

# Akutne leukemije u dječjoj dobi

---

**Dželalija, Natalija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

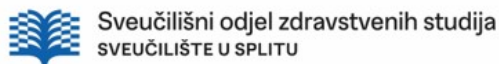
**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:393602>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-31**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Natalija Dželalija**

**AKUTNE LEUKEMIJE U DJEČJOJ DOBI**

**Završni rad**

Split, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Natalija Dželalija**

**AKUTNE LEUKEMIJE U DJEČJOJ DOBI**

**ACUTE LEUKEMIAS IN CHILDHOOD**

**Završni rad/ Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Doc. dr. sc. Dinka Šundov, dr. med.**

Split, srpanj 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo  
**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** Doc. dr. sc. Dinka Šundov, dr. med.

### AKUTNE LEUKEMIJE U DJEČJOJ DOBI

Natalija Dželalija, 311244

#### Sažetak:

**Ciljevi istraživanja:** Utvrditi ukupan broj djece dobi do 18 godina oboljelih od akutne leukemije, koji su dijagnosticirani i liječeni u Kliničkom bolničkom centru Split, u razdoblju od 1.1.2014. do 31.12.2020. godine. Utvrditi njihovu spolnu i dobnu raspodjelu, analizirati citomorfološke, citokemijske, imunofenotipizacijske i citogenetske karakteristike te ishod bolesti.

**Ispitanici i metode:** Retrospektivno istraživanje provedeno je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. U istraživanje su uključena djeca dobi do 18 godina kojima je akutna leukemija dijagnosticirana temeljem citomorfološkog i citokemijskog nalaza aspiracijske punkcije koštane srži. Uvidom u medicinsku dokumentaciju bolničkog informacijskog sustava i arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split prikupljeni su potrebni podatci.

**Rezultati:** U razdoblju od 01.01.2014. do 31.12.2020. godine dijagnosticirano je i liječeno 28 bolesnika dječje dobi: 61% djevojčica i 39% dječaka. Medijan životne dobi bio je 3 godine (min-max, 3 mjeseca - 17 godina i 7 mjeseci). Najveći broj liječene djece je u dobnj skupini od 1 do 3 godine (46%). U 86% ispitanika dijagnosticirana je akutna limfoblastična leukemija, dok je u 11% ispitanika dijagnosticirana akutna mijeloična leukemija. U jedne ispitanice postavljena je dijagnoza promijelocitne leukemije. Među dijagnosticiranim limfoblastičnim leukemijama dominira akutna limfoblastična leukemija B imunofenotipa u 96% ispitanika i to common-B ALL u 91% ispitanika. U 9% ispitanika dijagnosticirana je pre-B ALL. Prosječan broj blasta po uzorku koštane srži je 64% (min-max, 24-98). PAS pozitivni blasti prisutni su u 50% uzoraka bojenih PAS metodom, dok je fokalna pozitivnost uočena u 4% uzoraka. Mijeloperoksidaza (POX) pozitivni blasti prisutni su u 4% uzoraka bojenih POX metodom, dok su POX negativni blasti dijagnosticirani u 65% uzoraka. Samo fokalno pozitivno bojenje na ANAE prisutno je u jednog ispitanika u kojih je primijenjeno ANAE citokemijsko bojenje. Negativni ANAE blasti prisutni su u 31% uzoraka. Citogenetskom analizom uredan kariogram prisutan je u 23% ispitanika dok su u 31% ispitanika nađene istovremeno i strukturne i numeričke promjene. U 89% pacijenata nakon primijenjenog liječenja na Pedijatrijskom odjelu KBC Split postignuta je remisija.

**Zaključak:** U ispitivanom razdoblju akutna leukemija dijagnosticirana je u 28 pacijenata dječje dobi uz dominaciju limfoblastične leukemije B imunofenotipa. Tijekom liječenja u Kliničkom bolničkom centru Split postignuta je remisija u većine bolesnika. Citomorfološka analiza koštane srži i razmaza periferne krvi nadopunjena citokemijom još uvijek je temeljna dijagnostička pretraga na osnovu koje se postavlja dijagnoza akutne leukemije i indicira daljnja obrada.

**Ključne riječi:** akutne leukemije; citologija; citokemija; dječja dob

**Rad sadrži:** 44 stranica, 18 slika, 1 tablica, 16 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**University Department for Health Studies**  
**Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health  
**Scientific field:** : Clinical medical sciences

**Supervisor:** Doc. dr. sc. Dinka Šundov, dr. med

### ACUTE LEUKEMIAS IN CHILDHOOD

Natalija Dželalija, 311244

#### Summary:

**Objectives:** The purpose of this study was to determine the total number of children under 18 years with acute leukemia, diagnosed and treated at the University Hospital of Split between 1.1.2014 and 31.12.2020., in relation to age and gender as well as to analyze cytomorphological, cytochemical, immunophenotyping and cytogenetic characteristics and disease outcomes.

**Subjects and methods:** A retrospective study was conducted at the Clinical Department of Pathology, Forensic Medicine and Cytology of the University Hospital of Split. Study included patients up to 18 years of age who were diagnosed with acute leukemia based on cytomorphological and cytochemical findings on bone marrow aspirates. The medical records were retrieved from data base and archives of the Clinical Department of Pathology, Forensic Medicine and Cytology, University Hospital of Split.

**Results:** Between 01.01.2014 and 31.12.2020, 28 children were diagnosed and treated for acute leukemia: 61% were girls and 39% were boys. Median age was 3 years (ranged 3 months-17 years and 7 months). The majority of children were in the 1-3 years age group (46%). In 86% of children acute lymphoblastic leukemia was diagnosed, whereas acute myeloid leukemia was diagnosed in 11% of cases. One child was diagnosed as promyelocytic leukemia. Among the diagnosed lymphoblastic leukemias, B immunophenotype dominated in 96% cases and 91% of them were common-B ALL. Pre-B ALL immunophenotype was diagnosed in 9% of cases. The average number of blasts per bone marrow aspirate were 64% (min-max, 24-98). PAS positive blasts are present in 50% of samples analyzed by PAS method, while focal positivity is noted in 4% of samples. Myeloperoxidase (POX) positive blasts are present in 4% of aspirates analyzed by POX method, while POX negative blasts were diagnosed in 65% of aspirates. Focal ANAE positivity was present in one case. Negative ANAE blasts were present in 31% of samples. Cytogenetic analysis showed no chromosomal abnormalities in 23% of children, while both structural and numerical abnormalities were found in 31% of children. During therapy administered at the Pediatric Department, University Hospital of Split, remission was achieved in 89% of children.

**Conclusion:** In the study period, acute leukemia were diagnosed in 28 children, most of which are acute lymphoblastic leukemia of B immunophenotype. During therapy remission was achieved in most patients. Cytomorphologic analysis of bone marrow aspirates and periferal blood smears, supplemented by cytochemistry is still the basic method for acute leukemia diagnosis and the method by which additional analysis are indicated.

**Keywords:** acute leukemias; cytology; cytochemistry; childhood

**Thesis contains:** 44 pages, 18 figures, 1 table, 16 references

**Original in:** Croatia

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 1.1. AKUTNE LEUKEMIJE.....                            | 1  |
| 1.1.1. Epidemiologija .....                           | 1  |
| 1.1.2. Patogeneza .....                               | 2  |
| 1.1.3. Etiologija .....                               | 2  |
| 1.1.4. Klinička slika.....                            | 4  |
| 1.1.5. Dijagnoza.....                                 | 5  |
| 1.1.6. Citomorfologija .....                          | 6  |
| 1.1.7. Citokemija .....                               | 8  |
| 1.1.8. Imunofenotipizacija.....                       | 9  |
| 1.1.9. Citogenetika.....                              | 9  |
| 1.1.10. Subklasifikacija akutnih leukemija.....       | 10 |
| 1.1.11. Liječenje .....                               | 12 |
| 2. CILJ RADA.....                                     | 13 |
| 3. ISPITANICI I METODE.....                           | 14 |
| 3.1. Ispitanici .....                                 | 14 |
| 3.2. Mjesto studije .....                             | 14 |
| 3.3. Metode prikupljanja i obrade podataka .....      | 15 |
| 3.4. Obrada i bojanje citoloških uzoraka .....        | 15 |
| 3.4.1. Bojenje po May – Grunwald - Giemsi (MGG) ..... | 15 |
| 3.4.2. Citokemijsko bojenje.....                      | 18 |
| 4. REZULTATI .....                                    | 24 |



|                    |    |
|--------------------|----|
| 6. RASPRAVA.....   | 30 |
| 7. ZAKLJUČAK.....  | 33 |
| 7. LITERATURA..... | 34 |
| 8. ŽIVOTOPIS ..... | 36 |

# 1. UVOD

Maligne bolesti su drugi vodeći uzrok smrtnosti u djece starosti do 14 godina, odmah nakon nesreća (1). Prema zadnjim podacima Registra za rak RH, u proteklih 10 godina je u prosjeku godišnje od malignih bolesti obolijevalo 112, a umiralo 21 dijete dobi do 14 godina odnosno obolijevalo 167, a umiralo 35 djece u dobi do 19 godina (2). Najčešća skupina malignih oboljenja su leukemije koje čine 25-30% svih malignih bolesti u djece. Prema stupnju zrelosti stanica razlikujemo akutne leukemije (AL) i kronične leukemije (CL) koje čine tek oko 3% svih leukemija dječje dobi (3).

## 1.1. AKUTNE LEUKEMIJE

AL čine oko 97% svih leukemija dječje dobi. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl, World Health Organization, WHO), akutne leukemije dijele se u tri osnovne skupine: 1. akutna mijeloična leukemija (AML); 2. limfoblastična leukemija/limfom (ALL/LBL); i 3. akutna leukemija neodređenog odnosno nejasnog (eng. ambiguous) podrijetla koja čini manje od 5% svih akutnih leukemija (4).

### 1.1.1. Epidemiologija

Godišnje se na 1.000.000. djece otkrije 35-50 novodijagnosticiranih slučajeva akutne leukemije. Najveća pojavnost akutne leukemije je u dobi između 2. i 5. godine života. Prema zastupljenosti u svijetu, najveća učestalost akutnih leukemija je u Srednjoj i Južnoj Americi dok je u Europi najveća učestalost u Danskoj. Približno je jednaka zastupljenost u oba spola, ali postoje podatci o nešto češćoj pojavi u dječaka. ALL je najučestalija leukemija u djece

(>70%) te se javlja najčešće u drugoj i trećoj godini života. AML čini do 20% svih AL i pretežno se javlja u dojenačkoj dobi i kod tinejdžera (5,6).

### **1.1.2. Patogeneza**

Akutne leukemije nastaju kao posljedica poremećaja genoma matičnih stanica hematopoeze. Diobom tih stanica nastaju nove stanice tzv. leukemijske stanice. Populaciju leukemijskih stanica karakterizira sposobnost proliferacije, preživljavanja i samoobnavljanja. Takva klonalna populacija pokazuje superiornost u rastu nad zdravom populacijom stanica. Kada klonalna proliferacija potisne ostale stanice hematopoeze u koštanoj srži, razvit će se prepoznatljiva klinička slika. Maligno promijenjene stanice leukemijskog klona, zbog genomskih poremećaja, ne sazrijevaju već se zaustavljaju u diferencijaciji na razini nezrelih stanica.

Danas se leukemogeneza povezuje s poremećajem u funkciji staničnih onkogeni i tumorsupresorskih gena. Stanični onkogeni ili protonkogeni su geni koji kodiraju proteine čija je uloga izravno nadziranje staničnog ciklusa rasta i programirana smrt (apoptoza). Mutacijom protonkogeni nastaju onkogeni, geni koji uzrokuju malignu transformaciju stanica. Inhibicija tumorsupresorskih gena pogoduje leukemogenezi (6,7).

### **1.1.3. Etiologija**

Etiologija akutnih leukemija još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali postoje brojni genetski i okolišni čimbenici koji djeluju leukemogeno. Važnu ulogu u nastanku leukemija imaju virusne infekcije, nasljedne i stečene bolesti, ionizirajuće zračenje i kemijske tvari. Navedeni čimbenici utječu na povećanje rizika nastanka leukemije.

Istraživanja su pokazala da izloženost i malim dozama ionizirajućeg zračenja povećava rizik razvoja ALL u djece dok u odraslih češće AML. Pri istraživanju utjecaja navika i

zanimanja roditelja na nastanak leukemije u djece, utvrđeno je da alkoholizam u majke za vrijeme trudnoće povećava incidenciju AML proporcionalno dnevnoj količini unosa alkohola dok uživanje duhana nije pokazalo korelaciju s povećanom incidencijom bolesti.

Povećana incidencija leukemija u nasljednih bolesti i u jednojajčanih blizanaca ukazuje na postojanje nasljedne predispozicije za razvoj leukemije. Vjerojatnost leukemije u braće i sestara oboljelog pacijenta je četiri puta veća nego u općoj populaciji. Djeca s Downovim sindromom imaju veći rizik za razvoj leukemije. Naime, studije su dokazale da u prvoj godini života imaju 56 puta veću šansu razvoja leukemije u odnosu na drugu djecu, dok se nakon 4. godine života taj rizik se smanjuje na 10 puta.

Također, mnoge stečene bolesti tijekom svoje evolucije mogu prijeći u akutnu leukemiju. To se posebno odnosi na bolesti krvotvornih matičnih stanica poput sindroma mijelodisplazije (5,7).

U tablici 1. predočene su nasljedne i stečene bolesti s povećanim rizikom za nastanak AL (7).

**Tablica 1. Nasljedne i stečene bolesti s povišenom učestalošću akutnih leukemija (7)**

| <b>NASLJEDNE BOLESTI</b>  | <b>TIP LEUKEMIJE</b> | <b>STEČENE BOLESTI</b>   |
|---|----------------------|--|
| Downov sindrom<br>Turnerov sindrom<br>neurofibromatoza<br>Von Recklinghausen  | ALL, AML             | CML<br>mijelofibroza<br>policitemija rubra vera<br>ne – Hodgkinov limfom<br>kronična limfocitna leukemija                                  |
| Bloomov sindrom<br>Klinefelterov sindrom<br>Fanconijeva anemija<br>Wiskott – Aldrichov sindrom<br>Kostmanova agranulocitoza<br>Blackfan – Diamondov sindrom | AML                  | esencijalna trombocitemija<br>mijelodisplazija<br>aplastična anemija<br>multipli mijelom<br>Hodgkinov limfom<br>rak dojke, pluća i jajnika |
| Ataxia teleangiectasia<br>osteogenesis imperfecta<br>Brutonova agamaglobulinemija<br>Deficit glutatiton reductaze   | ALL                  |  |

#### **1.1.4. Klinička slika**

Klinička slika akutnih leukemija posljedica je: 1. ekspanzije leukemijskog klona u različitim tkivima i organima; 2. potiskivanja i slabosti funkcije normalne koštane srži; 3. toksičnog učinka citostatika u terapiji; i 4. metaboličkih komplikacija.

Klinička manifestacija ovisi o stupnju infiltriranosti koštane srži i organa. Napredovanjem bolesti leukemijske stanice zauzimaju sve veći udio koštane srži te suprimiraju rast i razvoj normalne hematopoeze. Potiskivanje eritropoeze dovodi do razvoja anemije koja se očituje pojavom umora, slabosti, tahikardije te dispneje. Osim anemije, razvija se i trombocitopenija pa se pojavljuju krvarenja po koži i sluznicama. Uslijed granulocitopenije dolazi do povišenja tjelesne temperature zbog infekcija izazvanih osnovnom bolešću ili liječenjem citostatika.

Leukemijske stanice mogu infiltrirati različita tkiva i organe. Predilekcijska mjesta osim koštane srži su slezena i jetra što dovodi do splenomegalije i hepatomegalije, limfni čvorovi što rezultira pojavom limfadenopatije. Zbog infiltracije periosta i kostiju često se javljaju bolovi u kostima. Središnji živčani sustav (SŽS) zahvaćen je u manje od 5% oboljele djece s ALL. Tada se leukemija očituje simptomima povišenog intrakranijalnog tlaka (povraćanje, jutarnje glavobolje itd.) te znakovima i simptomima infiltracije parenhima mozga. Fizikalni nalazi i simptomi rezultat su infiltracije tkiva i organa leukemijskim stanicama, odnosno smanjenja produkcije normalnih stanica hematopoeze (6).

Metaboličke komplikacije često prate akutne leukemije s velikom tumorskom masom i mogu dovesti do akutnog zatajenja bubrega. U metaboličke promjene ubrajamo hiperuricemiju, hiperosmolarnost, promjene u koncentraciji elektrolita Na, Ca, K i P, acidozu i dehidraciju (3,7).

### **1.1.5. Dijagnoza**

Akutne leukemije su skupina izrazito progresivnih malignih hematoloških neoplazmi koje karakterizira klonalna ekspanzija nezrelih hematopoetskih stanica. Stoga je točna i pravovremena dijagnostika od izuzetne važnosti pri odabiru ispravnog terapijskog pristupa i praćenja bolesnika, a time i uspjeha terapije.

Sumnja na hematološku bolest postavlja se na temelju fizikalnog pregleda i nalaza krvne slike. Pri fizikalnom pregledu oboljele djece mogu se uočiti bljedilo, umor, kožna i

mukozna krvarenja te se palpacijom može otkriti uvećanje jetre, slezene ili limfnih čvorova. U krvnoj slici razina hemoglobina može biti umjereno do znatno snižena. Niske razine hemoglobina indiciraju dulje trajanje leukemije, a visoka razina ukazuje na bržu proliferaciju malignih stanica. Najčešće je prisutna anemija i trombocitopenija, dok broj leukocita može biti povećan, normalan ili smanjen. Nakon postavljene kliničke i laboratorijske sumnje, dijagnoza akutne leukemije se postavlja na temelju citomorfološke analize periferne krvi i koštane srži te dodatnih metoda citokemijske, imunofenotipizacije, citogenetike i molekularne analize. Nalaz leukemijskih stanica u koštanoj srži/perifernoj krvi potvrđuje dijagnozu akutne leukemije. Morfološkom analizom nije moguće razlučiti o kojem tipu leukemije se radi iako morfološka slika ponekad može upućivati na mijeloično ili limfatično podrijetlo nezrelih stanica. Kompletna dijagnostika ključna je za postavljanje konačne dijagnoze, utječe na odabir terapije te ima prognostički značaj (3,6,7).

#### **1.1.6. Citomorfologija**

Unatoč napretku u dijagnostici, citomorfološka analiza razmaza periferne krvi i koštane srži još uvijek je temeljna dijagnostička pretraga akutnih leukemija. Stanice za analizu koštane srži dobiju se aspiracijskom punkcijom pomoću tanke igle.

Aspiracijskom punkcijom koštane srži u djece punktira se proksimalni dio tibije ili područje stražnjeg grebena zdjelične kosti (Slika 1). Prije punkcije potrebno je dezinficirati kožu i primjeniti anestetik. Postupak se izvodi jednokratnom iglom na koju se u trenutku gubitka otpora kosti pričvrsti šprica od 20 ml. Bolesnik osjeti bol u trenutku aspiracije. Aspirira se volumen od 0,3 do 0,5 mL, a za potrebe dodatnih pretraga (imunofenotipizacija, citogenetika i molekularna analiza) potrebno je aspirirati više koštane srži (1-2mL). Dobiveni uzorak stanica istisne se na predmetno staklo i razmazuje metodom stakla preko stakla (7).

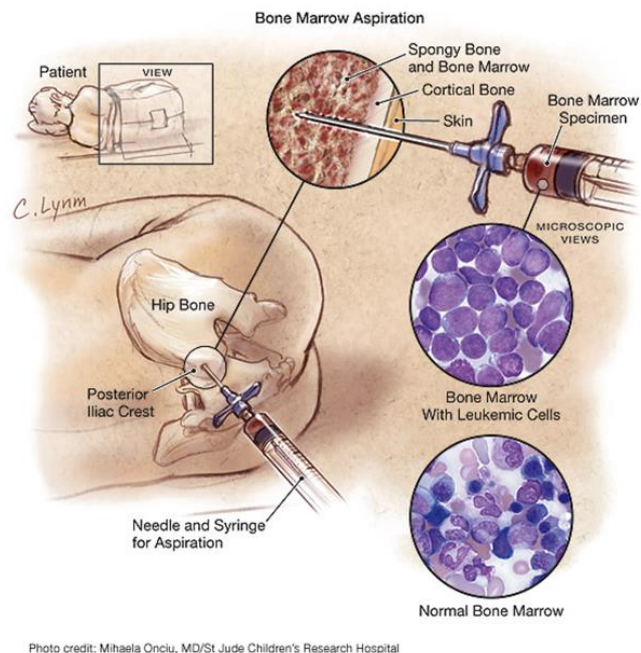


Photo credit: Mihaela Onciu, MD/St Jude Children's Research Hospital

*Slika 1. Aspiracija koštane srži. Izvor: WEB*

Za citomorfološku analizu koristi se metoda bojenja po May-Grunwald-Giemsi (MGG). Prije bojenja pripremljeni razmazi se trebaju sušiti na zraku. U razmazu koštane srži analizira se prisutnost, brojnost i stupanj zrelosti stanica hematopoeze te njihove morfološke karakteristike. Zastupljenost pojedinih stanica procjenjuje se brojenjem minimalno 500 stanica svih loza hematopoetskog sustava i potom se brojčane vrijednosti preračunavaju u postotke (8).

Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije, nalaz više od 20 % blasta u AML, odnosno 25% u ALL unutar 200 stanica s jezgrom u razmazu periferne krvi ili 500 stanica s jezgrom u razmazu koštane srži, smatra se akutnom leukemijom (4).

Citomorfološka analiza razmaza koštane srži nadopunjuje se citokemijskim bojenjem.



### 1.1.7. Citokemija

Citokemijske metode pomoću specifičnih bojenja omogućuju vizualizaciju enzima (enzimske citokemijske pretrage) ili proteina, ugljikohidrata, masti i drugih staničnih struktura (neenzimske citokemijske pretrage). Citokemija pridonosi boljem povezivanju kemijskog identiteta s morfološkom strukturom i funkcijom stanice, a time i preciznijoj identifikaciji stanica.

U dijagnostici akutnih leukemija osobito su važne one metode koje otkrivaju specifične razlike između morfološki sličnih stanica. Od citokemijskih pretraga najčešće se koriste: reakcija dokazivanja mijeloperoksidaze (POX), reakcija alfa-naftil acetat esteraze (ANAE) I PAS (engl. Periodic acid Schiff) metoda.

U neenzimske citokemijske pretrage ubrajamo PAS metodu. Njezinom primjenom dokazujemo prisutnost ugljikohidrata u citoplazmatskim vakuolama stanica različitog porijekla. Tipična morfološka slika uz pozitivno PAS bojenje u nezrelim stanicama upućuju na dijagnozu akutne limfoblastične leukemije.

U enzimске citokemijske pretrage ubrajamo reakciju dokazivanja mijeloperoksidaze (POX) i reakciju alfa- naftil acetat esteraze (ANAE). Mijeloperoksidaza je lizosomski protein sadržan u stanicama granulocitopoeze. Pozitivna reakcija na mijeloperoksidazu ukazuje na mijeloično podrijetlo zloćudnih stanica pri čemu je pozitivitet izrazito izražen u stanicama neutrofilnog i eozinofilnog reda granulopoeze, a iznimno i u stanicama monocitopoeze. Ostale stanice hematopoeze su mijeloperoksidaza negativne.

Alfa-naftil-acetat esteraza (ANAE) pripada skupini izoenzima esteraza i nalazi se u lizosomima svih stanica hematopoeze. Njezina aktivnost je najviše izražena u monocitima što dokazujemo dodatkom natrijeva fluorida (NF) . Dodatkom natrijeva fluorida inhibira se aktivnost ANAE samo u stanicama monocitopoeze, što pomaže u razlikovanju podtipova akutnih mijeloičnih leukemija. Reakcija je pozitivna u akutnoj monocitnoj i monoblastičnoj leukemiji, te u dijelu blasta u akutnoj mijelo-monocitnoj leukemiji (7, 9, 10).

### **1.1.8. Imunofenotipizacija**

Iako se citološka analiza nadopunjuje citokemijskom analizom pri morfološkoj dijagnostici, imunofenotipizacija je temeljni dijagnostički test koji dokazuje podrijetlo nezrelih stanica, a ujedno ima i prognostičko značenje jer razlikovanjem stupnja diferencijacije može izdvojiti nezreli podtip leukemije nepovoljnije prognoze (7).

Tom se metodom na membrani ili u citoplazmi stanica otkrivaju specifični biljezi iz skupine leukocitnih diferencijacijskih antigena (LDA) pomoću monoklonskih protutijela. U načelu, imunofenotipske značajke leukemijskih stanica se uspoređuju s imunofenotipom normalnih krvotvornih stanica. Na taj je način omogućena identifikacija stanične loze i njihov stadij diferencijacije i maturacije.

Njezina uloga se očituje u razlikovanju AML od ALL i leukemija nejasnog podrijetla, a potom u razlikovanju T-ALL od B-ALL. Posebno mjesto zauzima u dijagnostici akutnih mješovitih leukemija koje još uvijek predstavljaju složen klinički entitet bez jasnih terapijskih smjernica. Osim navedenoga, metoda je izbora u određivanju minimalne ostatne bolesti (engl. minimal residual disease, MRD) tj. praćenju odgovora na terapiju (11).

### **1.1.9. Citogenetika**

Napretkom citogenetskih tehnika omogućeno je lakše i jednostavnije prepoznavanje kromosomskih promjena (abercija) u leukemijskim stanicama oboljele djece. Kromosomske promjene općenito se mogu podijeliti u numeričke i strukturne promjene. U pacijenata se često nalaze i kompleksne aberacije koje podrazumijevaju istovremenu prisutnost numeričkih i strukturnih promjena. Numeričke aberacije karakteriziraju promjene u broju kromosoma tj. bilo kakva odstupanja od normalnog broja kromosoma (2n). Stoga, razlikujemo hiperploidiiju (višak) i hipoploidiiju (manjak) kromosoma. Strukturne promjene najčešće uključuju translokacije kromosoma.

Danas se numeričkim i strukturnim promjenama kromosoma pridaje velika važnost u dijagnozi i odabiru terapije AL. Naime, obje kategorije imaju prognostičko značenje, pa je tako hiperploidija povezana s boljom prognozom dok su hipoploidija i kromosomske translokacije znaci nepovoljne prognoze (12, 13). Citogenetske promjene su prisutne u više od 85% ALL dječje dobi (8).

### **1.1.10. Subklasifikacija akutnih leukemija**

S obzirom na to da su akutne leukemije vrlo heterogene bolesti, prije početka liječenja potrebno ih je precizno klasificirati prema podtipovima leukemija.

#### *1.1.10.1. FAB – klasifikacija*

Jedna od klasifikacija koja nije više u kliničkoj upotrebi ponajviše zbog nedostatka prognostičkog značenja je FAB klasifikacija (French-American-British Cooperativne Study Group). FAB klasifikacija se temeljila na citomorfološkim i citokemijskim značajkama nezrelih stanica. Citomorfološki kriteriji uključivali su: veličinu stanice, količinu i bazofiliju citoplazme, izgled kromatina te oblik jezgre i nukleola. Ova klasifikacija razlikovala je osam oblika akutne mijeloične leukemije: M0 (AML minimalno diferencirana); M1 (AML bez sazrijevanja); M2 (AML sa sazrijevanjem); M3 tip (akutna promijelocitna leukemija); M4 (akutna mijelomonocitna leukemija); M5 (akutna monocitna leukemija); M6 (akutna eritroleukemija); i M7 (akutna megakariocitna leukemija). Kod akutne limfoblastične leukemije razlikovala je tri osnovna oblika: L1, L2 i L3 (6).

FAB klasifikacija mijeloičnih leukemija danas je dio klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije u kategoriji Akutnih mijeloičnih leukemija, NOS (eng. Not otherwise specified) (4).

### 1.1.10.2. WHO – klasifikacija

Najnovija klasifikacija prema Svjetsko Zdravstvenoj Organizaciji - WHO klasifikacija temelji se na citokemijskim, citomorfološkim, imunofenotipskim, molekularnima i citogenetičkim obilježjima malignih stanica što zajedno pridonosi njezinom prognostičkom značenju. To se osobito odnosi na citogenetičke promjene za koje je dokazano da imaju izrazit prediktivni/prognostički značaj za ishod i tijek bolesti. WHO – klasifikacija leukemije dijeli se na; 1. akutne mijeloblastične leukemije; 2. prekursorske limfoidne neoplazme - limfoblastične leukemije/limfome; i 3. akutne leukemije nejasnog podrijetla.

Podjela prema SZO-u razlikuje 4 skupine AML-a: 1. AML s povratnim genskim promjenama; 2. AML sa znakovima mijelodisplazije; 3. AML nakon terapije; i 4. AML koje nisu svrstane drugamo. Leukemijska masa koja ju određuje je prisutnost 20% i više blasta u koštanoj srži. Prekursorske limfoidne neoplazme podijeljene su u limfoblastične leukemije/limfome NOS i leukemije/limfome s rekurentnim genetskim abnormalnostima (4).

Imunofenotipizacijom akutnu limfoblastičnu leukemiju možemo prema podrijetlu podijeliti u T- limfoblastični oblik (T-ALL) i B- limfoblastični oblik (B-ALL). Najučestaliji oblik je B - akutna limfoblastična leukemija koja čini 85% slučajeva djece oboljelih od ALL (4,11).

Akutne leukemije neodređene loze odnosno akutne leukemije nejasnog podrijetla na temelju morfoloških obilježja ili drugih biljega nije moguće svrstati u skupinu AML ili ALL. Razlikuju se dvije skupine. Prva je nediferencirana akutna leukemija (ANL, engl. acute undifferentiated leukemia, AUL), a druga akutna leukemija miješanog fenotipa. Akutne leukemije miješanog fenotipa dijele se u dvije podskupine: 1. akutne leukemije različitih loza koje sadrže više od jedne populacije leukemijskih stanica pri čemu svaka od njih ima različit imunofenotip i pripadnost različitoj mijeloidnoj i/ili limfoidnoj lozi; i 2. bifenotipske akutne leukemije s izražajem biljega dviju ili više krvotvornih loza na jednoj leukemijskoj populaciji stanica (4,7).

### 1.1.11. Liječenje

Prije početka liječenja osnovno je učiniti kompletnu hematološku, kliničku, citološku, imunološku, molekularnu i citogenetičku dijagnostiku i na taj način postaviti konačnu dijagnozu. Svi dobiveni parametri važni su za prognozu, terapiju i praćenje tijeka bolesti.

U liječenju akutnih leukemija primjenjuju se: kemoterapija, radioterapija, imunoterapija i ciljana terapija (direktno djelovanje na molekularnu promjenu u leukemijskom klonu koja je odgovorna za zloćudni rast) te transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) (3,7).

Liječenje se vrši prema terapijskim protokolima u kojima su definirane doze lijekova, njihovo vrijeme uzimanja i način primjene. Suvremeni protokoli liječenja općenito se sastoje od uvodne terapije i terapije u remisiji. Uvodnom terapijom tzv. faza indukcije remisije, nastoji se u što kraćem vremenu brzo i maksimalno eliminirati leukemijske stanice te postići stanje remisije. Remisija je stanje u kojemu se normaliziraju laboratorijski nalazi (koštana srž sadrži manje od 5% blasta). Tijekom faze indukcije uvodi se profilaksa središnjeg živčanog sustava zbog mogućnosti da leukemija SŽS-a postane ishodište relapsa. Ako bolesnici u postignutoj remisiji ne nastave liječenje, u kratkom razdoblju nastupit će povrat bolesti. Stoga je nužno provoditi terapiju u remisiji. U slučaju povratka bolesti primjenjuju se protokoli za relaps bolesti i transplantacija krvotvornih matičnih stanica.

U liječenju leukemija teži se brzom postizanju kompletne hematološke i kliničke remisije, što dužem održanju remisije i u konačnici izlječenju bolesnika. Prije početka liječenja pacijenti se svrstavaju u različite skupine rizika prema prognostičkim faktorima. To čini osnovu pri određivanju stupnja intenziteta kao i trajanja liječenja koje je zbog agresivne terapije praćeno brojnim po život opasnim komplikacijama. Zahvaljujući takvom liječenju danas se postiže izlječenje u 85% djece s akutnom limfoblastičnom leukemijom i 55% djece s akutnom mijeloblastičnom leukemijom (7,14).

## **2. CILJ RADA**

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi ukupan broj djece oboljele od akutne leukemije/limfoma u dobi do 18 godina, koji su dijagnosticirani i liječeni u Kliničkom bolničkom centru Splitu.
2. Utvrditi raspodjelu ispitanika prema spolu i dobnim kategorijama.
3. Analizirati citomorfološke, citokemijske, imunofenotipizacijske i citogenetske karakteristike pri postavljanju dijagnoze.
4. Utvrditi ishod bolesti liječenih ispitanika.

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

U istraživanje su uključeni bolesnici dječje dobi (do 18 godina) kojima je dijagnosticirana akutna leukemija na Odjelu za kliničku citologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, a liječeni su na Klinici za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split.

#### **Kriteriji uključenja:**

1. Bolesnici koji su imali pozitivan citomorfološki nalaz akutne leukemije koštane srži, dijagnosticiran u razdoblju od 01.01.2014. do 31.12.2020. godine.

#### **Kriteriji isključenja:**

1. Bolesnici koji su dijagnosticirani ili liječeni u drugim ustanovama.

### **3.2. Mjesto studije**

Istraživanje je provedeno na Odjelu za kliničku citologiju Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

### **3.3. Metode prikupljanja i obrade podataka**

Kao izvor podataka za studiju, retrospektivno su korišteni citološki nalazi nakon aspiracijske punkcije koštane srži tankom iglom. Navedeni nalazi su bili dostupni u papirnatom i digitalnom obliku u arhivi Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, dok su ostali podatci bili dostupni u digitalnom obliku bolničkog informacijskog sustava.

### **3.4. Obrada i bojanje citoloških uzoraka**

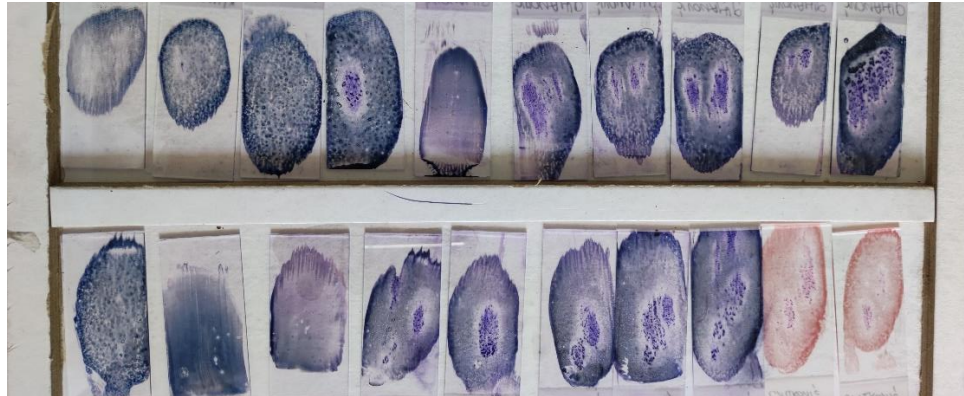
#### **3.4.1. Bojenje po May – Grunwald - Giemsi (MGG)**

Tehnika bojenja po MGG metodi koristi se za morfološku analizu stanica (Slika 2-6). Prije samog bojenja potrebno je razmaze fiksirati sušenjem na zraku. Pri bojenju koriste se dvije boje: May Grunwald otopina (sadrži plavu boju, eozin–metilen) i 10%-tna otopina Giemsa (sadrži metilen-plavi klorid, azuroII eozinat boju te eozin–metilen-plavu boju).

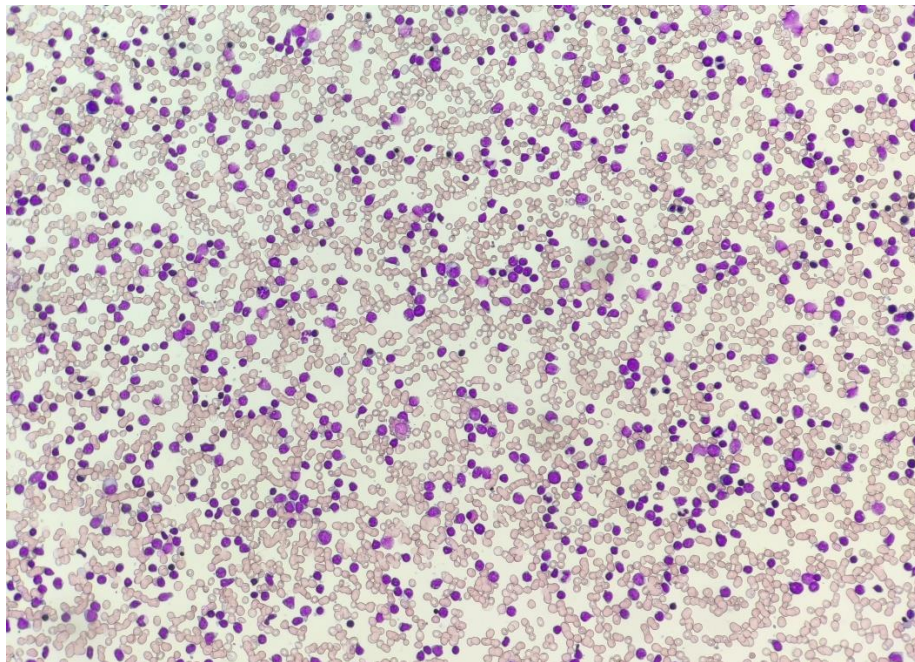
Postupak bojenja nakon fiksiranja razmaza (prema protokolu Odjela za citologiju KBC Split):

- |                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| 1. Otopina May Grünwald         | 5 minuta       |
| 2. Ispiranje destiliranom vodom | 1 minuta       |
| 3. 10% otopina Giemsa           | 15 – 20 minuta |
| 4. Ispiranje destiliranom vodom | 1 - 2 minute   |
| 5. Sušenje preparata na zraku   |                |

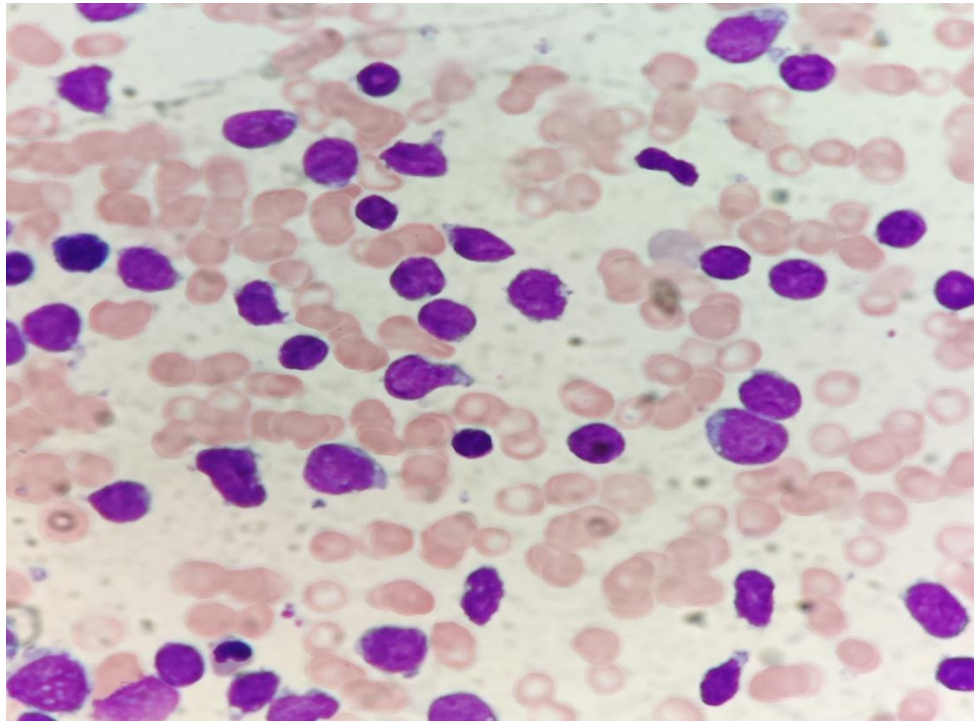




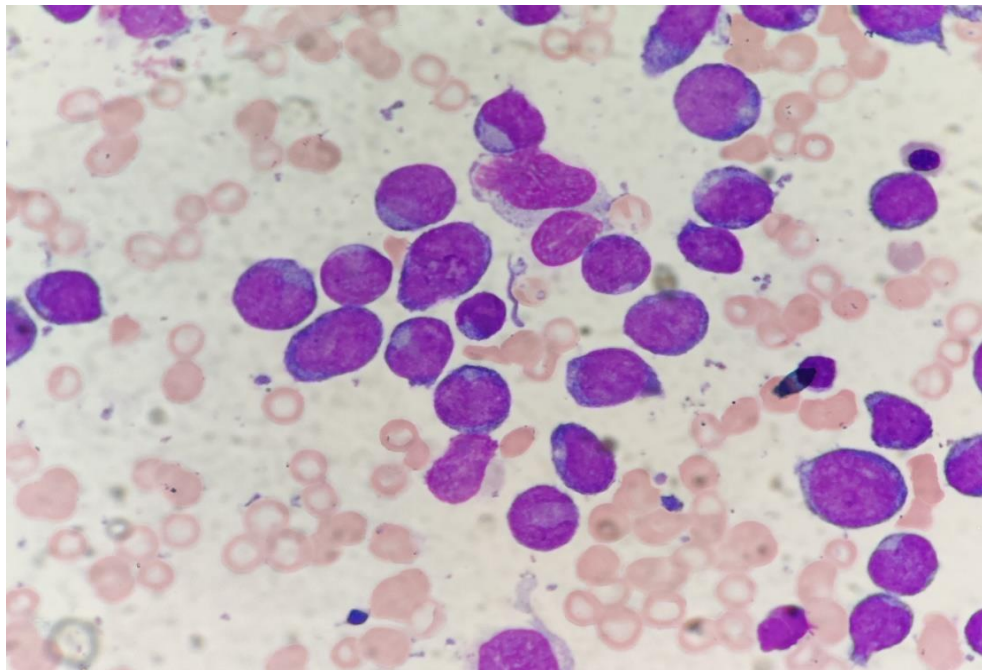
*Slika 2. Razmazi koštane srži bojeni MGG metodom*



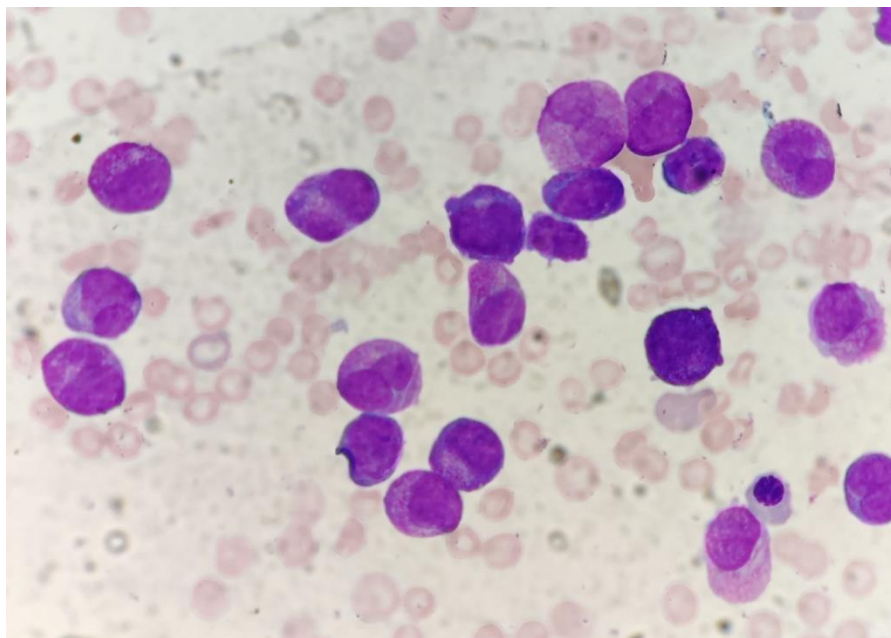
*Slika 3. Morfološka dijagnoza akutne leukemije, više od 20% blasta (x20)*



*Slika 4. Citomorfološka slika limfoblata, "hand mirror"- ALL (x100)*



*Slika 5. Citomorfološka slika mijeloblata - AML (x100)*



*Slika 6. Citomorfološka slika AML-M3; promijelocitna leukemija (x100)*

### **3.4.2. Citokemijsko bojenje**

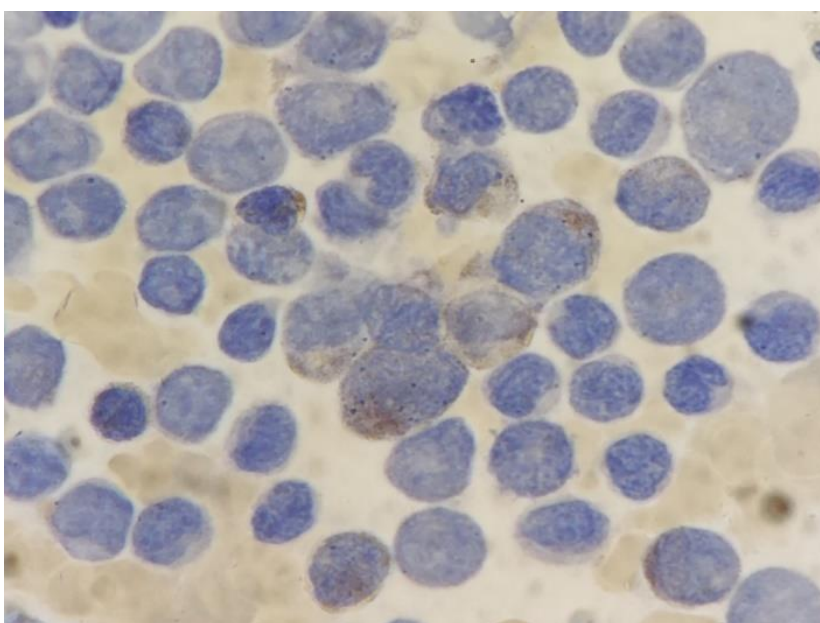
Za vrijeme citokemijskih bojenja potrebno je držati se mjera Zaštite na radu i Zaštita okoliša. Korištene otopine i otopine kojima je istekao rok valjanosti moraju se zbrinuti kao poseban otpad u skladu s nacionalnim smjernicama zbog opasnosti za ljudsko zdravlje.

*Priprema preparata za citokemijsko bojenje:*

- Preparat koštane srži pripremiti da bude tanak i suh (sušiti preparat min. 30 minuta).
- Preparat fiksirati na slijedeći način:
  1. Fiksirati preparat nanošenjem LeukoGnost Fiksativa (1-2 mL) na preparat 1-3minute
  2. Preparat isprati u destiliranoj vodi 10 sekundi
  3. Osušiti preparat na zraku

### 3.4.2.1. Mijeloperoksidaza (*LeukoGnost MPO*)

Metoda se temelji na sposobnosti stanične mijeloperoksidaze da katalizira redukciju vodikovog peroksida pri čemu nastaje voda i kisik koji oksidira 4-kloro-1-naftol što dovodi do stvaranja tamno-plavih do smeđe-crnih precipitata na mjestu aktivne peroksidaze (Slika 7).



*Slika 7. Pozitivne smeđe granule u pojedinim blastima - POX pozitivno bojenje (x100)*

Priprema otopine za bojenje:

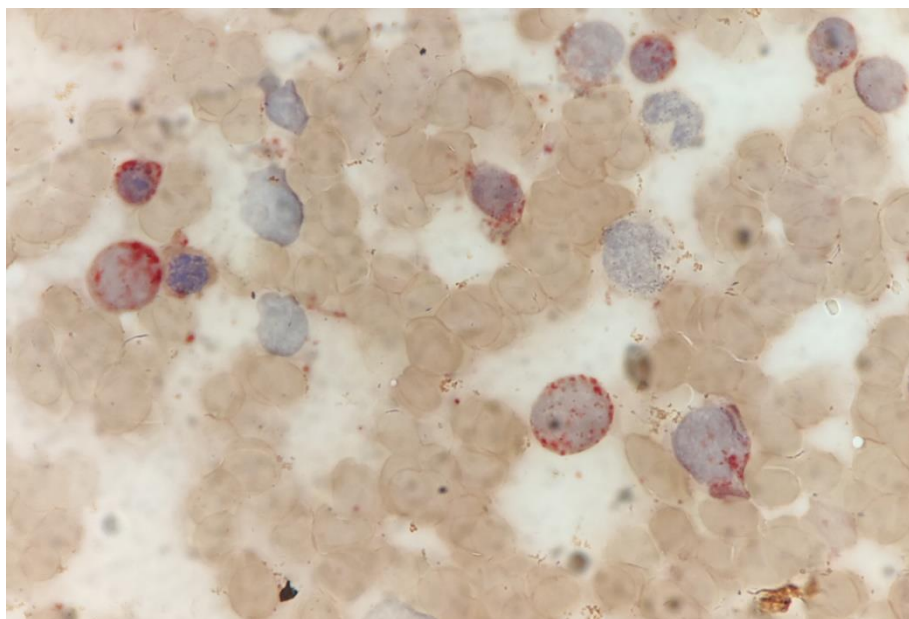
- *LeukoGnost MPO* - komplet za detekciju aktivnosti mijeloperoksidaze u leukocitima.
- Komplet sadrži: Reagens 1 (MPO pufer); Reagens 2 (MPO supstrat); i Reagens 3 (Vodikov peroksid, otopina).
- Potrebno je u čistoj epruveti pomiješati Reagens 1 i Reagens 2. Zatim u tu mješavinu dodati Reagens 3.

*Postupak bojenja uzorka:*

- |   |        |
|---|--------|
| 1. Na prethodno pripremljeni preparat nanijeti otopinu za bojenje (1-2mL) | 10 min |
| 2. Snažno isprati u destiliranoj vodi                                     | 10 sek |
| 3. Obojati preparat LeukoGnost HEM reagensom                              | 2 min  |
| 4. Ispirati preparat pod tekućom vodovodnom vodom                         | 2 min  |
| 5. Osušiti preparat na zraku  |        |

#### *3.4.2.2. Nespecifična esteraza (alfa-naftil-acetat esteraza, ANAE) (LeukoGnost NSE)*

Metoda se temelji na sposobnosti stanične esteraze da hidrolizira 1- naftil acetat. U toj reakciji nastaje slobodni naftol koji u reakciji s diazo solima stvara netopivi crveno-smeđi precipitat na mjestu reakcije (Slika 8).



*Slika 8. Pozitivne crveno smeđe granule u pojedinim blastima – ANAE pozitivno bojenje (x100)*

#### *Priprema otopine za bojenje:*

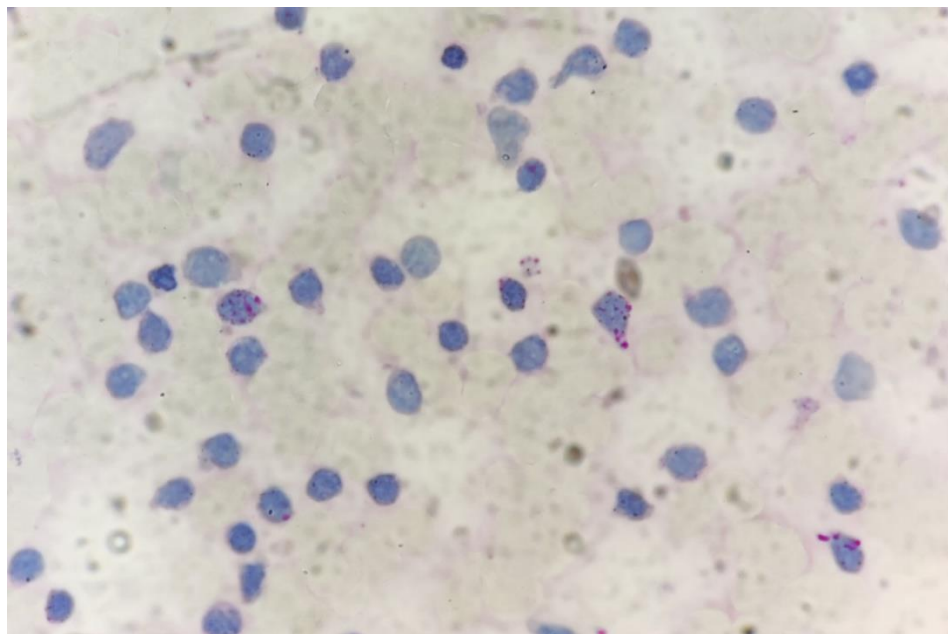
- LeukoGnost NSE- komplet za detekciju aktivnosti nespecifične esteraze u leukocitima.
- Komplet sadrži: Reagens 1 (Natrijev nitrit, otopina); Reagens 2 (Pararosanilin, otopina); Reagens 3 (NSE pufer); Reagens 4 (NSE supstrat); i Reagens 5 (NSE inhibitor).
- Potrebno je pomiješati Reagens 1 i Reagens 2 u čistoj epruveti 2 minute. Zatim dodati Reagens 3 i Reagens 4. U slučaju inhibicije dodati Reagens 5 na kraju.

#### *Postupak bojenja uzorka:*

- |   |                |
|---|----------------|
| 1. Nanijeti otopinu za bojenje na prethodno pripremljeni preparat | 1 sat i 30 min |
| 2. Snažno isprati u destiliranoj vodi                             | 10 sek         |
| 3. Obojiti preparat LeukoGnost HEM reagensom                      | 15 min         |
| 4. Isprati preparat pod tekućom vodovodnom vodom                  | 2 min          |
| 5. Osušiti preparat na zraku                                      |                |

#### *3.4.2.3. PAS metoda (LeukoGnost PAS)*

Princip ove metode temelji se na reakciji oksidacije unutarstaničnih glikogena i neutralnih mukopolisaharida u prisutnosti perjodne kiseline i Schiffovog reagensa. Molekule s glikolnim grupama pod utjecajem perjodne kiseline stvaraju aldehide na koje djeluje Schiffov reagens i boji ih u intenzivnu magenta boju (Slika 9).



*Slika 9. Pozitivne crvene globule u pojedinim blastima- PAS pozitivno bojenje (x100)*

*Priprema otopine za bojenje:*

- LeukoGnost PAS- komplet za detekciju reakcije prejdne i Schiff-ovog reagensa u leukocitima.
- Komplet sadrži: Reagens 1 (Perjodna kiselina, LeukoGnost); Reagens 2 (Natrijev metabisulfit, LKG otopina); Reagens 3 (HCL reagens, LeukoGnost PAS); i Reagens 4 (BioSchiff Forte).
- Potrebno je pripremiti sulfitnu otopinu: u čistoj epruveti pomiješati Reagens 2 i 3 zatim dodati destiliranu vodu.

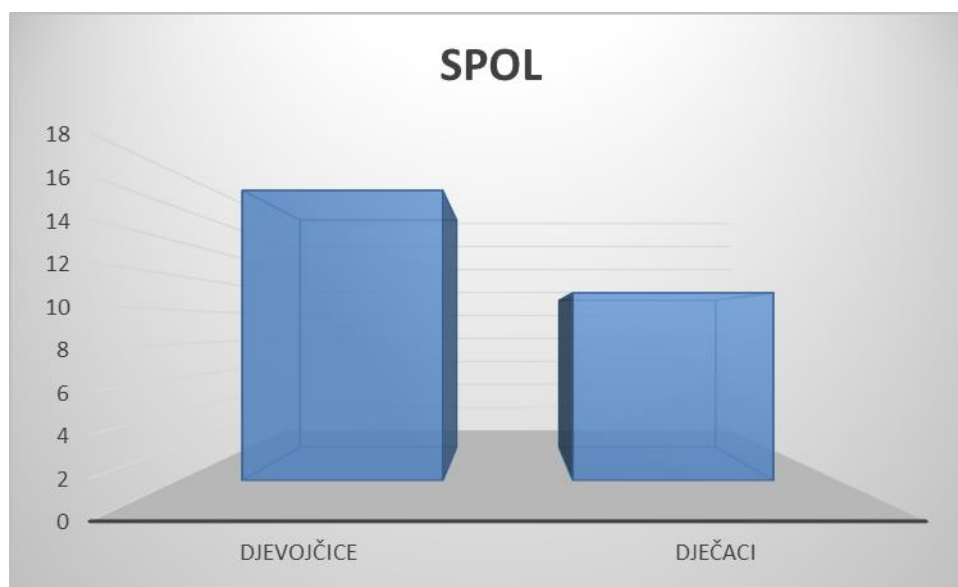
*Postupak bojenja uzorka:*

- |   |            |
|---|------------|
| 1. Nanijeti Reagens 1 (1-2 mL) na preparat        | 10 minuta  |
| 2. Isprati preparat u tekućoj vodovodnoj vodi     | 10 sekundi |
| 3. Nanijeti sulfitnu otopinu (1-2 mL) na preparat | 1 minuta   |
| 4. Nanijeti Reagens 4 (1-2 mL) na preparat        | 15 minuta  |
| 5. Isprati preparat u tekućoj vodovodnoj vodi     | 10 sekundi |
| 6. Nanijeti sulfitnu otopinu (1-2 mL) na preparat | 3 minute   |
| 7. Isprati preparat u tekućoj vodovodnoj vodi     | 3 minute   |
| 8. Obojati preparat LeukoGnost HEM reagensom      | 3 minute   |
| 9. Ispirati preparat pod tekućom vodovodnom vodom | 3 minute   |
| 10. Osušiti preparat na zraku                     |            |



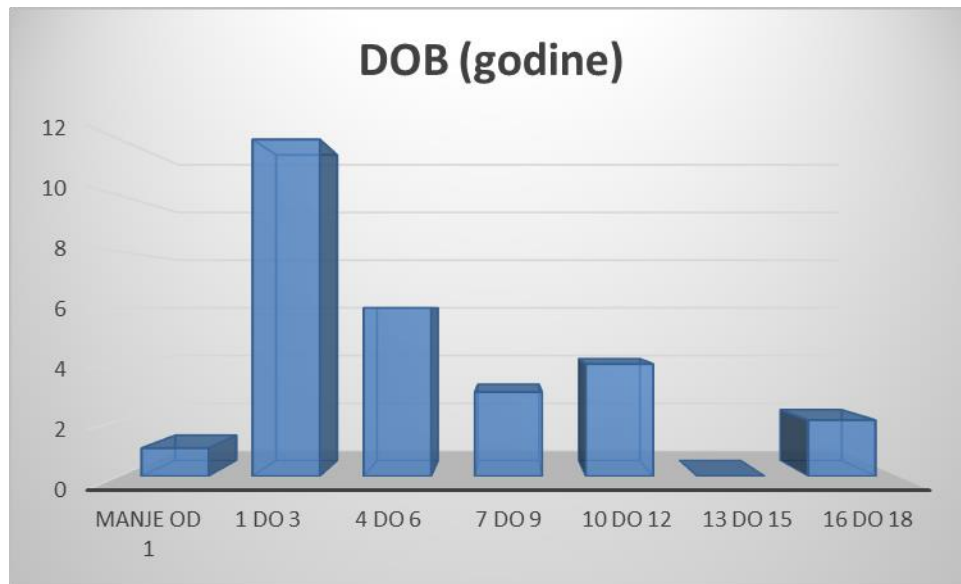
## 4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 28 ispitanika dječje dobi kojima je dijagnosticirana akutna leukemija na Odjelu za kliničku citologiju, a liječeni su na Klinici za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split, u razdoblju od 01.01.2014. do 31.12.2020. godine. Od ukupnog broja pacijenata, liječeno je 17/28 (61%) djevojčica i 11/26 (39%) dječaka (Slika 10).



*Slika 10. Razdioba po spolu ispitanika s dijagnosticiranom hematološkom bolesti*

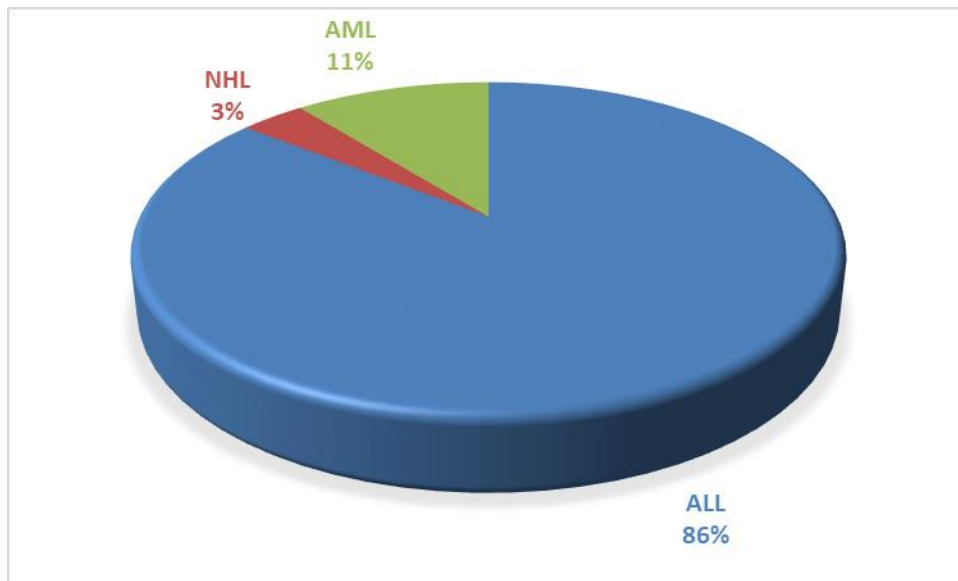
Medijan životne dobi ispitanika je 3 godine (min-max, 3 mjeseca - 17 godina i 7 mjeseci). Najveći broj liječene djece je u dobnoj skupini od 1 do 3 godine (12/26; 46%). Najmlađi pacijent je dojenče starosti 3 mjeseca (Slika 11).



*Slika 11. Razdioba po dobnim kategorijama*

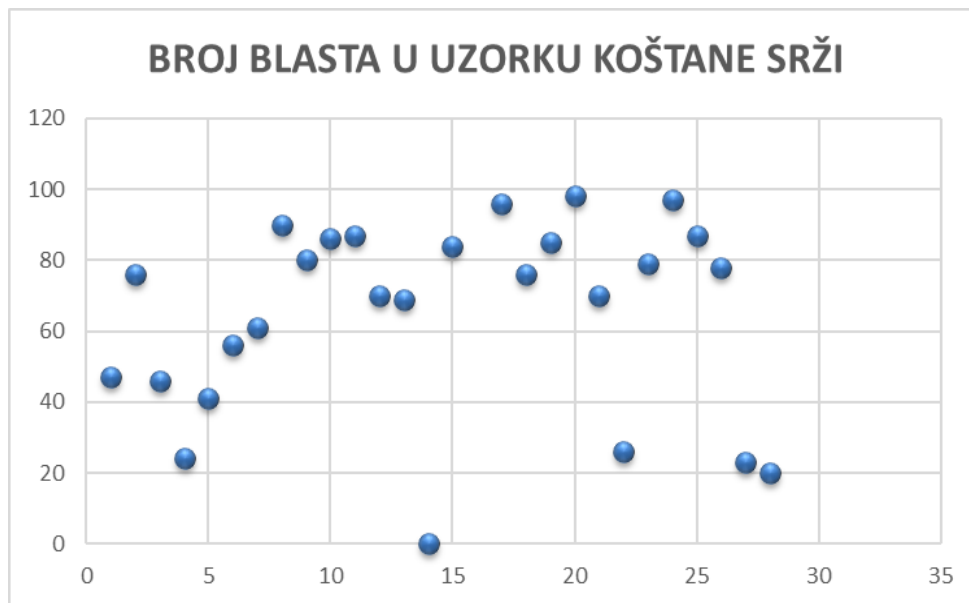
U 24/28 (86%) ispitanika dijagnosticirana je akutna limfoblastična leukemija, u jedne ispitanice anaplastični velikostanični T non-Hodgkin limfom (T-ALCL) te u 3/28 (11%) ispitanika akutna mijeloična leukemija (Slika 12). U jedne ispitanice postavljena je dijagnoza promijelocitne leukemije (M3).

Među dijagnosticiranim limfoblastičnim leukemijama dominira akutna limfoblastična leukemija B imunofenotipa u 23/24 (96%) ispitanika i to common-B ALL u 21/23 (91%) ispitanika. U 2/23 (9%) ispitanika dijagnosticiran pre-B ALL imunofenotip.



*Slika 12. Razdioba prema dijagnozi*

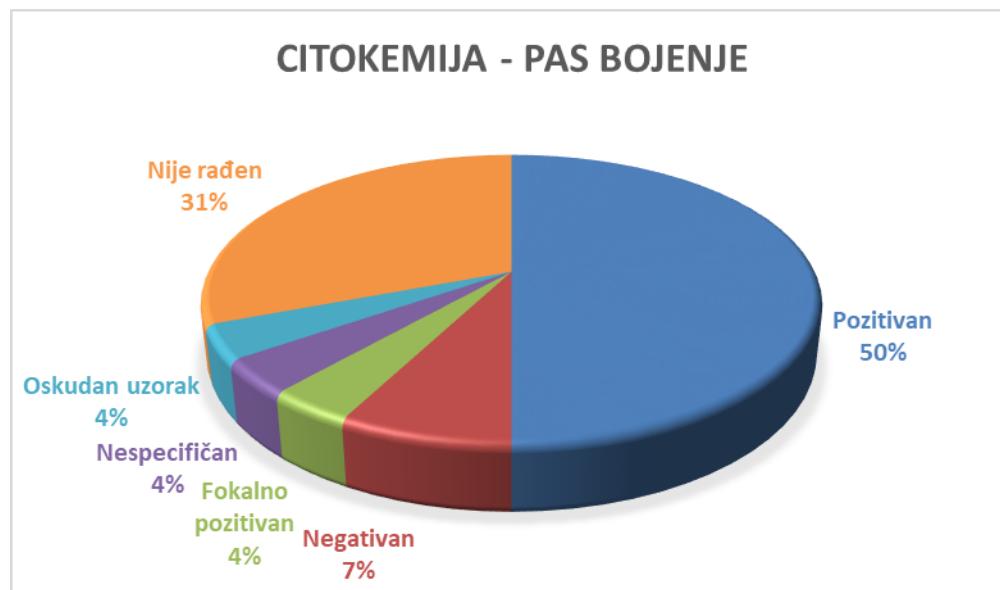
Na Slici 13 prikazana je radioba postotka blasta pri citomorfološkoj analizi i diferenciranju uzoraka koštane srži. Prosječan broj blasta po uzorku koštane srži je 64% (min-max, 24-98).



*Slika 13. Udio blasta u diferenciranju stanica koštane srži*

Nakon citomorfološke analize uzoraka koštane srži, u 20/28 (71%) ispitanika učinjena je dodatna citokemijska analiza.

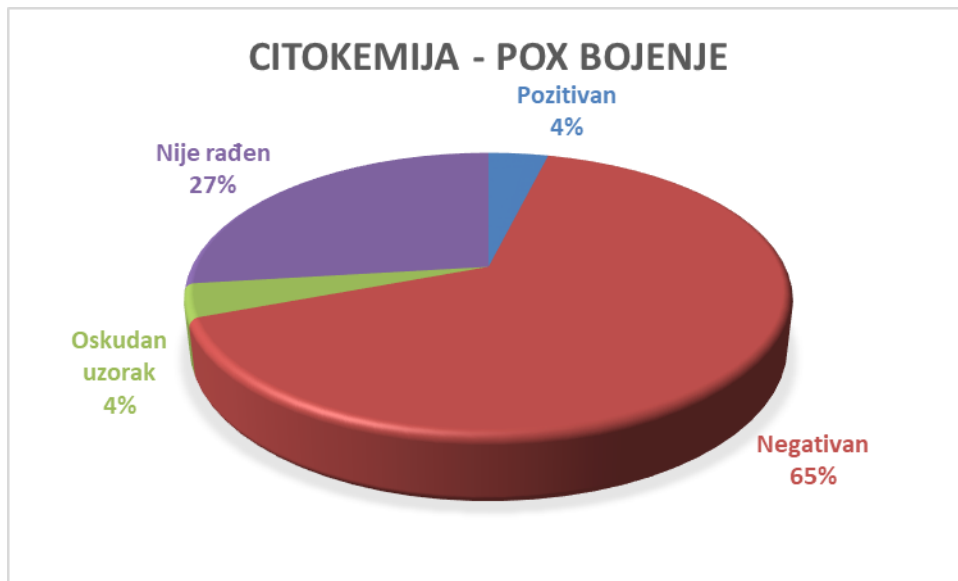
PAS pozitivni blasti prisutni su u 50% uzoraka bojenih PAS metodom, dok je fokalna pozitivnost uočena u 4% uzoraka (Slika 14).



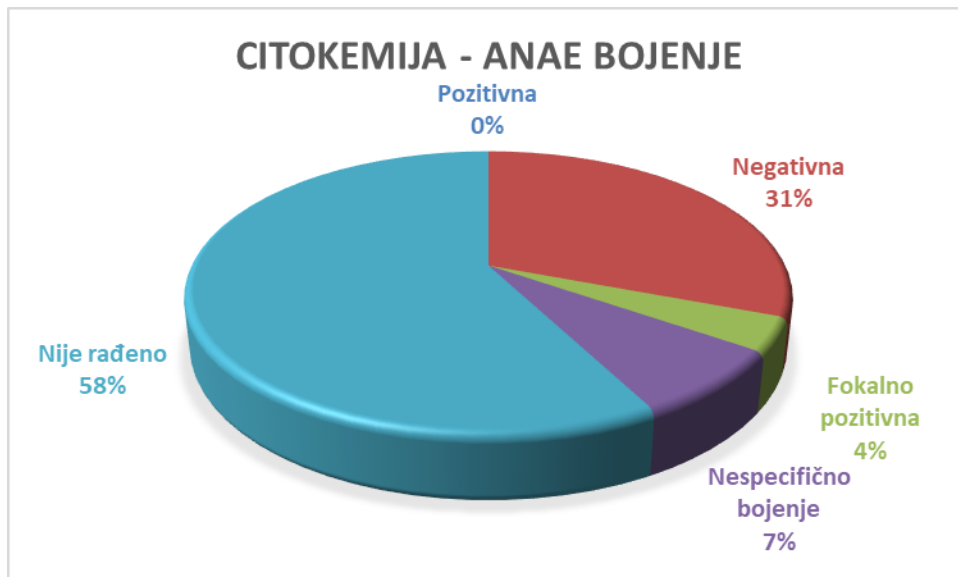
*Slika 14. Razdioba uzoraka prema PAS citokemijskom bojenju*

Mijeloperoksidaza (POX) pozitivni blasti prisutni su u 4% uzoraka bojenih POX metodom (Slika 15), dok su POX negativni blasti dijagnosticirani u 65% uzoraka.

Samo fokalno pozitivno bojenje na ANAE prisutno u jednog (4%) ispitanika u kojih je primjenjeno ANAE citokemijsko bojenje (Slika 16). Negativni ANAE blasti prisutni su u 31% uzoraka.

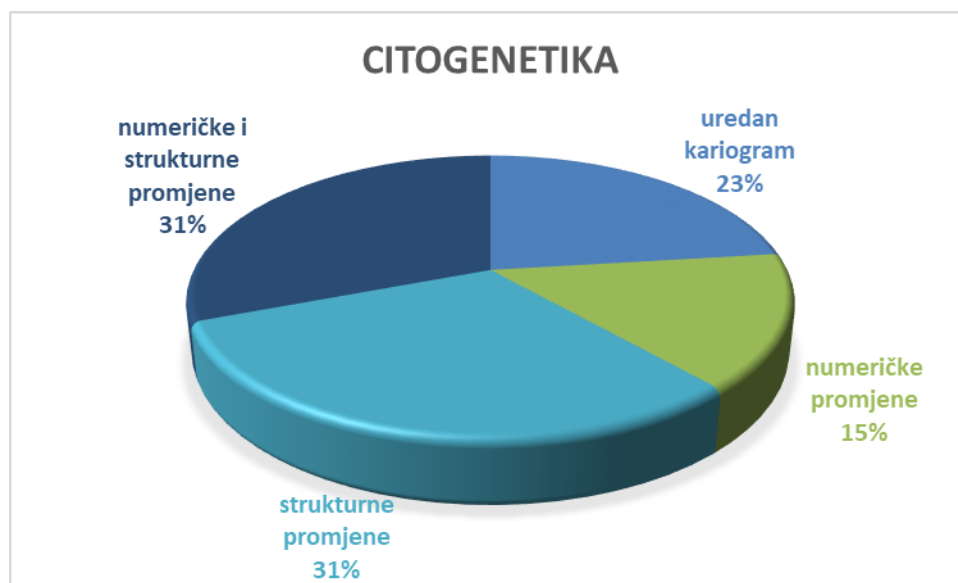


Slika 15. Razdioba uzoraka prema POX citokemijskom bojenju



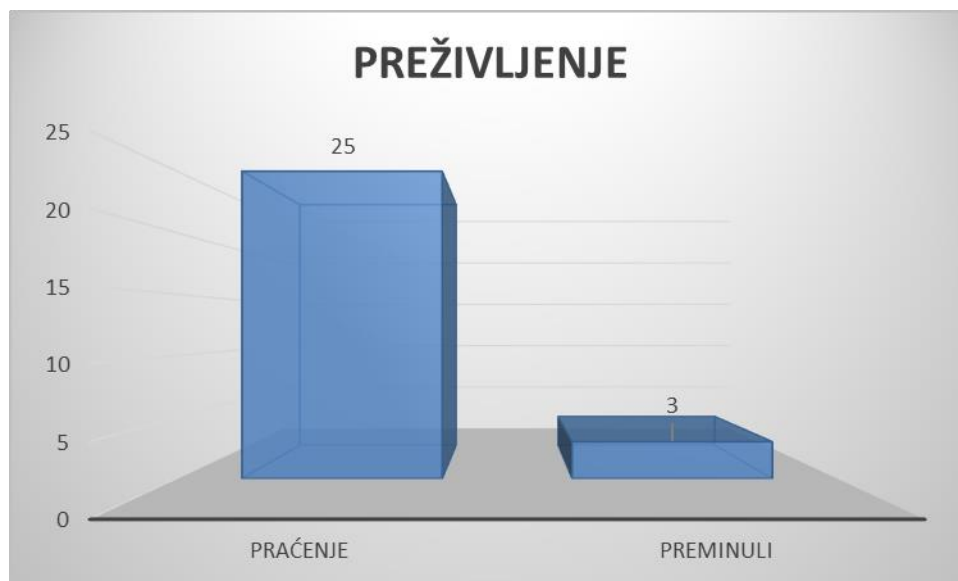
Slika 16. Razdioba uzoraka prema ANAE citokemijskom bojenju

Citogenetskom analizom uredan kariogram prisutan je u 6/28 (23%) ispitanika dok je 8/28 (31%) ispitanika imalo i strukturne i numeričke promjene u kariogramu (Slika 17).



*Slika 17. Raspodjela citogenetskih nalaza ispitanika*

U 25/28 (89%) pacijenata nakon primijenjenog liječenja na Klinici za dječje bolesti KBC Split postignuta je remisija (Slika 18).



*Slika 18. Razdioba ispitanika prema ishodu liječenja*

## 6. RASPRAVA

Akutne leukemije su najčešća skupina malignih bolesti u djece. Godišnje se na 1.000.000. djece otkrije 35-50 novodijagnosticiranih slučajeva (5,6). Najveći broj leukemija spada u kategoriju limfoblastičnih leukemija i u 75% slučajeva javljaju se u djece mlađe od 6 godina, dok je dječja akutna mijeloična leukemija rijetka bolest s incidencijom od 7 na 1.000.000 djece mlađih od 15 godina. Prognoza u djece bolja je nego u odraslih zbog većeg udjela dobrih prognostičkih genetskih parametara i bolje podnošljivosti intenzivne terapije. Kompletna remisija bolesti se dostiže u 90% slučajeva (4,13).

Prema posljednjim dostupnim podacima Registra za rak HZJZ-a, u Republici Hrvatskoj je tijekom 2019. godine dijagnosticirano 40 novih slučajeva akutne leukemije (15). U ovom istraživanju obuhvatili smo razdoblje od 01.01.2014. do 31.12.2020. godine te analizirali dostupne podatke 28 pacijenata dječje dobi koji su dijagnosticirani kao akutna leukemija na Odjelu za kliničku citologiju, a nastavili su svoje liječenje i kliničko praćenje na Klinici za dječje bolesti KBC Split. Limfoblastične leukemije činile su 86% svih slučajeva, dok je akutna mijeloična leukemija dijagnosticirana u 11% slučajeva. Rezultati istraživanja su u skladu s podacima Svjetske zdravstvene organizacije (4).

Najveća učestalost pojave akutnih leukemija je između druge i pete godine života (6). U ovom istraživanju medijan životne dobi ispitanika je 3 godine, a najveći broj liječene djece je u dobnoj skupini od 1 do 3 godine i to 61% djevojčica i 39% dječaka. Spolna razdioba se ne može interpretirati u skladu s podacima o nešto većoj incidenciji u dječaka (5) jer istraživanje nije uključivalo sve dijagnosticirane pacijente nego pacijente koji su svoje liječenje i praćenje nastavili na Klinici za dječje bolesti KBC Split. Prema podacima Registra za rak HZJZ-a, stopa incidencije raka na 100.000 stanovnika po spolu, dobi te primarnom sijelu – RH 2019. za limfatične leukemije nešto je veća u djevojčica u odnosu na dječake (10,1 u odnosu na 9,6 u dobnoj skupini 0-4 godine, 5,2 u odnosu na 3,9 u skupini 5-9 godina te 3,1 u odnosu na 1,9 u skupini 10-14 godina) (15).

Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije, nalaz više od 20 % blasta u AML, odnosno 25% blasta u ALL unutar 500 stanica s jezgrom u razmazu koštane srži, smatra se akutnom leukemijom (4). U ovom istraživanju, prosječan broj blasta po uzorku koštane srži je 64% (min-max, 24-98). Također, postotak blasta u limfoblastičnim leukemijama viši je od onog u mijeloičnim leukemijama (71% u odnosu na 40%). Morfološka analiza kojom je postavljena dijagnoza akutne leukemije, nadopunjena je u ukupno 64% slučajeva citokemijskom analizom. Reakcija mijeloperoksidaze, ovisno o podtipu AML i zrelosti leukemijskih stanica može biti negativna, pozitivna u minimalnom postotku blasta ili izrazito pozitivna u promijelocitnoj leukemiji (4). U blastima iz ovog istraživanja, POX bojenje bilo je negativno ili fokalno pozitivno, dok je kod promijelocitne leukemije morfološka slika bila tipična i prepoznatljiva s brojnim atipičnim mijelocitima i Auerovim štapićima pa se od citokemijske analize odustalo. U većini slučajeva monoblasti i promonociti pokazuju intenzivno ANAE bojenje dok su monoblasti POX negativni (4). U ovom istraživanju, u samo jednom AML uzorku prisutan je fokalni pozitivitet. Limfoblasti mogu biti PAS negativni ili pozitivni, najčešće u formi grubih granula. MPO su negativni, a mogu reagirati s nespecifičnom esterazom u obliku multifokalnih punktata s varijabilnom inhibicijom (4). U ovom istraživanju PAS pozitivitet bio je prisutan u 50% blasta.

Imunofenotipizacijom limfoblastičnu leukemiju možemo prema podrijetlu podijeliti u T- limfoblastični oblik (T-ALL) i B- limfoblastični oblik (B-ALL). Najučestaliji oblik je B- limfoblastična leukemija koja čini 85% slučajeva oboljele djece s ALL (4,11). U ovom istraživanju dominira akutna limfoblastična leukemija B imunofenotipa u 96% ispitanika i to common-B imunofenotipa u 91% ispitanika. U 9% ispitanika dijagnosticiran je pre-B ALL imunofenotip. T-ALL čine oko 15% dječjih leukemija i češće su u adolescenata muškog spola (4). U ovom istraživanju samo jedno dijete dijagnosticirano je kao T-ALL i to djevojčica u dobi od 3 godine i 6 mjeseci.

Numeričkim i strukturnim promjenama kromosoma pridaje se veliko prognostičko značenje pri čemu je utvrđeno da bolesnici s navedenim promjenama imaju lošiju prognozu. Danas su strukturne i numeričke abnormalnosti kromosoma prisutne u više od 85% oboljele djece s akutnom limfoblastičnom leukemijom (8). Analizirajući citogenetske nalaze, utvrdili



smo da je u 77% pacijenata u ovom istraživanju prisutan aberantni kariotip što je u skladu, iako u nešto manjem postotku, s istraživanjem Roganović i sur. (8).

Intenzitet i trajanje terapije leukemije temelji se na prognozi. Nakon uvodne terapije i postignute remisije provodi se terapija u remisiji. Daljnji pristup liječenju uključuje kemoterapijsku konsolidaciju te autolognu ili alogenu transplantaciju. Standardni terapijski pristup je i profilaksa SŽS (7). Zahvaljujući terapiji značajno je produžen život pacijenata s ALL, a petogodišnje preživljenje za dob mlađu od 20 godina dostiže 89% (16). Preživljenje djece s akutnom mijeloičnom leukemijom iznosi 50-70% (13,14). U ovom istraživanju, nakon primijenjenog liječenja na Klinici za dječje bolesti, remisija je postignuta u 89% djece.

Citološka analiza koštane srži i razmaza periferne krvi, iako bazična metoda temeljena na morfologiji i citokemiji, prvi je korak u dijagnostičkom algoritmu temeljem koje se indiciraju dodatne imunocitokemijske, citogenetske i molekularne dijagnostičke pretrage s ciljem individualiziranog liječenja pacijenata i što boljeg ishoda bolesti.

## 7. ZAKLJUČAK

1. U Kliničkom bolničkom centru Split, u razdoblju od 01.01.2014. do 31.12.2020. godine, ukupno je dijagnosticirano i liječeno 28 pacijenata dječje dobi.
2. Od ukupnog broja oboljelih, liječeno je 39% dječaka i 61% djevojčica. Najveći broj liječene djece pripada dobnoj skupini od 1 do 3 godine (46%). Medijan životne dobi ispitanika je 3 godine. Najmlađi pacijent je dojenče starosti 3 mjeseca dok najstariji pacijent ima 17 godina i 7 mjeseci.
3. Najvećem broju pacijenata (86%) dijagnosticirana je akutna limfoblastična leukemija, dok je akutna mijeloična leukemija dijagnosticirana u 11% pacijenata. Prosječan broj blasta po uzorku koštane srži je 64%. Imunofenotipski, među dijagnosticiranim limfoblastičnim leukemijama dominira limfoblastična leukemija B imunofenotipa i to common-B ALL u 91% ispitanika. Analizom citogenetskih nalaza utvrđeno je da je 77% oboljelih ima aberantni kariotip. Kod pacijenata s aberatnim kariotipom pronađene su numeričke (15%) i strukturne (31%) promjene, dok je 31% pacijenata imalo i numeričke i strukturne promjene. Citokemijskom analizom uzoraka koštane srži PAS pozitivni blasti prisutni su u 50% analiziranih uzoraka što odgovara morfološki dijagnosticiranim predominantno limfoblastičnim leukemijama.
4. Nakon primijenjenog liječenja na Klinici za dječje bolesti KBC Split, remisija bolesti postignuta je u 98% pacijenata.

## 7. LITERATURA

1. Nakić M, Žižić V. Biljezi i citološke osobitosti tumora. MEDICUS 2001. Vol.10, No.2, 147-155.
2. Maligne bolesti u djece u Republici Hrvatskoj (2018.) Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Dostupno na: [Maligne bolesti u djece u Republici Hrvatskoj | Hrvatski zavod za javno zdravstvo \(hzjz.hr\)](#) (datum pristupa: 27.5.2022.)
3. Konja J. Pedijatrijska onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009:1-24.
4. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 2017 revised edition. International Agency for research on cancer, Lyon;2017:129- 213.
5. Bilić E, Turudić D, Jelić M. Etiologija akutnih leukemija u djece. Paediatr Croat. 2021; 65: 4-9.
6. Rajić LJ. Leukemije dječje dobi. MEDICUS 2001. Vol. 10, No. 2, 167 – 172.
7. Labar B, i sur. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 2017.
8. Roganović J. Akutna limfoblastična leukemija u djece. Medicina fluminensis 2011, Vol. 47, No. 4, p. 343-352.
9. Nakić M. Citologija – dijagnostičke i prognostičke mogućnosti u malignim bolestima djece. Paediatr Croat 2006; 50:167-175.
10. Ries S. Citomorfološka dijagnostika akutnih mijeloičnih leukemija – podjela prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji. Medicina fluminensis 2011, Vol. 47, No. 4:353-359.
11. Dubravčić K, Batinić D. Imunofenotipizacija akutnih leukemija i minimalna ostatna bolest. Paediatr Croat. 2013; 57: 258-262.

12. Davidović-Mrsić S. Prognostička vrijednost citogenetskih promjena u liječenju akutne leukemije [dissertation]. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2011.
13. Quessada J, Cuccuini W, Saultier P et al. Cytogenetics of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Current Knowledge. *Genes (Basel)*. 2021;12:924.
14. Konja J, Rajić LJ, Bilić E et al. Novosti u dijagnostici i liječenju leukemija i malignih limfoma u djece. *Paediatr Croat*. 2013; 57: 253-257.
15. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, [online] Zagreb, 2021. Dostupno na: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/12/Bilten44\\_2019.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/12/Bilten44_2019.pdf)
16. Leukemia-Acute lymphocytic-ALL:Statistics/Cancer.Net. Approved by the Cancer.Net Editorial Board, 01/2022 (06.04.2022.)

## 8. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODATCI:

Ime i prezime: Natalija Dželalija

Datum rođenja: 09.02.2001.

Mjesto rođenja: Šibenik

E-mail adresa: [natalijadzelalija619@gmail.com](mailto:natalijadzelalija619@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2007. - 2015. Osnovna škola Jakova Gotovca, Unešić

2015.-2019. Medicinska i kemijska škola Šibenik, smjer: Farmaceutski tehničar

2019.-2022. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### STRANI JEZICI:

Engleski jezik