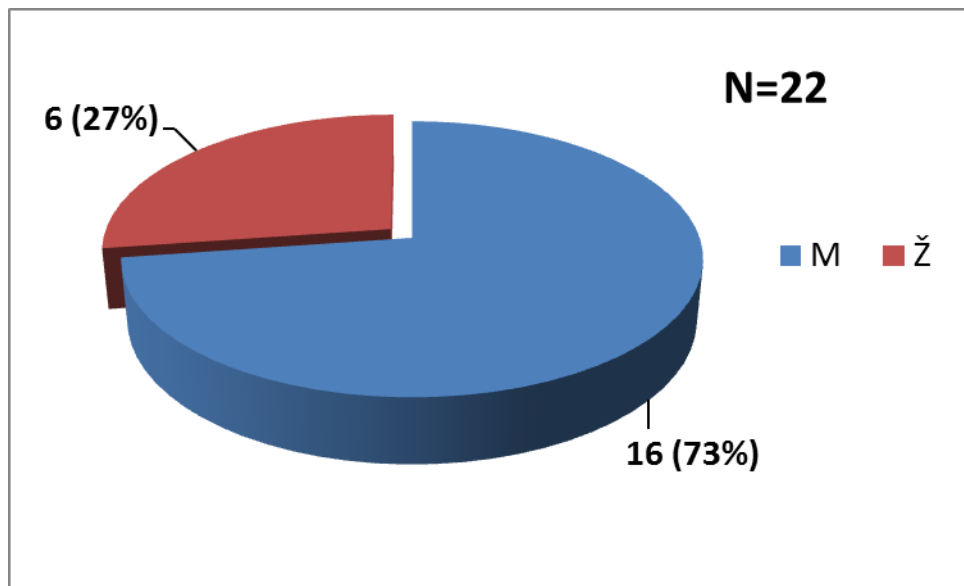
Nakon provedene nesrodne alogenične TKMS 5/7 djece je živo (71%), a 2/7 je umrlo (29%)

Tablica 22. Ishodi liječenja



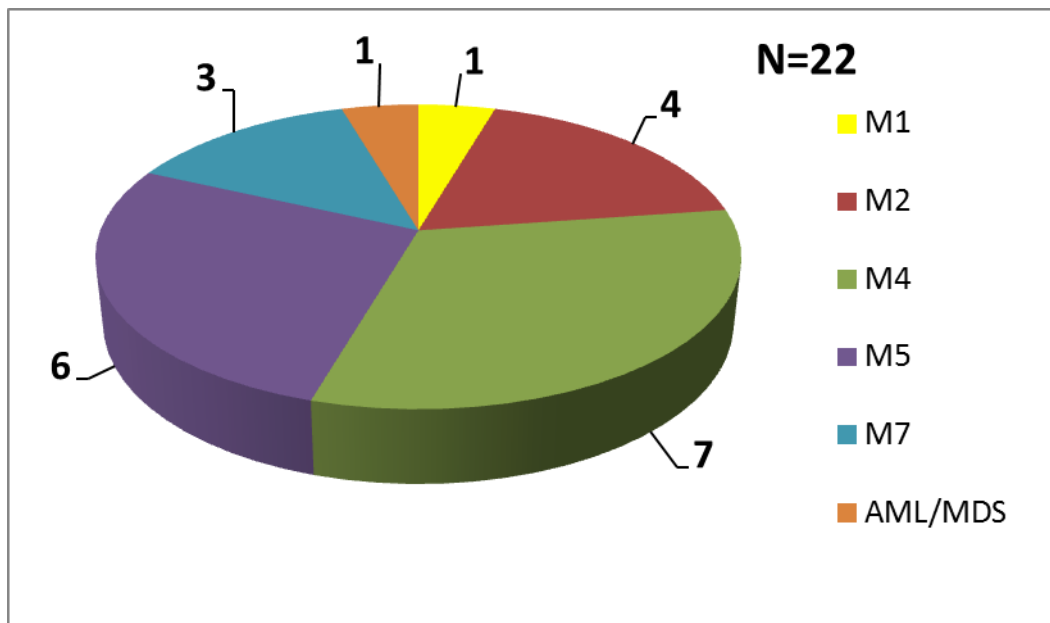
Od 55 djece oboljele od AML 22 /55(40%) djece je umrlo, a 33/55 (60%) je živo. Prosječno preživljenje je iznosilo 14 mjeseci.

Tablica 23. Spolna raspodjela djece umrle od AML



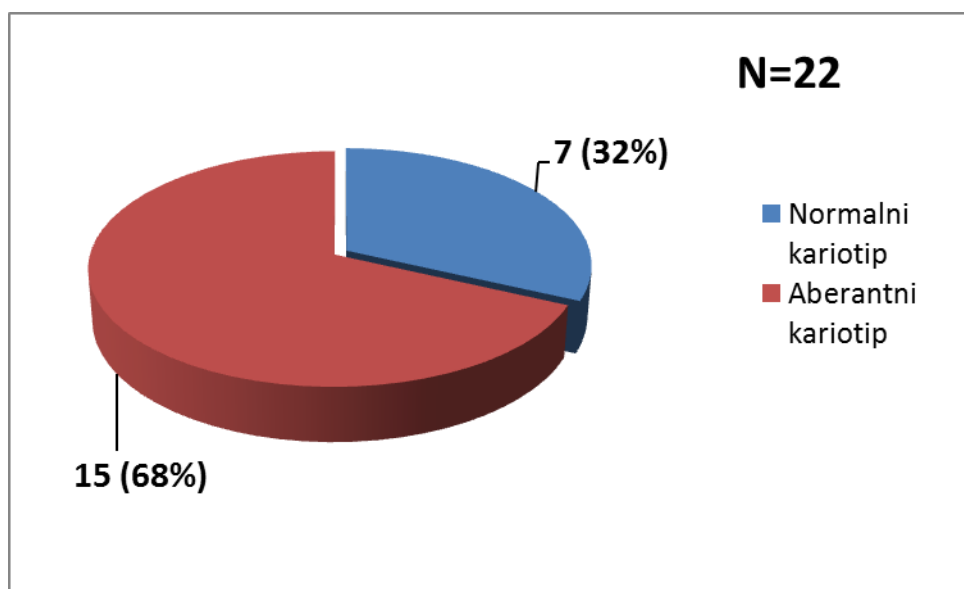
Od ukupnog broja djece umrle od AML (N=22), njih 16 (73 %) je bilo muškog spola, a 6(27%) je bilo ženskog spola.

Tablica 24. Udio pojedinih podtipova AML kod umrle djece



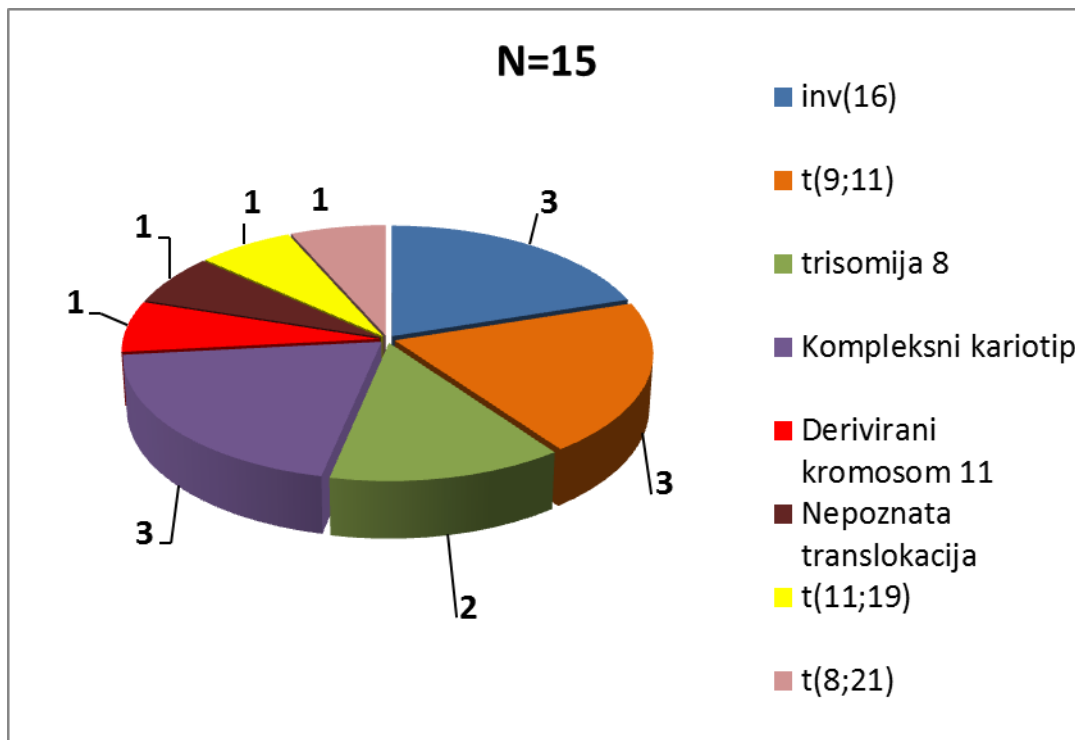
Kod djece umrle od AML (N=22) najviše je bio zastupljen podtip M4 (7/22), slijedi podtip M5(6/22), te podtip M2 (4/22). Najmanje su bili zastupljeni podtipovi M1 (1/22), te AML sa znakovima displazije (1/22).

Tablica 25. Raspodjela normalnih I aberantnih kariotipova u umrle djece



Aberantni kariotipovi su činili 68% (15/22) ukupnog broja kariotipova u djece umrle od AML, a normalni kariotipovi su bili prisutni u 32% (7/22) ukupnog broja.

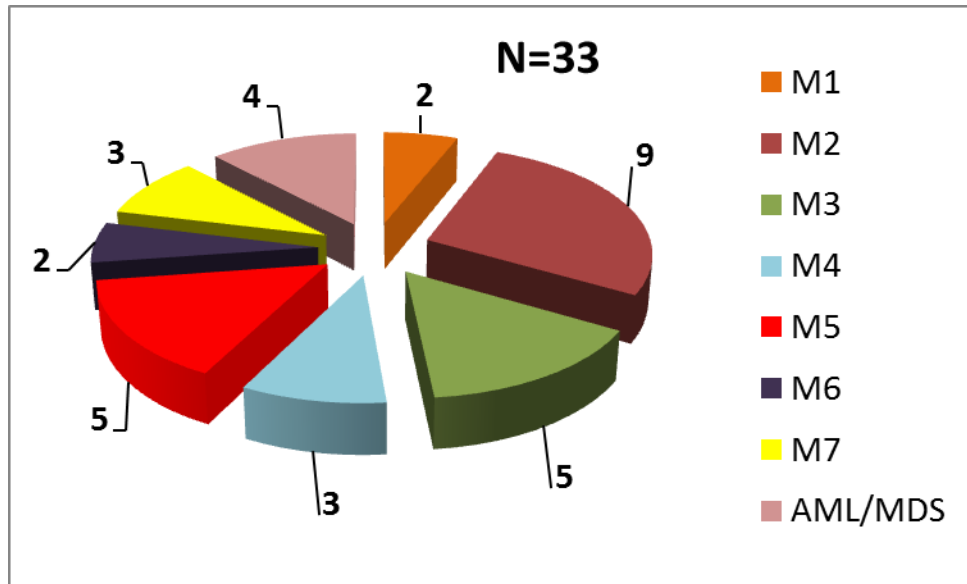
Tablica 26. Raspodjela citogenetskih aberacija u kariotipovima umrle djece



U aberantnim kariotipovima djece umrle od AML (N=15), citogenetske abnormalnosti koje su najviše bile zastupljene su inv(16) s udjelom 3/15, t(9;11) s 3/15 te kompleksni kariotip s 3/15.

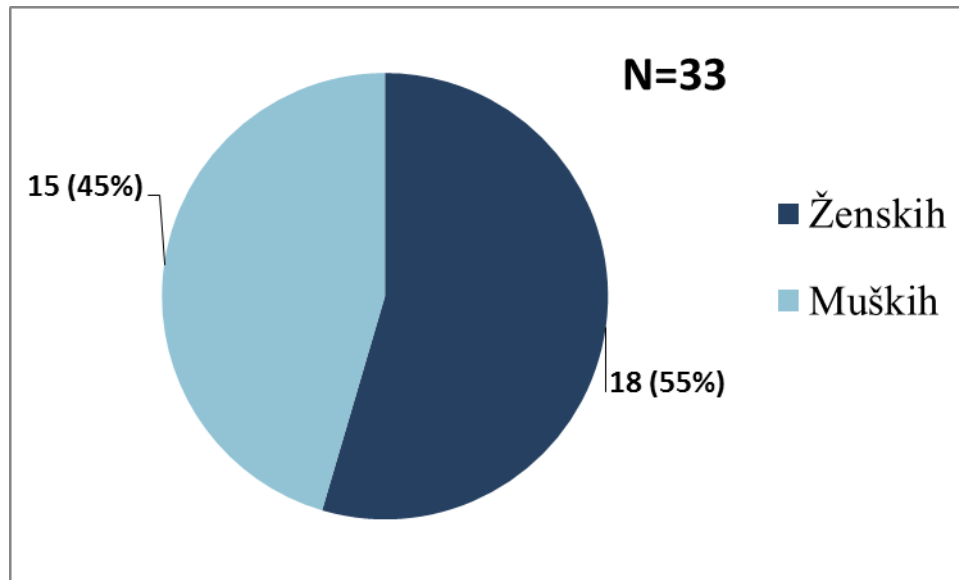


Tablica 27. Udio pojedinih podtipova AML kod žive djece



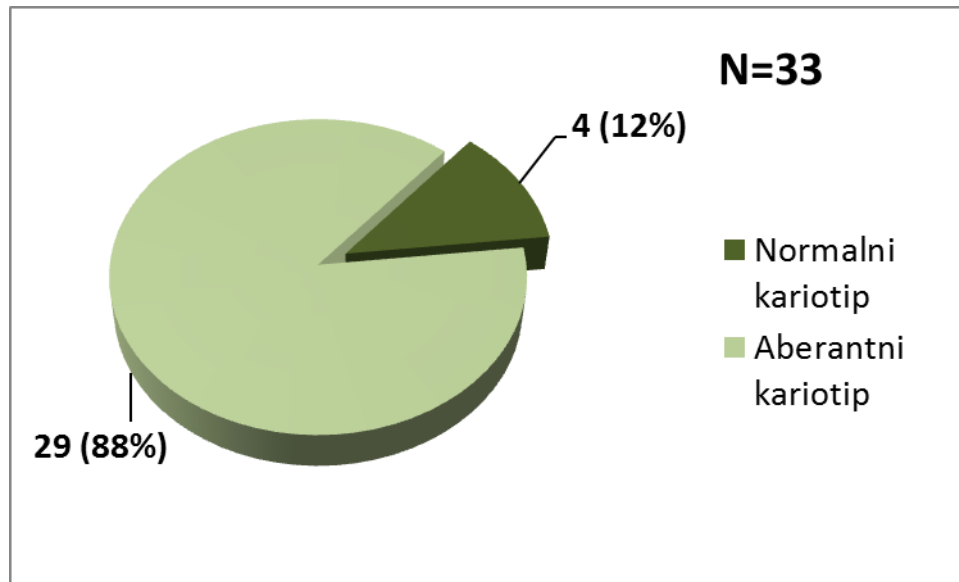
Od ukunog broja žive djece oboljele od AML (N=33), najviše je bilo oboljelih s podtipom M2 (9/33), a najmanje oboljelih s podtipovima M1 (2/33) i M6 (2/33).

Tablica 28. Spolna raspodjela žive djece oboljele od AML



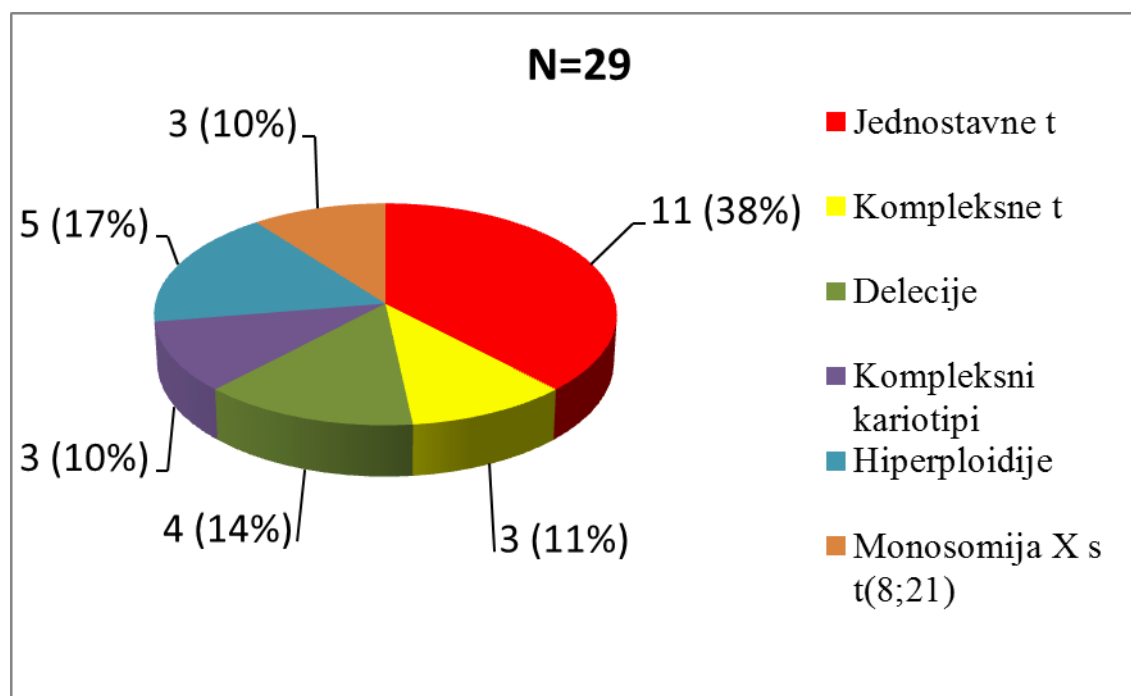
Od ukupnog broja djece koja su oboljela od AML i koja su još živa (N=33), njih 18 (55%) je ženskog spola, a 15 (45%) muškog spola.

Tablica 29. Raspodjela normalnih i aberantnih kariotipova u žive djece oboljele od AML



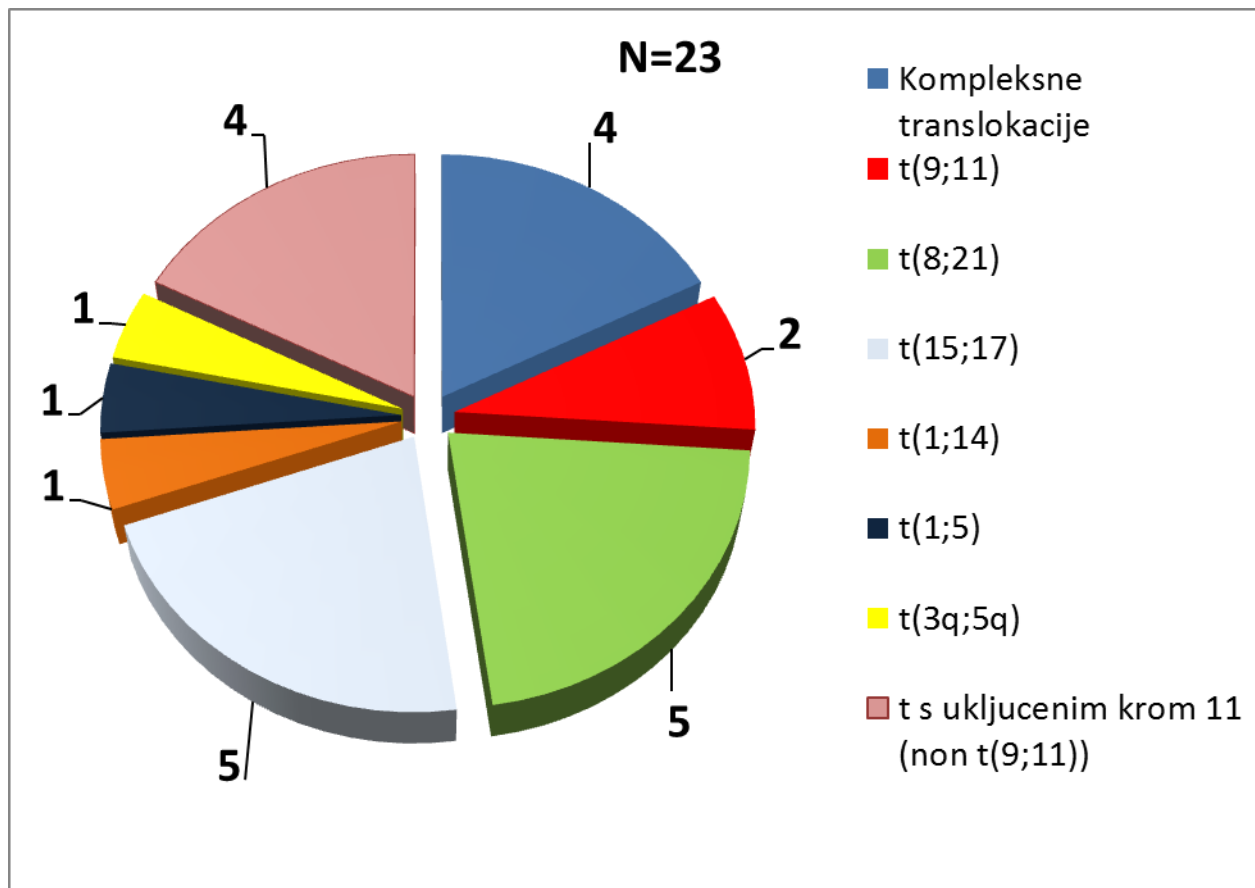
Kod žive djece udio normalnih kariotipa iznosi 12% (4/33), a aberantnih 88% (29/33).

Tablica 30. Raspodjela citogenetskih aberacija u žive djece oboljele od AML



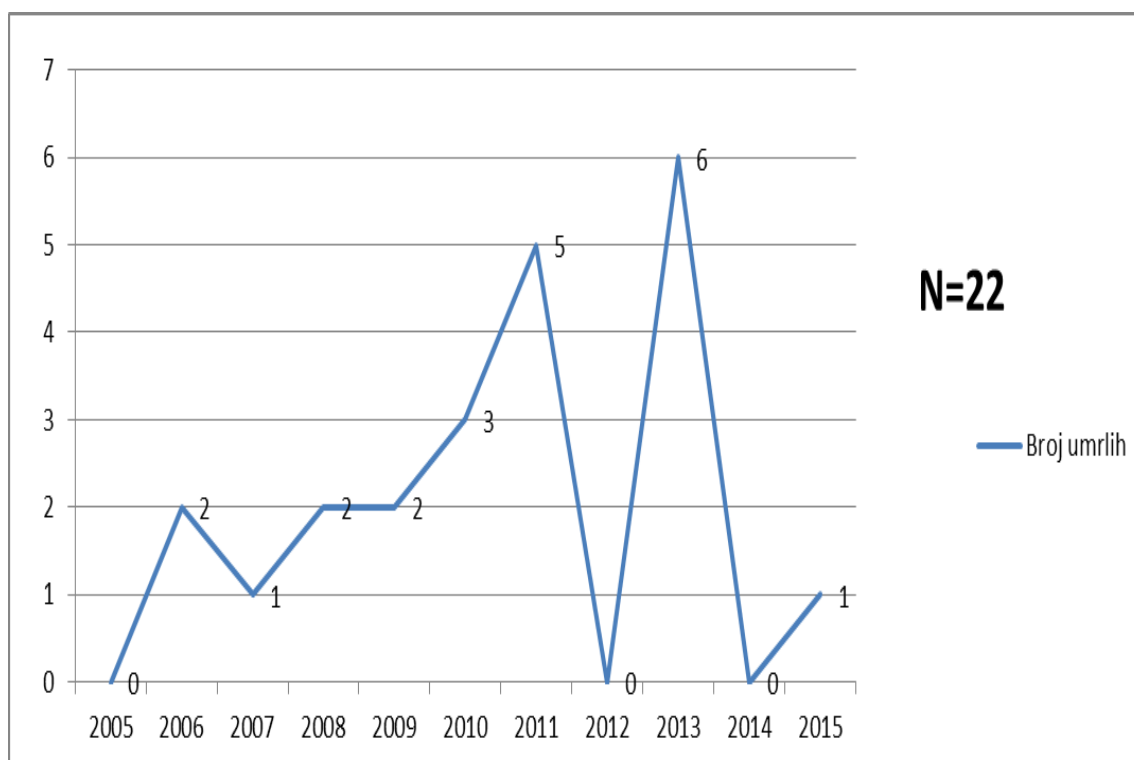
U aberantnim kariotipovima žive djece (N=29), najveći broj citogenetskih aberacija su činile jednostavne translokacije s udjelom od 38% (11/29). Hiperdiploidije su činile 17% (5/28), s tim da su 4/5 konstitucijske trisomije s dodatnim citogenetskim promjenama, 1/5 bez.

Tablica 31. Udio pojedinih translokacija u aberantnim kariotipovima žive djece oboljele od AML



U žive djece s aberantnim kariotipovima (N=23), 5/23 je sadržavalo t(15;17), 5/23 je sadržavalo t(8;21), a kompleksne translokacije i translokacije s uključenim kromosomom 11 (s iznimkom t(9;11)) je sadržavalo po 4/23 kariotipa.

Tablica 32. Kretanje godišnjeg mortaliteta djece dijagnosticirane u razdoblju siječanj 2005.- siječanj 2015.



## 7. Rasprava

Akutna mijeloična leukemija u djece je rijetka bolest, s prosječnom godišnjom incidencijom od 3-4 oboljela u Hrvatskoj. U razdoblju od siječnja 2005 .godine do prosinca 2014. u Hrvatskoj je dijagnosticirano 55 djece oboljele od akutne mijeloične leukemije. U Zavodu za dječju hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju, KBC Zagreb bilo je 39, u Klinici za dječje bolesti u Klaićevoj 6 , u Zavodu za hematologiju pedijatrije u KBC Split 5 , a u Zavodu za hematologiju pedijatrije u KBC Rijeka 5 oboljelih.

U ovom radu analizirali smo klinička i laboratorijska obilježja djece oboljele od akutne mijeloične leukemije.

Od ukupnog broja oboljelih, nešto veća incidencija je bila u muškog spola (56%), što odgovara rezultatima iz svjetske literature.

Dobna raspodjela oboljelih je bila podjednaka s po 18% oboljelih u skupinama 0-2 god i 6-10 god, a po 22% u skupinama 2-6 god i 10-15 god. U skupini 15-18 god je bilo 20 % oboljelih.

Citogenetske abnormalnosti su bile prisutne u 78% (43/55) bolesnika. 25/55 djece imalo je samo jednu izoliranu citogenetsku promjenu u kariogramu. Među strukturnim promjenama kariograma u naših bolesnika najčešće su bile translokacije i to u 56% bolesnika (14/25) , a najčešća translokacija je t(8;21) , t(9;11) i t(15;17), te translokacije koje su zahvaćale tri kromosoma.

Od ostalih češćih aberacija, inv(16) je bila prisutna u 3 aberantna kariotipa, sva tri podtipa M4, a trisomija 8 je bila prisutna u 3 aberantna kariotipa i to 1 M2, 1 M3, 1M5.

Od ukupno 55 analiziranih kariograma, 5 su sadržavala konstitucijsku trisomiju 21, 4 s dodatnim klonskim promjenama, jedna bez.

Imunofenotipizacijski i citološki nalazi punktata koštane srži su se uvelike poklapali, te je prosječan broj blasta u imunofenotipizacijskim nalazima iznosio 51%, a u citološkim 45%.

Kompletne povijesti bolesti su bile dostupne za 37 djece, te smo iz njih izvukli prvotne kliničke prezentacije u smislu organomegalije i limfadenopatije te nalaze kompletne krvne slike pri

postavljanju dijagnoze. U naših bolesnika bio je podjednak broj onih sa i bez organomegalije, kao i podjednak broj onih sa i bez limfadenopatije.

Bolesnici su se uobičajeno prezentirali s trombocitopenijom (prosječna vrijednost  $83,5 \times 10^9/l$ ), i anemijom (prosječna vrijednost Hb 93,19 g/L), a prosječni broj leukocita je iznosio  $31,4 \times 10^9/l$ .

Kod 17/55 (31%) bolesnika oboljelih od akutne mijeloične leukemije učinjena je alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica. 11/17 bolesnika (65%) je živo a 6/17 (35%) je umrlo.

Od ukupnog broja oboljelih , 22/55 (40%) djece je umrlo, a 33/55 (60%) je živo. Prosječno preživljenje umrle djece je iznosilo 14 mjeseci.



## 8. Zaključak

U periodu između siječnja 2005. i prosinca 2014. u Hrvatskoj je dijagnosticirano i liječeno ukupno 55 djece oboljele od akutne mijeloične leukemije, od čega je najveći broj djece (39/55) liječen u Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju „KBCa“ Zagreb.

Dobna i spolna raspodjela oboljele djece je bila podjednaka.

Analizom podtipova akutne mijeloične leukemije po FAB klasifikaciji, došli smo do podataka da su u naših bolesnika najviše zastupljeni podtipovi M2, M4 i M5, dok su M0, M1 i M6 najmanje zastupljeni. Kod 5 bolesnika imali smo AML sa znakovima mijelodisplazije. Od 55 oboljelih, imali smo 2 sekundarne AML (1 nakon liječenja Ewingovog sarkoma i 1 nakon terapije Wilmsovog tumora).

Analizom citogenetskih nalaza pri postavljanju dijagnoze, utvrđeno je da je 78% (43/55) oboljelih imalo aberantni kariotip, dok je normalni kariotip imalo tek 22% (12/55). 61% (26/43) oboljelih imalo je samo jednu izoliranu citogenetsku promjenu u kariogramu, a među strukturnim promjenama kariograma s jednom citogenetskom promjenom u naših bolesnika najčešće su bile translokacije i to u 56% bolesnika. Najčešća translokacija je t(8;21), t(9;11) i t(15;17), te translokacije koje su zahvaćale tri kromosoma.

Analizom imunofenotipizacijskih nalaza za svih 55 bolesnika, prosječni broj leukemijskih stanica pri dijagnozi je iznosio 51 %, . Prosječan broj blasta u citološkim nalazima je iznosio 45%.

U naših bolesnika bio je podjednak broj onih sa i bez organomegalije, kao i podjednak broj onih sa i bez limfadenopatije

Od ukupnog broja liječene djece 60 % je živo, dok je 40% preminulo.

Kod 17/55 (31%) bolesnika oboljelih od akutne limfatičke leukemije učinjena je alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica. 65% bolesnika je živo ,a 35% je umrlo nakon alogenične transplantacije KMS.

## 9.Literatura

1. Gibson BE, Wheatley K, Hann IM, et al.: Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 19 (12): 2130-8, 2005.
2. Creutzig U, Büchner T, Sauerland MC, et al.: Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: a common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A. *Cancer* 112 (3): 562-71, 2008.
3. Pession A, Masetti R, Rizzari C, et al.: Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood* 122 (2): 170-8, 2013.
4. Sung L, Gamis A, Alonzo TA, et al.: Infections and association with different intensity of chemotherapy in children with acute myeloid leukemia. *Cancer* 115 (5): 1100-8, 2009.
5. Vardiman JW, Thiele J et al The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* ,2009 Jul 30;114(5):937-51
6. K. Dubravčić, D. Batinić: Imunofenotipizacija akutnih leukemija I minimalna ostatna bolest *Paediatr Croat.* 2013; 57 (Supl 1): 258-262
7. Manola KN, Panitsas F: et al Cytogenetic abnormalities and monosomal karyotypes in children and adolescents with acute myeloid leukemia: correlations with clinical characteristics and outcome. *Cancer Genet.* 2013 Mar;206(3):63-72
8. Sunčica Ries, Citomorfološka dijagnostika akutnih mijeloičnih leukemija – podjela prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji; *Medicina Fluminensis* 2011, Vol. 47, No. 4, p. 353-359
9. Lanzkowsky P (2011) *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*; 550-564
10. Labar B (2008) *Akutne leukemije*. Vrhovac B i suradnici. *Interna medicina*. Naklada Ljevak 992-1001.

11. Renata Zadro, Sanja Davidović Mrsić (2008), Citogenetske I molekularne promjene u hematologiji, Vrhovac B I suradnici, Interna medicina, Naklada Ljevak 927-928
12. Drago Batinić (2008), Imunološke pretrage u hematologiji, Vrhovac B. I suradnici, Interna Medicina, Naklada Ljevak, 925-927
13. James M. Foran, New Prognostic Markers in Acute myeloid Leukemia: Perspectiva from the Clinic, 2010:47-55
14. Rajić Lj. Leukemije dječje dobi MEDICUS 2001. Vol. 10, No. 2, 167 - 172

## **10. Životopis**

Rođena sam 27. veljače 1991. u Travniku, BiH.

Maturirala sam opću gimnazije Katolički školski centar "Petar Barbarić" u Travniku 2009., a iste godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji završavam u srpnju 2015.

Tijekom studija sam bila članica Studentske udruge hrvatskih studenata medicine CroMSIC.

Aktivno se služim engleskim jezikom.

## 11. Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljubici Rajić, dr. med, na iskazanom povjerenju te na vremenu i trudu koji je uložila kako bi mi svojim savjetima pomogla tijekom pisanja ovoga rada

Zahvaljujem i ing.,Ružici Lasan na pomoći oko citogenetskih podataka, prof dr.sc. Dragi Batiniću i ing. Klari Dubravčić za ustupanje imunofenotipizacijskih nalaza, te dr sc. Koraljki Gjadrov- Kuvedžić na pomoći oko citoloških nalaza.

Veliko hvala i Doc.dr.sc. Gordani Jakovljević iz Dječje bolnice u Klaićevoj, te dr Dubravki Kuljiš iz KBC Split, kao i Prof.dr.sc Jeleni Roganović iz KBC Rijeka na ustupanju podataka o njihovim bolesnicima.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i bratu na ljubavi i bezuvjetnoj podršci koju su mi pružali tijekom 6 godina studija.

Veliko hvala i mojim prijateljima koji su mi ove godine studija učinili životnim razdobljem kojeg ću se uvijek rado sjećati.