



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Madara Kreile

AKŪTAS B LIMFOBLASTU
PRIEKŠTEČU ŠŪNU LEIKOZES
ATTĪSTĪBU UN GAITU IETEKMĒJOŠIE
ĢENĒTISKIE FAKTORI
BĒRNU VECUMĀ

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – pediatrija

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts:

Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskajā
laboratorijā, Bērnu klīniskā universitātes slimnīcā

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med. Baiba Lāce,

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Oficiālie recenzenti:

Dr. hab. med. profesore Valda Staņēviča,

Rīgas Stradiņa universitāte

Dr. biol. Zane Kalniņa,

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Dr. med. Andrejs Ivanovs,

Edinburgas universitāte, Apvienotā Karaliste

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 14. oktobrī plkst. 15.15 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. docente Jana Pavāre

SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi	5
1. IEVADS	6
1.1. Darba hipotēze	9
1.2. Darba zinātniskā novitāte	9
1.3. Darba mērķis	9
1.4. Darba uzdevumi	9
1.5. Darba praktiskā nozīme	10
2. MATERIĀLS UN METODES	11
2.1. Materiāls	11
2.2. Metodes	12
2.2.1. Ģenētisko marķieru atlase	12
2.2.2. DNS izdalīšana no venozajām asinīm	13
2.2.3. Polimerāzes ķēdes reakcija un restrikcijas fragmentu garuma alēlisko variantu analīze	13
2.2.4. Sekvenēšanas reakcijas veikšana	13
2.2.5. Kaulu smadzeņu un asins paraugu imūnhistoķīmiskā analīze	14
2.2.6. Asins parauga analīze, lai noteiktu iespējamās gēna <i>IKZF1</i> delēcijas	14
2.2.7. Datu statistiskā apstrāde	14
3. REZULTĀTI	16
3.1. Pētījumā iekļauto akūtas limfoblastu leikozes pacientu raksturojums	16
3.2. Gēnā <i>ARID5B</i> 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu analīze	17
3.3. Gēnos <i>CEBPE</i> , <i>IKZF1</i> un <i>CDKN2A</i> lokalizēto alēlisko variantu analīze	26
3.4. Gēnā <i>PAX5</i> lokalizētās ģenētiskās variācijas noteikšana	27
3.5. Gēnā <i>IL15</i> lokalizēto alēlisko variantu rs10519612, rs10519613 un rs17007695 analīze	27
3.6. Gēna alēlisko variantu analīzes rezultāti, kas lokalizēti gēnos, kuri saistīti ar ksenobiotiķu metabolismu	28
3.6.1. Gēnā <i>MDR1</i> lokalizēto alēlisko variantu rs1045642 un rs2032582 analīze	28
3.6.2. Gēnā <i>MTHFR</i> lokalizēto alēlisko variantu rs1801131 un rs1801133 analīze	29
3.6.3. Gēnā <i>NQO1</i> lokalizētā alēliskā varianta rs1800566 analīze	29
3.6.4. Delēcijas gēnos <i>GSTM1</i> un <i>GSTM1</i>	29
3.7. <i>IKZF1</i> gēna secības un Ikaros proteīna ekspresijas analīze	29

4. DISKUSIJA	35
4.1. Alēliskie varianti, kas lokalizēti gēna <i>AR1D5B</i> 3.intronā	37
4.2. Gēnos <i>CEBPE</i> , <i>IKZF1</i> un <i>CDKN2A</i> lokalizētie alēliskie varianti	40
4.3. Gēna <i>PAX5</i> ģenētiskais variants	42
4.4. Gēnā <i>IL15</i> lokalizētie alēliskie varianti rs10519612, rs10519613 un rs17007695	43
4.5. Alēliskie varianti gēnos, kas iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā.....	44
4.5.1. Gēnā <i>MDR1</i> lokalizētie alēliskie varianti rs1045642 un rs2032582	44
4.5.2. Gēnā <i>MTHFR</i> lokalizētie alēliskie varianti rs1801131 un rs1801133	45
4.5.3. Gēnu <i>GSTT1</i> un <i>GSTM1</i> delēcijas	46
4.5.4. Gēnā <i>NQO1</i> lokalizētais alēliskais variants rs1800566	47
4.6. Gēna <i>IKZF1</i> secība un proteīna ekspresijas līmenis	48
5. SECINĀJUMI	50
6. PUBLIKĀCIJAS	52
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	53

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ALL	– akūta limfoblastu leikoze
ARID5B	– AT bagātais interaktīvais domēnu 5B kodējošais gēns – (<i>AT rich interactive domain 5B</i>)
bp	– bāzu pāris
CI	– ticamības intervāls (<i>confidence interval</i>)
CV	– <i>consensus</i> varbūtība
DN	– dominanti negatīvs
DNS	– dezoksiribonukleīnskābe
ESE	– eksona splaisinga <i>enhancers</i>
GWAS	– genoma plaši asociāciju pētījumi (<i>genome wide association studies</i>)
IKZF1	– Ikaros saimes cinka pirkstu 1 kodējošais gēns (<i>Ikaros family zinc finger 1</i>)
IL	– interleikīns
LD	– nelīdzsvarotā saistība (<i>linkage disequilibrium</i>)
MAF	– retāk sastopamās alēles biežums (<i>minor allele frequency</i>)
MDR1	– P glikoproteīnu kodējošais gēns (<i>multi drug resistance gene</i>)
MĢZL	– Medicīniskās ģenētikas zinātniskā laboratorija
MLPA	– multipleksā ligācijas atkarīgā zondes amplifikācija (<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
MRD	– minimālā reziduālā slimība
OR	– izredžu attiecība (<i>odds ratio</i>)
PCR	– polimerāzes ķēdes reakcija (<i>polymerase chain reaction</i>)
r^2	– korelācijas koeficients
RR	– relatīvais risks
χ^2	– Hī kvadrāts

1. IEVADS

Hematopoēze ir daudzpakāpju process, kura rezultātā attīstās asins un imūnās sistēmas šūnas. Ikaros, kuru kodē gēns *IKZF1*, un Ikaros saimes cinka pirkstu transkripcijas faktoriem ir izšķiroša nozīme hematopoēzē, galvenokārt, limfoīdās rindas, nodrošinot šūnu diferenciāciju, homeostāzi un funkciju (Payne *et al.*, 2011). Pelēm, kurām ir heterozigotiska mutācija Ikaros proteīnu kodējošā gēnā, laika posmā no trīs līdz sešu mēnešu vecumam, heterozigotitātes zuduma rezultātā, attīstījās ar dzīvi nesavienojama leukēmija un limfoma (Winandy *et al.*, 1995).

Akūta limfoblastu leikoze (ALL) ir visbiežāk sastopamā ļaundabīgā slimība bērnu vecumā (Hunger *et al.*, 2013). Biežākais ALL apakštips ir B limfocītu priekšteču ALL un sastāda apmēram 80% no visiem ALL gadījumiem (Urayama *et al.*, 2013). Saslimšanas pīķi parasti vēro vecumā no diviem līdz pieciem gadiem (Seghatoleslam *et al.*, 2012). Ikgadējā ALL incidence ir 1 – 4,75 saslimšanas gadījumiem uz 100 000 bērniem vecumā līdz 15 gadiem (Redaelli *et al.*, 2005). ALL biežāk sastop zēniem, aprēķinātā sastopamības biežuma attiecība starp zēniem un meitenēm Amerikas Savienotajās valstīs ir 1,35 : 1 (Siegel *et al.*, 2014).

Neskatoties uz plašajiem pētījumiem, ALL etioloģija joprojām nav skaidra (Nousome *et al.*, 2013). Mazāk nekā 5% gadījumu ALL saistās ar ģenētiskiem sindromiem (Pui *et al.*, 2008).

Uzskata, ka akūtas limfoblastu leikozes attīstība ir saistīta ar ģenētiskiem bojājumiem, kas rodas T vai B leikocītu priekšteču šūnās, kas noved pie to neierobežotas pašatjaunošanās un/vai tādām ģenētiskām izmaiņām, kas noved pie tālākas diferenciācijas apstāšanās (Mullighan, 2012).

Pētnieki ir identificējuši vairāk nekā 50 reģionus, kuros var rasties DNS kopiju skaita izmaiņas. Apmēram 60% gadījumu pre-B šūnu ALL konstatēto izmaiņu skar gēnus – *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* un *LEF1*, kuri ir iesaistīti normālā

B limfocītu attīstībā (*Mullighan et al.*, 2007). Gēnā *PAX5* mutācijas atrod 32% ALL gadījumā (*Woo et al.*, 2014). Mutācija Gly183Ser heterozigotiskā stāvoklī predisponē leikozes attīstību (*Shah et al.*, 2013).

Lai identificētu iespējamās ģenētiskās riska faktorus, veikti vairāki genoma plaši asociāciju pētījumi. Saistībā ar paaugstinātu risku saslimt ar ALL genoma plašajā asociāciju pētījumā tika identificēti divi alēliskie varianti rs10821936 un rs10994982, kuri lokalizēti gēnā *ARID5B* (*Trevino et al.*, 2009). Alēliskajam variantam rs4132601, kurš lokalizēts gēna *IKZF1* 3' netranslējamā reģionā, un alēliskam variantam rs2239633, kurš lokalizēts gēnā *CEBPE*, ir pierādīta cieša saistība ar ALL attīstības risku (*Papaemmanuil et al.*, 2009).

Apvienojot GWAS datus, tika identificēts vēl viens alēliskais variants, kurš saistās ar paaugstinātu ALL attīstības risku – rs3731217, kas lokalizēts gēna *CDKN2A* 1. intronā (*Sherborne et al.*, 2010).

Joprojām tiek pētīta ALL attīstības iespējamā saistība ar ksenobiotiķu metabolismu. Viens no metabolisma ceļiem, kuram varētu būt loma akūtas limfoblastu leikozes attīstībā, ir folāta metabolisms, jo tam ir nozīme DNS sintēzē, labošanā un metilēšanā (*Lupo et al.*, 2012). Gēna *MTHFR* kodētajam proteīnam ir būtiska nozīme folāta metabolismā, tā alēliskie varianti rs1801133 un rs1801131 samazina enzīma aktivitāti (*Jain et al.*, 2012; *Yousefian et al.*, 2014), kas var izraisīt DNS hipometilāciju, tādējādi rezultējoties proonkogēnu paaugstinātā ekspresijā un aktivizācijā (*J Yan et al.*, 2012).

Gēns *MDR1* kodē P glikoproteīnu, kura viena no funkcijām ir aizsargāt organismu pret ksenobiotiķiem, kuriem var būt mutagēna aktivitāte (*Semsei et al.*, 2008). Alēliskajiem variantiem rs1045642 un rs2032582 esot homozigotiskā stāvoklī, samazinās enzīma aktivitāte (*Llaudo et al.*, 2013; *Sterjev et al.*, 2012). Samazinoties enzīma aktivitātei, samazinās P glikoproteīna spēja izvadīt toksiskos ksenobiotiķus un apkārtējās vides kancerogēnus no šūnas (*Wang et al.*, 2012).

Indīvīdiem, kuriem ir delēcija glutaciona S transferāzi kodējošos gēnos *GSTT1* un *GSTM1*, nav aktīva viena vai abu enzīmu (*Dunna et al.*, 2013), kas nosaka to, ka tie nespēj pietiekami efektīvi izvadīt kancerogēnus (*LY Xu et al.*, 2014), viņiem biežāk veidojas somatiskas mutācijas un DNS fragmenti, kas kovalenti saistīti ar ķīmisku vielu (*Q Tang et al.*, 2013).

Gēns *NQO1* kodē NAD(P)H dehidrogenāzes kvinonu 1, ja gēna alēliskais variants rs1800566 ir homozigotiskā stāvoklī, enzīms ir praktiski neaktīvs (*Misra et al.*, 2000). *NQO1* funkcija ir reducēt un detoksificēt kvinīnus un to derivātus, lai aizsargātu šūnas no oksidatīvā stresa un kancerogēnēzes. Varianti, kuri ietekmē enzīma aktivitāti, var predisponēt audzēju attīstību (*Yang et al.*, 2015).

Gēna *IL15* kodētais produkts ir interleikīns 15 (IL15), kas ir pleiotrops citokīns (*Williams et al.*, 2014), kurš ietekmē normālu T un B limfocītu, neitrofilu proliferāciju, augšanu un diferenciāciju (*Agostini et al.*, 1997; *Fehniger et al.*, 2001). Pētījumā, kurā analizēti pieci alēliskie varianti, kas lokalizēti gēnā *IL15*, atklāja, ka varianti rs10519612 un rs17007695 ir statistiski ticami saistīti ar palielinātu leikozes attīstības risku pieaugušajiem (*D Lin et al.*, 2010).

Literatūrā ir aprakstīti vairāk nekā 20 iespējamie ārējās vides riska faktori, kas varētu ietekmēt leikozes attīstības risku, taču tikai daži no šiem pētījumu rezultātiem ir replicēti vai arī tiem ir bioloģiska ticamība. Epidemioloģiskie pētījumi ir pierādījuši, ka pastāv saistība starp infekcijām un ALL attīstības risku (*Inaba et al.*, 2013), kā arī starp jonizējošo starojumu un ALL attīstības risku (*Belson et al.*, 2007). Starp akūtas limfoblastu leikozes attīstības riska faktoriem tiek minēts arī liels dzimšanas svars (*Milne et al.*, 2013). ALL risks tiek saistīts arī ar mātes faktoru, piemēram, ar iepriekš mirušu augli, kas varētu būt saistīts ar ģenētisku predispozīciju vai ārējās vides ietekmi, vai arī lielu mātes vecumu, iespējamais patoģenētiskais mehānisms ir hromosomālā neatiešana mejozes laikā, kā arī citu iemeslu izraisīts DNS bojājums (*Mejia-Arangure et al.*, 2003).

1.1. Darba hipotēze

Ģenētiskās variācijas gēnos, kas saistīti ar leikocītu diferenciāciju, tajā skaitā gēnā *IKZF1* un gēnos, kas saistīti ar ksenobiotiķu metabolismu, ietekmē akūtas limfoblastu leikozes attīstību un gaitu bērnu vecumā.

1.2. Darba zinātniskā novitāte

Promocijas darbā apkopoti pacienti, kuriem diagnosticēta akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze laika posmā no 2005. gada janvāra līdz 2014. gada jūnijam. Šis ir pirmais pētījums Latvijā, kurā veikta pacientu ar akūtu B limfoblastu priekšteču šūnu leikozi ģenētisko marķieru izpēte. Šis ir pirmais pētnieciskais darbs, kurā veikta pilna gēna *IKZF1* sekvenēšana ALL pacientiem, analizēta alēlisko variantu nozīme ne-somatiskajās šūnās un iespējamā saistība ar akūtas B limfoblastu priekšteču šūnu leikozes attīstības risku, kā arī veikta proteīna ekspresijas analīze kaulu smadzeņu šūnās un perifērajās asinīs.

1.3. Darba mērķis

Noskaidrot gēna alēliskos variantus un to nozīmi akūtas limfoblastu leikozes attīstībā un norisē, izmantojot molekulārās ģenētikas datu analīzi, imūnhistoķīmiskos izmeklējumus un pacientu riska grupu analīzi.

1.4. Darba uzdevumi

1. Izveidot pētījuma grupu un iegūt perifēro asiņu paraugu no indivīdiem, kuriem laika posmā no 2005. gada janvāra līdz 2014. gada jūlijam diagnosticēta akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze, kuri diagnozes brīdī bijuši jaunāki par astoņpadsmit gadiem, kā arī iegūt perifēro asiņu paraugu no šo indivīdu vecākiem.
2. Veikt pētījumā iesaistīto indivīdu ģenētisko riska faktoru analīzi, lai izvērtētu gēnu alēlisko variantu ietekmi uz akūtas limfoblastu leikozes gaitu.

3. Veikt genoma plašos pētījumos iegūto datu replikāciju Latvijas populācijā, analizējot iepriekš aprakstītos alēliskos variantus gēnos – *IKZF1*, *ARID5B*, *CDKN2A* un *CEBPE*, kā arī iepriekš neaprakstīto alēlisko variantu noteikšanu, kas lokalizēti gēna *ARID5B* trešajā intronā, statistiskai analīzei izmantojot gadījuma – kontroles asociācijas modeli, ģimeņu saistības modeli un hibrīdmetodi, kura apvieno abus iepriekš minētos.
4. Noteikt iespējamo akūtas limfoblastu leikozes attīstības riska saistību ar literatūrā aprakstītajiem gēna alēliskajiem variantiem ksenobiotiķu metabolismā iesaistītajos gēnos – *MDR1*, *MTHFR*, *NQO1*, *GSTT1* un *GSTM1*, kā arī gēnos – *IL15* un *PAX5*.
5. Veikt gēna *IKZF1* pilnu sekvenēšanu visiem indivīdiem un vienīgajam pacientam, kurš diagnozes brīdī bija jaunāks par viena gada vecumu, arī MLPA - delēciju analīzi. Visiem probandiem noteikt gēna kodētā proteīna ekspresiju kaulu smadzenēs leikozes uzliesmojuma brīdī un analizēt ekspresiju perifērās asinīs remisijas brīdī paraugiem ar zemu ekspresijas līmeni kaulu smadzenēs un paraugiem, kuriem kaulu smadzeņu paraugi nebija pieejami.

1.5. Darba praktiskā nozīme

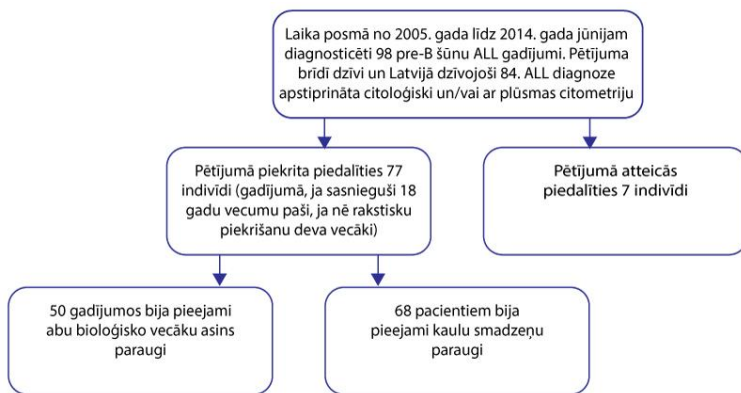
Promocijas darbs izstrādāts vairāk kā fundamentāls darbs, kura pamatā ir veikta akūtas B limfoblastu priekšteču šūnu leikozes etioloģijas izpēte Latvijas populācijā, kas saistīta ar ģenētisko faktoru ietekmi. Pilnībā veicot ģenētisko faktoru izpēti un citu faktoru lomas izvērtēšanu ALL etiopatogēnēzē, iespējams, tā tiks pilnībā izskaidrota, tādējādi uzlabojot izpratni par patoloģiju.

Promocijas darba ietvaros tika identificēti alēliskie varianti, kuriem ir saistība ar paaugstinātu akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku bērnu vecumā, kā arī tie, kas saistīti ar sliktāku prognozi vai ar protektīvu lomu.

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Materiāls

Pētījumā iekļauti pacienti, kuriem laika posmā no 2005. gada līdz 2014. gada jūlijam diagnosticēta akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas hematoloģijas nodaļā. Pētījumā iekļauti tikai tādi indivīdi, kuri slimības diagnosticēšanas brīdī vēl nebija sasnieguši 18 gadu vecumu. Pirms iekļaušanas pētījumā indivīds parakstīja informētas personas piekrišanas formu. Ja indivīds bioloģiskā materiāla savākšanas brīdī bija nepilngadīgs, viens vai abi no bioloģiskajiem vecākiem parakstīja informētas personas piekrišanas formu saskaņā ar Latvijas Republikas Centrālās Ētikas komitejas atļauju. Pacientu iekļaušanas kritērijus skatīt 2.1. attēlā.



2.1. att. Pacientu iekļaušanas kritēriji

Kontroles grupa tika izveidota no pēc vecuma un dzimuma piemeklētiem 122 indivīdu DNS paraugiem, kas glabājās Medicīniskās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā (MĢZL) datu kolekcijā un kuru vecāki, asins ņemšanas brīdī, parakstījuši informētas personas piekrišanas formu, kurā norādījuši, ka paraugi tālāk izmantojami bez ierobežojuma, pēc pētnieka

ieskatiem. Nevienam no pētījumā iekļautajiem kontroles grupas indivīdiem, kuri līdz 2014. gada jūlija mēnesim nebija sasnieguši 18 gadu vecumu, nebija diagnosticēta akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze.

2.2. Metodes

2.2.1. Ģenētisko marķieru atlase

Ģenētisko marķieru atlase tika veikta, balstoties uz literatūras datiem, šajā pētījumā citu populāciju pētījumu datu replikācijai tika izvēlēti šādi gēnu alēliskie varianti: gēnā *ARID5B* – rs10821936, rs10821938, rs7089424, rs10994982, rs7923074, rs7896246; *IKZF1* – rs4132601; *CEBPE* – rs2239633; *CDKN2A* – rs3731217. Papildus analīzei tika izvēlēti divi gēna alēliskie varianti, kuri iepriekš nebija analizēti, bet atradās gēna *ARID5B* 3. intronā – rs10821937 un rs7908445.

Gēna alēliskie varianti, kas lokalizēti gēnos, kuri iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā, atlasīti, vadoties pēc literatūrā biežāk aprakstītajiem alēliskajiem variantiem, kuriem ar vislielāko varbūtību iespējama saistība ar paaugstinātu leikozes attīstības risku. Pētījumam izvēlēti alēliskie varianti gēnos *MDR1* (rs1045642 un rs2032582), *MTHFR* (rs1801131 un rs1801133) un *NQO1* (rs1800566) analīze, kā arī gēnu *GSTT1* un *GSTM1* delēciju noteikšana, neskatoties uz to, ka citu pētījumu dati joprojām ir neviennozīmīgi.

Pirmo reizi pacientiem ar ALL bērnu vecumā analīzei tika izvēlēti alēliskie varianti gēnā *IL15* (rs10519612, rs10519613, rs17007695), kuriem iepriekš literatūrā aprakstīta saistība ar paaugstinātu ALL risku pieaugušo vecumā.

Gēna *PAX5* alēliskais variants rs398123063 (NM_001280547.1:c.547G>A) analīzei izvēlēts, jo literatūrā aprakstīts, ka tas izolētā heterozigotiskā stāvoklī spēj predisponēt leikozes attīstību.

Pēc literatūras datiem, gēna *IKZF1* pilna sekvences analīze bērniem ar akūtu limfoblastu leikozī nav veikta. Ņemot vērā gēna *IKZF1* kodētā proteīna lkaros funkcijas un nozīmīgumu limfocītu diferenciācijā, gēns *IKZF1* atlasīts kā iespējamais kandidātģēns akūtas limfoblastu leikozes attīstībā.

2.2.2. DNS izdalīšana no venozajām asinīm

Venozās asinis, kas ir savāktas etilēndiamīntetra acetātu saturošā stobriņā. DNS izdalīta pēc standarta fenola hloroforma metodes, kuru apraksta *Jhon* un kolēģi, metode adaptēta MÇZL (*John et al.*, 1991).

2.2.3. Polimerāzes ķēdes reakcija un restrikcijas fragmentu garuma alēlisko variantu analīze

Veicot amplifikācijas reakciju, tika sagatavots standarta reģentu maisījums. Ar restrikcijas endonukleāzi analizētajiem alēliskajiem variantiem sintētisko oligonukleotīdu secības tika piemeklētas programmā *Praimer 3* (<http://primer3.ut.ee/>) vai izvēlētas atbilstoši literatūrā aprakstītajām (*Alpman et al.*, 2010; *Ayaz et al.*, 2013; *Hanson et al.*, 2001; *Kim et al.*, 2006; *Kimura et al.*, 2005; *D Lin et al.*, 2010; *Safarinejad et al.*, 2012).

Lai noteiktu *GSTT1* un *GSTM1* gēnu nulles genotipus homozigotiskā stāvoklī, tika izmantota multipleksā polimerāzes ķēdes reakcija, kad vienlaicīgi tiek noteikta delēcija abos gēnos. Metode adaptēta MÇZL pēc *Kondo* un kolēģu izstrādātās metodes (*Kondo et al.*, 2009).

2.2.4. Sekvenēšanas reakcijas veikšana

Paraugi sekvenēšanai tika sagatavoti pēc ražotāja izstrādātā protokola. Sekvenēšanas elektroferogrammas analizētas, izmantojot programmu “*Chromas*” 2.4 versiju. Iegūtās sekvences salīdzinātas ar “*BLAST*” (*Altschul et al.*, 1997) pieejamo references sekveni. Sekvenēšanas reakcija tika veikta septiņiem gēna *ARID5B* alēliskajiem variantiem. Pilna gēna *IKZF1* sekve-

nēšana tika veikta visiem probandiem. Sestā un astotā eksona sekvenēšana tika veikta kontroles grupai (septiņdesmit septiņiem pēc vecuma un dzimuma atbilstošiem indivīdiem).

2.2.5. Kaulu smadzeņu un asins paraugu imūnhistoķīmiskā analīze

Pēc trepanbiopsijas veikšanas kaulu smadzeņu paraugu fiksē 10% formalīna šķīdumā. Histoķīmisko griezumus veic ar rotācijas mikrotomu. Parafīna bloki un histoķīmiskie griezumumi tika sagatavoti Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas patoloģijas biroja Histoķīmijas laboratorijā.

Asins parauga iztriepi pagatavo, uz priekšmetstikliņa uznesot pusotru mikrolitru asins parauga, kas paņemtas pacientam pilnas remisijas laikā.

Imūnhistoķīmiskās reakcijas veic pēc adaptēta ražotāja protokola (*Dako*, ASV).

2.2.6. Asins parauga analīze, lai noteiktu iespējamās gēna *IKZF1* delēcijas

Probandam, kuram akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze attīstījās vecumā līdz vienam gadam, tika veikta multipleksā ligācijas atkarīgā zondes amplifikācija Grieķijas laboratorijā „*BioAnalytica Genotypus*”, izmantojot komerciāli pieejamu P202-B1 zondes maisījumu (ražotājs MRC, Holande).

2.2.7. Datu statistiskā apstrāde

Pētījumā iegūtie dati analizēti, izmantojot aprakstošās un analītiskās statistiskās metodes.

Statistiskā analīze gadījuma – kontroles grupā un ģimeņu pētījuma modelī, lai analizētu alēlisko variantu iespējamo saistību ar ALL, tika veikta, izmantojot programmatūru PLINK 1.07 (*Purcell et al.*, 2007). GSTT1 un GSTM1 analīzei Hī kvadrāta tests tika veikts programma JavaStat (*Rosner*, 2006).

Gadījuma – kontroles un ģimeņu pētījuma modeļu statistisko rezultātu apkopošanai un rezultātu statistiskās uzticamības palielināšanai tika izmantota hibrīdanalīze, kas veikta, izmantojot programmatūru R, spraudni *Haplin* (Jugessur et al., 2009). Papildus ar šo programmatūru veikta gēnā *MDR1* lokalizētā alēliskā varianta rs2032582 analīze ar pielāgotu log-lineāro modeļa palīdzību, jo alēliskais variants ir triālēlisks.

Datu statistiskai apstrādei, lai analizētu pacientu saslimstības vecumu, proteīna ekspresiju kaulu smadzenēs un to saistību ar genotipiem un slimības gaitu tika izmantota programmatūra *SPSS 20* (IBM Corp. Released 2011. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.*).

Lai analizētu identificēto alēlisko variantu gēnā *IKZF1* iespējamo ietekmi uz splaisingu, procesēšanas iespējamie rajoni tika analizēti programmā *Human splicing finder* – HSF 3.0 (Desmet et al., 2009).

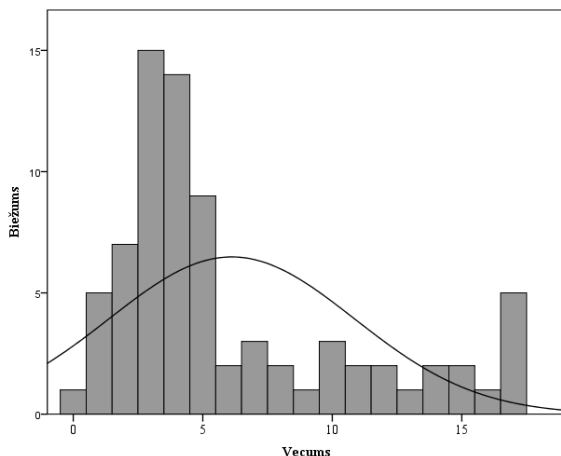
Lai analizētu alēlisko variantu savstarpējo nelīdzsvaroto saistību (*linkage disequilibrium* – LD), tika izmantota programmatūra *haploview*.

3. REZULTĀTI

3.1. Pētījumā iekļauto akūtas limfoblastu leikozes pacientu raksturojums

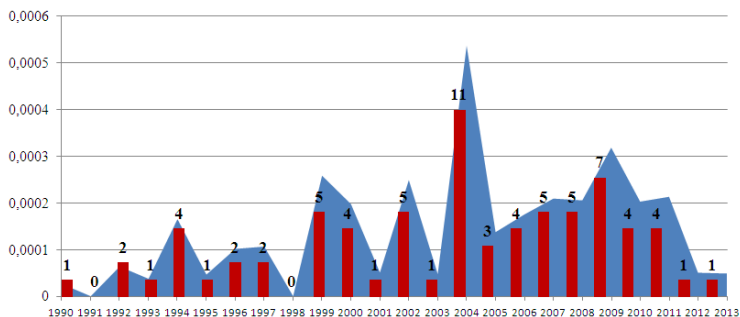
Pētījumā tika iekļautas trīsdesmit sešas meitenes un četrdesmit viens zēns ar akūtu limfoblastu leikozi, zēnu un meiteņu attiecība bija 1,14 : 1.

Bērnu vecums ALL diagnosticēšanas brīdī bija no 0 līdz 17 gadiem, saslimšanas pīķis bija vērojams vecumā no diviem līdz pieciem gadiem. Vidējais vecums saslimšanas brīdī bija 6,12 gadi, standarta deviācija 4,7. Pacientu sadalījumu pēc vecuma skatīt 3.1. attēlā.



3.1. att. Vecuma sadalījuma līkne pacientiem ar akūtu limfoblastu leikozi diagnozes uzstādīšanas brīdī

Vislielākais akūtas limfoblastu leikozes sastopamības biežums bija starp 2004. gadā dzimušajiem bērniem – 14,3%. Pacientu skaitu atkarībā no dzimšanas gada un dzīvi dzimušo bērnu skaita attiecīgajā gadā skatīt 3.2. attēlā. Dati par dzīvi dzimušo bērnu skaitu iegūti no Centrālās statistikas pārvaldes (www.csb.gov.lv).



3.2. att. Akūtas B limfoblastu priekšteču šūnu akūtas leikozes pacientu skaita sadalījums atkarībā no dzimšanas gada

Sadalot pacientus riska grupās, kurās apvienoti BFM 95 un COG augsta riska kritēriji, četrdesmit astoņi pacienti atbilda standarta riska grupai, bet divdesmit septiņi – augsta riska grupai. Divi pacienti netika iekļauti riska grupas novērtēšanai, jo viens pacients saslimšanas brīdī bija jaunāks par vienu gadu, bet otram pacientam terapija bija uzsākta Meksikā, un nebija zināms leukocītu skaits diagnosticēšanas brīdī.

Papildus prognozi pasliktinošiem faktoriem tika analizēts arī prognozi uzlabojošs faktors – hiperdiploidija. Citoģenētiskā analīze bija pieejama sešdesmit četriem indivīdiem, 40% no tiem kariotipā bija hiperdiploidija.

Pētījuma laikā recidīvs attīstījās deviņiem pacientiem jeb 11,68%, un pieci pacienti nomira – kopumā 6,49% no pētījumā iekļautajiem.

3.2. Gēnā *ARID5B* 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu analīze

Pētījumā kopumā tika analizēti astoņi alēliskie varianti, kuri lokalizēti gēnā *ARID5B* 3. intronā, kuriem retāk sastopamās alēles biežums (MAF) > 5%.

Papildus tika veikta analīze diviem alēliskiem variantiem, kas atradās sekvenētajā reģionā, rs77918077 un rs12246030, kuri neatbilda pētījuma iekļaušanas kritērijiem. Alēliskā varianta rs77918077 A alēle tika identificēta

sešiem probandiem, A alēles biežums – 4,17%. A alēles biežums kontroles populācijā bija 2,46%. Starp abām grupām netika atrastas ticamas atšķirības ($p = 0,374$ OR = 1,73 95% CI 0,48 – 6, 17).

Gēna *ARID5B* alēliskā varianta rs12246030 G alēle netika identificēta nevienam indivīdam – ne pētījuma grupā, ne gadījuma – kontroles grupā.

Visu alēlisko variantu genotipu sadalījums atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram.

Sešiem no astoņiem analizētajiem alēliskiem variantiem gadījuma – kontroles pētījumā tika identificēta statistiski nozīmīga riska alēle, kas saistīta ar paaugstinātu leikozes attīstības risku. Koriģējot rezultātus pēc dzimuma, tika novērots, ka retāk sastopamā alēle statistiski biežāk novērojama zēniem nekā meitenēm. Gadījuma – kontroles alēļu asociāciju analīzes rezultāti atainoti tabulā 3.1.

3.1. tabula

Gēna *ARID5B* 3. intronā lokalizēto gēna alēlisko variantu riska alēļu analīze gadījuma – kontroles pētījumā

Gēna alēliskais variants	MAF	Biežums pacientu grupā	Biežums kontroles grupā	OR CI 95%	p vērtība	OR CI 95%	p vērtība, koriģ. pēc dzimuma
rs10994982	A	0,51	0,41	1,5 (0,99 – 2,26)	0,054	0,67 (0,44-1)	0,059
rs7908445	T	0,43	0,32	1,63 (1,07 – 2,47)	0,022	0,61 (0,40-0,93)	0,03
rs7923074	A	0,44	0,32	1,67 (1,1 – 2,54)	0,016	0,6 (0,39-0,91)	0,022
rs10821936	C	0,34	0,24	1,65 (1,05 – 2,56)	0,027	0,61 (0,39-0,95)	0,042
rs10821937	C	0,34	0,23	1,7 (1,09 – 2,68)	0,018	0,58 (0,37-0,91)	0,03
rs7896246	A	0,34	0,23	1,7 (1,09 – 2,68)	0,018	0,58 (0,37-0,91)	0,03

3.1. tabulas turpinājums

Gēna alēliskais variants	MAF	Biežums pacientu grupā	Biežums kontroles grupā	OR CI 95%	p vērtība	OR CI 95%	p vērtība, koriģ. pēc dzimuma
rs10821938	A	0,47	0,38	1,45 (0,96 – 2,18)	0,074	0,69 (0,46-1,04)	0,07
rs7089424	G	0,34	0,23	1,7 (1,09 – 2,68)	0,018	0,58 (0,37-0,91)	0,03

MAF – retāk sastopamā alēle; OR – izredžu attiecība; CI – ticamības intervāls

Analizējot genotipu saistību ar palielinātu akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku katram alēliskā variantam atsevišķi, septiņiem alēliskiem variantiem statistiski ticami rezultāti identificēti recesīvajā pārmantošanas modelī (analizējot genotipu DD salīdzinājumā ar genotipiem Dd + dd). Alēliskajā modelī, salīdzinot savā starpā dominantās un recesīvās alēles biežumu, statistiski ticami nozīmīgi rezultāti bija sešiem alēliskiem variantiem. Rezultāti attēloti 3.2. tabulā.

3.2. tabula

Gēna *ARID5B* 3. intronā lokalizēto gēna alēlisko variantu riska genotipu analīze pēc pārmantošanas modeļa gadījuma – kontroles asociāciju pētījumā

Gēna alēliskais variants	Retāk sastopamā alēle	χ^2 recesīvajam pārmantošanas modelim	p vērtība recesīvajam pārmantošanas modelim	χ^2 alēliskajam modelim	p vērtība alēliskajam modelim
rs10994982	A	2,2	0,13	3,72	0,05
rs7908445	T	4,8	0,028	5,23	0,02
rs7923074	A	4,8	0,028	5,84	0,016
rs10821936	C	5,39	0,02	4,89	0,027
rs10821937	C	5,33	0,02	5,58	0,018
rs7896246	A	4,34	0,037	5,58	0,018
rs10821938	A	5,94	0,015	3,19	0,07
rs70894224	G	5,33	0,02	5,59	0,018

χ^2 – Hi kvadrāts

Izvērtējot alēlisko variantu saistību ar ALL attīstības risku ģimeņu pētījumā, visi astoņi analizētie alēliskie varianti statistiski ticami nozīmīgi bija saistīti ar ALL. Rezultāti parādīti 3.3.tabulā.

3.3. tabula

Gēna *ARID5B* 3. intronā lokalizēto gēna alēlisko variantu analīze ģimeņu saistības pētījumā

Gēna alēlisko variantu	OR CI 95%	p vērtība
rs7908445	2,53 (1,39-4,61)	0,002
rs7923074	2,79 (1,51-5,13)	0,6 x 10 ⁻³
rs10821936	2,62 (1,38 -4,96)	0,002
rs10821937	3,18 (1,62-6,27)	0,4 x 10 ⁻³
rs7896246	2,9 (1,41-5,95)	0,002
rs10821938	1,91 (1,12- 3,230)	0,015
rs7089424	3 (1,56-5,77)	0,5 x 10 ⁻³
rs10994982	1,88 (1,05-3,39)	0,032

OR – izredžu attiecība; CI – ticamības intervāls

Lai pastiprinātu rezultātu statistisko ticamību, abi pētījuma modeļi: gadījuma – kontroles un pacienta – vecāku trio pētījums tika apvienoti, izmantojot hibrīdmetodi (*Jugessur et al.*, 2009). Rezultāti parādīti 3.4. tabulā.

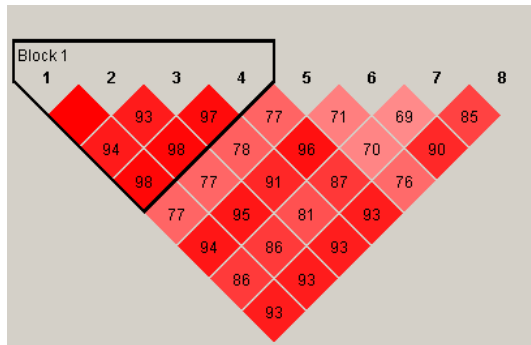
3.4. tabula

Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu sekvenēšanas reakcijā

Gēna alēliskais variants	Genotipā viena riska alēle		Genotipā divas riska alēles	
	RR CI 95%	p vērtība	RR CI 95%	p vērtība
rs7908445	1,26 (0,72-2,21)	0,416	3,35 (1,58-7,01)	0,002
rs7923074	1,37 (0,78-2,4)	0,279	3,57 (1,67-7,55)	0,001
rs10821936	1,16 (0,66-2,04)	0,6	4,61 (2,07-10,1)	0,4 x 10 ⁻³
rs10821937	1,35 (0,76-2,35)	0,312	5,29 (2,32-11,9)	0,2 x 10 ⁻³
rs7896246	1,26 (0,72-2,18)	0,43	3,96 (1,73-8,93)	0,002
rs10821938	1,21 (0,69-2,13)	0,503	2,33 (1,08- 4,8)	0,031
rs7089424	1,32 (0,74-2,31)	0,338	5,11 (2,23-11,4)	0,2 x 10 ⁻³
rs10994982	1,3 (0,71-2,33)	0,384	2,43 (1,14-5,13)	0,024

RR – relatīvais risks; CI – ticamības intervāls

Izvērtējot gēna *ARID5B* 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu nelīdzsvaroto saistību, tika iegūti šādi rezultāti, skatīt 3.3. attēlā



3.3. att. Desmitās hromosomas gēna *ARID5B* trešajā intronā lokalizēto gēna alēlisko variantu nelīdzsvarotās saistības analīze

Gēna alēliskie varianti izvietoti šādā secībā: 1 – rs7908445; 2 – rs7923074; 3 – rs10821936; 4 – rs10821937; 5 – rs7896246; 6 – rs10821938; 7 – rs10994982; 8 – rs7089424

Iespējamie riska haplotipi tika analizēti abos pētījuma modeļos – gan gadījuma – kontroles, gan ģimeņu pētījumā. Haplotipi tika veidoti, sākot no trīs alēliskiem variantiem haplotipā līdz pat visiem analizētajiem astoņiem vienlaicīgi. Statistiski ticamie haplotipu analīzes rezultāti gadījuma – kontroles pētījumā attēloti 3.5. tabulā.

3.5. tabula

Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu haplotipu analīze gadījuma – kontroles asociāciju pētījumā

Iekļautie alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Biežums ALL pacientiem	Biežums kontroles grupā	H _i kvadrātats	p vērtība
1/2/3	ATA	0,29	0,4	5,2	0,022
1/2/3	GCC	0,56	0,46	3,97	0,046
2/3/4	TAC	0,23	0,33	4,72	0,03
2/3/4	CCT	0,68	0,56	5,87	0,015
3/4/5	ACC	0,23	0,33	4,53	0,033
3/4/5	CTT	0,68	0,57	4,89	0,02

3.5. tabulas turpinājums

Iekļautie alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Biežums ALL pacientiem	Biežums kontroles grupā	H _i kvadrātā	p vērtība
4/5/6	CCA	0,18	0,3	8,74	0,003
5/6/7	CAA	0,17	0,3	9,95	0,002
6/7/8	AAG	0,17	0,3	9,52	0,002
1/2/3/ 4	ATAC	0,22	0,32	4,83	0,028
2/3/4/ 5	TACC	0,23	0,33	4,71	0,029
2/3/4/ 5	CCTT	0,68	0,58	4,54	0,033
3/4/5/ 6	ACCA	0,18	0,3	8,26	0,004
4/5/6/ 7	CCAA	0,17	0,3	8,77	0,003
5/6/7/ 8	CAAG	0,17	0,3	9,28	0,002
1/2/3/ 4/5	ATACC	0,24	0,31	4,68	0,031
2/3/4/ 5/ 6	TACCA	0,18	0,3	8,48	0,004
3/4/5/ 6/ 7	ACCAA	0,17	0,3	7,91	0,005
4/5/6/ 7/ 8	CCAAG	0,17	0,29	8,21	0,004
1/2/3/ 4/5/ 6	ATACCA	0,17	0,29	7,29	0,007
2/3/4/ 5/ 6/7	TACCAA	0,17	0,3	8,13	0,004
3/4/5/ 6/7/ 8	ACCAAG	0,17	0,29	7,37	0,006
1/2/3/ 4/5/6/ 7	ATACCAA	0,17	0,28	6,63	0,009
2/3/ 4/ 5/6/7/ 8	TACCAAG	0,17	0,29	7,32	0,007
1/2/3/ 4/5/6/ 7/ 8	ATACCAAG	0,17	0,29	6,69	0,009

Tabulā lietotie alēlisko variantu apzīmējumi: 1 – rs10994982, 2 – rs7908445, 3 – rs7923074, 4 – rs10821936, 5 – rs10821937, 6 – rs7896246, 7 – rs10821938 un 8 – rs7089424

Savukārt, ģimeņu pētījuma modelī statistiski nozīmīgākais bija haplotips no septiņiem alēliskiem variantiem:

rs7908445/rs7923074/rs10821936/rs10821937/rs7896246/rs10821938/
rs7089424 – TACCAAG (p vērtība = 0,0008). Ģimeņu pētījuma modeļa haplotipu analīze atainota 3.6. tabulā.

Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu haplotipu analīze ģimeņu asociāciju pētījumā

Iekļautie alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Nodotā alēle	Nenodotā alēle	H _i kvadrāts	p vērtība
1/2/3	ATA	31	11	9,52	0,002
1/2/3	GCC	11	27	6,74	0,009
2/3/4	TAC	33,7	11	11,54	0,7 x 10 ⁻³
2/3/4	CCT	13	37	11,52	0,7 x 10 ⁻³
3/4/5	ACC	32,92	10	12,24	0,5 x 10 ⁻³
3/4/5	CTT	12	35	11,26	0,8 x 10 ⁻³
4/5/6	CCA	32,88	9,99	12,23	0,5 x 10 ⁻³
4/5/6	TTG	12,12	30,08	7,65	0,006
5/6/7	CAA	35,88	10	14,6	0,1 x 10 ⁻³
6/7/8	AAG	33,95	10	13,05	0,3 x 10 ⁻³
1/2/3/ 4	ATAC	27,99	9,99	8,53	0,003
1/2/3/ 4	GCCT	10,99	26,99	6,74	0,009
2/3/4/ 5	TACC	32,92	10	12,24	0,5 x 10 ⁻³
2/3/4/ 5	CCTT	12	34	10,52	0,001
3/4/5/ 6	ACCA	30,88	9	12,01	0,5 x 10 ⁻³
3/4/5/ 6	CTTG	12,03	31,04	8,38	0,004
4/5/6/ 7	CCAA	32,88	10	12,21	0,5 x 10 ⁻³
5/6/7/ 8	CAAG	34,94	10	13,84	0,2 x 10 ⁻³
1/2/3/ 4/5	ATACC	27,92	8,99	9,71	0,002
1/2/3/ 4/5	GCCTT	10	25,97	7,09	0,008
2/3/4/ 5/ 6	TACCA	30,88	9	12,01	0,5 x 10 ⁻³
2/3/4/ 5/ 6	CCTTG	12,03	30,04	7,7	0,006
3/4/5/ 6/ 7	ACCAA	30,88	9	12,01	0,5 x 10 ⁻³
4/5/6/ 7/ 8	CCAAG	31,94	10	11,48	0,7 x 10 ⁻³
1/2/3/ 4/5/ 6	ATACCA	26,9	8	10,24	0,01
1/2/3/ 4/5/ 6	GCCTTG	10,04	22,03	4,48	0,03
2/3/4/ 5/ 6/7	TACCAA	30,08	9	12,01	0,5 x 10 ⁻³
3/4/5/ 6/7/ 8	ACCAAG	29,94	9	11,26	0,8 x 10 ⁻³
1/2/3/ 4/5/6/ 7	ATACCAA	26,9	8	10,24	0,001
2/3/ 4/ 5/6/7/ 8	TACCAAG	29,94	9	11,26	0,8 x 10 ⁻³
1/2/3/ 4/5/6/ 7/8	ATACCAAG	26,96	8	10,29	0,001

Tabulā lietotie alēlisko variantu apzīmējumi: 1 – rs10994982, 2 – rs7908445, 3 – rs7923074, 4 – rs10821936, 5 – rs10821937, 6 – rs7896246, 7 – rs10821938 un 8 – rs7089424

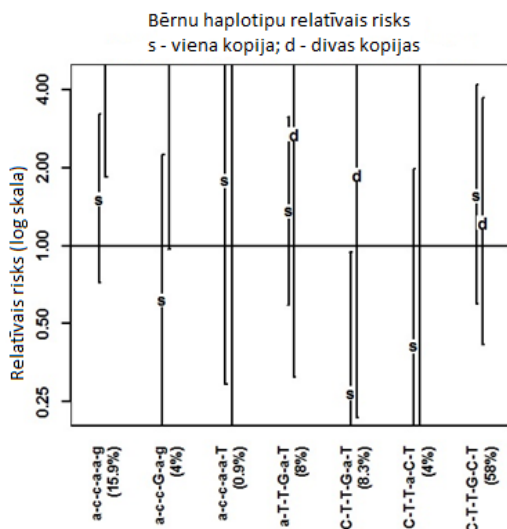
Apvienojot abus pētījuma modeļus vienā, statistiski nozīmīgi haplotipi bija tie, kur alēlisko variantu retāk sastopamā alēle bija homozigotiskā stāvoklī. Statistiski ticamie rezultāti atainoti 3.7. tabulā.

**Gēna *ARID5B* 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu riska haplotipi,
analizē izmantojot hibrīdmetodi**

Alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	RR (95% CI)	p vērtība
3/4/5	aacccc	3,08 (1,05 – 8,9)	0,04
3/ 4/6	aaccaa	6,04 (2,14 – 16,9)	$0,8 \times 10^{-3}$
3/ 4/7	aaccaa	4,43 (1,63 – 11,7)	0,005
3/ 4/8	aaccgg	3,29 (1,23 – 9,13)	0,004
3/ 5/ 6	aaccaa	6,06 (2,09 – 17,2)	$0,6 \times 10^{-3}$
5/ 6/ 7	ccaaaa	7,31 (2,64 – 19,6)	$0,2 \times 10^{-3}$
5/ 6/ 8	ccaagg	8,67 (2,43 – 30,2)	0,001
5/ 6/1	caaaaa	7,71 (2,84 – 20,2)	$0,2 \times 10^{-3}$
6/ 7/ 8	aaaagg	7,36 (2,72 – 19,4)	$0,2 \times 10^{-3}$
3/ 6/ 7	aaaaaa	6,94 (2,61 – 18,6)	$< 0,1 \times 10^{-3}$
4/ 6/ 7	caaaaa	7,03 (2,64 – 18,5)	$< 0,1 \times 10^{-3}$
5/ 6/ 7	caaaaa	7,32 (2,68 – 20)	$0,2 \times 10^{-3}$
7/ 8/1	aaggaa	5,77 (2,31 – 14,5)	$0,6 \times 10^{-3}$
3/ 7/ 8	aaaagg	4,43 (1,7 – 11,5)	0,002
5/ 7/ 8	ccaagg	4,88 (1,82 – 13,1)	0,001
6/ 7/ 8	aaaagg	7,26 (2,7 – 19,4)	$< 0,1 \times 10^{-3}$
3/ 8/1	aaggaa	4,79 (1,8 – 12,3)	0,001
4/ 8/1	ccggaa	5,2 (1,98 – 13,7)	0,002
5/ 8/1	ccggaa	4,67 (1,68 – 12,7)	0,003
6/ 8/1	aaggaa	7,03 (2,65 – 18,6)	$< 0,1 \times 10^{-3}$
3/6/6	aaaagg	6,05 (2,17 – 16,7)	0,001
3/4/ 5/ 6	aaccccaa	5,1 (1,7 – 14,8)	0,005
3/ 4/ 5/7	aaccccaa	4,21 (1,51 – 11,7)	0,006
3/ 4/ 5/8	aaccccg	3,19 (1,06 – 9,6)	0,04
3/ 4/ 6/ 7	aacccaaa	6,8 (2,45 – 18,6)	$0,4 \times 10^{-3}$
3/ 4/ 6/ 8	aaccaagg	5,04 (1,74 – 14,2)	0,003
3/ 4/ 7/ 8	aaccaagg	4,25 (1,59 – 11,2)	0,003
3/ 5/ 6/ 8	aaccaagg	4,49 (1,44 – 13,6)	0,009
4/ 5/ 6/ 8	cccgaagg	7,04 (1,88 – 25,5)	0,006
4/ 5/ 7/ 8	cccgaagg	4,22 (1,55 – 11,8)	0,004
5/ 6/ 7/ 8	ccaaaagg	5,81 (1,95 – 16,6)	0,002
3/ 4/ 5/ 6/ 7	aacccccaaa	5,81 (2,05 – 17,1)	$0,6 \times 10^{-3}$
3/ 4/ 5/ 6/ 8	aaccccaagg	4,62 (1,49 – 12,4)	0,006
3/ 4/ 5/ 7/8	aaccccaagg	4,29 (1,49 – 12,4)	0,007
3/ 4/ 6/ 7/8	aacccaaaagg	5,87 (2,09 – 16,2)	0,001

Tabulā lietotie alēlisko variantu apzīmējumi: 1 – rs10994982, 2 – rs7908445, 3 – rs7923074, 4 – rs10821936, 5 – rs10821937, 6 – rs7896246, 7 – rs10821938 un 8 – rs7089424

Haplotips, kas statistiski ticami bija saistīts ar leikozes attīstības risku, ir rs7923074/rs10821936/rs10821937/rs7896246/rs10821938/rs7089424 – AACCCCAAAAGG RR 5,43 (95%CI 1,84 – 16,3 p vērtība = 0,002). Grafisko attēlojumu skatīt 3.4. attēlā



3.4. att. Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu riska alēļu haplogrupas no sešiem alēliskiem variantiem, analizējot ar hibrīdmetodi

Alēliskie varianti attēlā atēloti šādā secībā: 1 – rs7923074, 2 – rs10821936, 3 – rs10821937, 4 – rs7896246, 5 – rs10821938 un 6 – rs7089424

Analizējot gēnā *ARID5B* lokalizētos alēliskos variantus, tie nebija statistiski ticami saistīti ar augstāka riska leikozes attīstību, kā arī nebija statistiski ticami saistīti ar vecumu ≥ 10 gadiem leikozes attīstības brīdī, visos gadījumos p vērtība $> 0,05$.

Analizējot pacientu genotipus, kuriem bija hiperdiploīdija (kam ir labāka prognoze), salīdzinājumā ar pacientiem, kuriem nebija hiperdiploīdija, tika identificēti haplotipi, kas ar to saistās. Rezultātus skatīt 3.8. tabulā, tabulā attēloti tikai statistiski ticamie rezultāti.

Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu haplotipu analīze pacientiem ar hiperdiploidiju, salīdzinājumā ar pacientiem bez hiperdiploidijas

Iekļautie gēna alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Biežums pacientiem ar hiperdiploidiju	Biežums pacientiem bez hiperdiploidijas	H _i kva-drāts	p vērtība
3/4/5	ATT	0,02	0,13	4,84	0,03
6/7/8	GAT	0,06	0,18	4,06	0,04
2/3/4/5	TATT	0,02	0,12	4,19	0,04
3/4/5/6	ATTG	0,02	0,13	4,8	0,028
5/6/7/8	TGAT	0,06	0,18	4,11	0,04
2/3/4/5/6	TATTG	0,02	0,12	4,15	0,04
3/4/5/6/7	ATTGA	0,02	0,14	4,89	0,026
1/2/3/4/5/6	ATATTG	0,02	0,12	4,14	0,04
2/3/4/5/6/7	TATTGA	0,02	0,12	4,2	0,04
3/4/5/6/7/8	ATTGAT	0,02	0,14	4,95	0,02
1/2/3/4/5/6/7	ATATTGA	0,02	0,12	4,24	0,04
2/3/4/5/6/7/8	TATTGAT	0,02	0,12	4,3	0,038
1/2/3/4/5/6/7/8	ATATTGAT	0,02	0,13	4,35	0,037

Tabulā lietotie alēlisko variantu apzīmējumi: 1 – rs10994982, 2 – rs7908445, 3 – rs7923074, 4 – rs10821936, 5 – rs10821937, 6 – rs7896246, 7 – rs10821938 un 8 – rs7089424

3.3. Gēnos *CEBPE*, *IKZF1* un *CDKN2A* lokalizēto alēlisko variantu analīze

Gēnā *CEBPE* tika analizēts alēliskais variants rs2239633, gēnā *IKZF1* – rs4132601 un gēnā *CDKN2A* – rs3731217, visi trīs analizētie alēliskie varianti atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram. Statistiski ticama saistība ar paaugstinātu akūtas limfoblastu leikozes risku nevienam no alēliskiem variantiem šajā pētījumā netika identificēta.

Gadījumā, ja mātei gēna alēliskais variants rs4132601 ir homozigotiskā stāvoklī – GG, bērnam ir lielāks leikozes attīstības risks (RR 2,77 95%CI 1,01 – 7,7, p vērtība = 0,046).

Apvienojot šajā pētījumā iegūtos datus par alēliskajiem variantiem: rs3731217, rs2239633, rs4132601, rs10821936 un rs10994982, tika identificētas iespējamās ALL risku palielinošo genotipu kombinācijas: TTCCTCCAA, RR 9,38 (95%CI 1,56 – 58,7), p vērtība = 0,014 un TTTTTTTTAA, RR 40,8 (95%CI 2,18 – 827), p vērtība = 0,011.

3.4. Gēnā *PAX5* lokalizētās ģenētiskās variācijas noteikšana

Veicot alēliskā variantā rs398123063 (NM_001280547.1:c.547G>A) analīzi septiņdesmit septiņiem pētījumā iekļautajiem indivīdiem, nevienam tas netika konstatēts.

3.5. Gēnā *IL15* lokalizēto alēlisko variantu rs10519612, rs10519613 un rs17007695 analīze

Analizētajā populācijā alēliskie varianti rs10519612, rs10519613 un rs17007695 atbilst Hārdija Veinberga līdzsvaram. Analizējot katra alēliskā variantā iespējamo saistību ar ALL attīstības risku, statistiski nozīmīgi rezultāti netika atrasti.

Pirms haplotipu analīzes tika noteikta nelīdzsvarotā saistība (LD) starp analizētajiem alēliskiem variantiem. Starp alēliskajiem variantiem rs10519612 un rs10519613 ir gandrīz pilna nelīdzsvarota saistība, jo $r^2 = 0,97$.

Haplotipu analīzes veikšanai tika apvienoti gadījuma – kontroles un ģimeņu pētījuma modeļi. Ar ALL attīstības risku statistiski ticami saistītie haplotipi attēloti 3.9. tabulā.

3.9. tabula

Gēnā *IL15* lokalizēto alēlisko variantu haplotipu analīze, analīzei izmantojot hibrīdmetodi

Haplotipā iekļautie alēliskie varianti	Haplotips	RR 95% CI	p vērtība	Iespējamā haplotipa nozīme
rs10519613/rs17007695	AC	5,28 (1,06 – 26)	0,04	riska
rs10519613/rs17007695	CT	0,21 (0,06 – 0,8)	0,02	protektīvs
rs10519613/rs17007695	CCTT	0,22 (0,06 – 0,88)	0,03	protektīvs
rs10519612/rs17007695	AT	0,17 (0,05 – 0,65)	0,009	protektīvs
rs10519612/rs17007695	AATT	0,17 (0,04 – 0,65)	0,009	protektīvs
rs10519612/rs105196123/rs17007695	ACT	0,15 (0,04 – 0,58)	0,006	protektīvs
rs10519612/rs105196123/rs17007695	AATTCC	0,13 (0,03 – 0,52)	0,005	protektīvs

RR – relatīvais risks, CI – ticamības intervāls

3.6. Gēna alēlisko variantu analīzes rezultāti, kas lokalizēti gēnos, kuri saistīti ar ksenobiotiķu metabolismu

3.6.1. Gēnā *MDR1* lokalizēto alēlisko variantu rs1045642 un rs2032582 analīze

Alēliskie varianti rs1045642 un rs2032582 atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram. Alēliskā varianta rs2032582, G alēle heterozigotiskā stāvoklī bija saistīta ar samazinātu leikozes attīstības risku, bet statistiskā ticamība tika zaudēta homozigotiskā stāvoklī (gadījuma – kontroles pētījuma modelī – RR 0,29; 95%CI 0,09 – 0,91; $p = 0,03$; apvienotajā modelī – RR 0,3; 95%CI 0,1 – 0,95; $p = 0,04$). Savukārt, homozigotiskā stāvoklī G alēle bija saistīta ar agrāku leikozes sākšanās vecumu (RR 0,13; 95%CI 0,02 – 0,18; p vērtība = 0,03).

Alēliskā varianta rs2032582 A alēle homozigotiskā formā netika identificēta. Heterozigotiskā formā A alēle bija statistiski ticami saistīta ar paaugstinātu leikozes attīstības risku (gadījuma – kontroles pētījuma modelī – RR 3,5; 95%CI 1,26 – 9,51; $p = 0,01$; apvienotajā modelī – RR 3,61; 95%CI 1,32 – 9,43; $p = 0,01$).

Analizējot mātes genotipu, rs2032582 protektīva nozīme bija T alēlei homozigotiskā stāvoklī, RR 0,05; 95%CI 0,003 – 0,77; $p = 0,03$. Savukārt, SNP rs1045642 C alēle bija statistiski ticami saistīta ar augstāku leikozes attīstības risku bērnam (heterozigotiskā stāvoklī RR 3,09; 95%CI 1,2 – 7,79; $p = 0,02$; homozigotiskā stāvoklī RR 4,49; 95%CI 1,24 – 15,6; $p = 0,02$).

Analizējot haplotipus, haplotips rs1045642/rs2032582 – TA bija statistiski ticami saistīts ar augstāku leikozes attīstības risku, RR 9,51; 95%CI 1,29 – 70,7; p vērtība = 0,03. Protektīvs efekts uz leikozes attīstības risku bērnam ir mātes haplotipam rs1045642/rs2032582 TT, ja abas alēles ir homozigotiskā stāvoklī, RR 0,09; 95% CI 0,01 – 0,85; p vērtība = 0,035.

3.6.2. Gēnā *MTHFR* lokalizēto alēlisko variantu rs1801131 un rs1801133 analīze

Abi analizētie alēliskie varianti atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram. Alēliskajiem variantiem nebija statistiski ticama saistība ar ALL attīstības risku. Mātes haplotipam rs1801131/rs1801133 AACC ir protektīva loma bērna leikozes attīstībā, RR 0,13; 95% CI 0,03-0,6; p vērtība = $0,9 \times 10^{-3}$.

3.6.3. Gēnā *NQO1* lokalizētā alēliskā varianta rs1800566

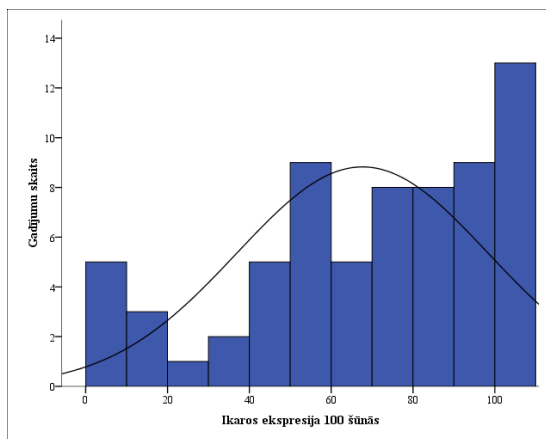
Gēnā *NQO1* lokalizētais alēliskais variants rs1800566 atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram un nebija statistiski ticami saistīts ar leikozes attīstības risku.

3.6.4. Delēcijas gēnos *GSTT1* un *GSTM1*

Gēna *GSTT1* delēcija homozigotiskā formā tika identificēta 28,6% indivīdiem ALL grupā, savukārt, kontroles grupā šī delēcija tika identificēta 18,2%, tomēr rezultāti nebija statistiski ticami atšķirīgi, p vērtība $> 0,05$. Gēna *GSTM1* delēcija homozigotiskā formā tika identificēta 55,8% un 47,9% pētījuma un kontroles grupas indivīdiem, respektīvi, arī šie rezultāti nebija statistiski ticami atšķirīgi, p vērtība $> 0,05$.

3.7. *IKZF1* gēna secības un Ikaros proteīna ekspresijas analīze

Četriem no sešdesmit astoņiem paraugiem (5,88%) proteīns neekspresējās. Proteīna ekspresija, kas mazāka par piecdesmit procentiem, bija vērojama piecpadsmī indivīdiem jeb 22%. Vidējais proteīna ekspresijas līmenis šūnās bija 67,65% (standarta deviācija 30,7). Ekspresijas līmeņa sadalījumu skatīt 3.5. attēlā. Analizējot Ikaros ekspresijas līmeni atkarībā no probanda vecuma, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības.

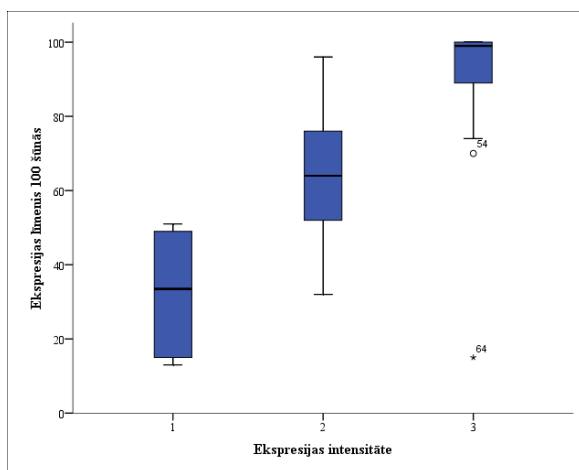


3.5. att. **Ikaros proteīna līmeņa ekspresija kaula smadzeņu šūnās**

Savstarpēji izvērtējot proteīna ekspresijas līmeni kaulu smadzeņu šūnās un akūtas leikozes recidīva vai *exitus letalis* risku, netika atrasta statistiski ticama saistība, tomēr jāatzīmē, ka asins paraugi tika atlasīti, sākot ar 2009. gadu.

Papildus, izvērtējot ekspresijas intensitāti, paraugi tika iedalīti trīs grupās: pirmajā tika iekļauti seši paraugi ar vāju segmentālu intensitāti, vidējā Ikaros ekspresija šajā grupā bija 32% (standarta deviācija (SD) – 17); otrajā grupā tika iekļauti divdesmit deviņi paraugi ar vidēju (mērenu) segmentālu intensitāti, ar vidējo proteīna ekspresiju 64% (SD – 17) un trešajā grupā tika iekļauti divdesmit deviņi paraugi, kuriem tika identificēta totāla ekspresija, ar vidējo proteīna ekspresiju 91% (SD – 17). Četriem pacientiem proteīna ekspresijas līmenis bija nulle, līdz ar to viņi netika iekļauti grupu sadalījumā pēc intensitātes.

Salīdzinot savā starpā visas trīs grupas, statistiski ticama atšķirība tika atklāta starp pirmo un trešo grupu indivīdiem – ar vāju ekspresijas intensitāti bija zemāks ekspresijas līmenis salīdzinājumā ar indivīdiem, kuriem bija augsta ekspresija, $p < 0,1 \times 10^{-3}$. Statistiskās atšķirības attēlotas 3.6. attēlā.



3.6. att. Ikaros proteīna ekspresijas intensitātes salīdzinājums ar ekspresijas līmeni

Lai novērtētu Ikaros proteīna deficītu arī ne somatiskajās šūnās, indivīdiem, kuriem tika novērots ekspresijas līmenis, kurš zemāks par trīsdesmit procentiem kaulu smadzeņu paraugos un indivīdiem, kuriem nebija pieejami kaulu smadzeņu paraugi, tika veikta imūnhistoķīmiskā analīze perifēro asiņu paraugos – visos gadījumos bija vērojams ekspresijas pieaugums vismaz par 30%, bet vienā gadījumā – pat par 98%. Paraugiem, kuriem nebija pieejami kaulu smadzeņu paraugi, ekspresijas līmenis perifērās asinīs bija lielāks par piecdesmit procentiem.

Lai gan nav zināma normālas proteīna ekspresijas norma kaulu smadzenēs un perifērās asinīs, jādoma, ka ekspresijas līmeņa relatīvais pieaugums visos paraugos liecina, ka ekspresiju ietekmējošās izmaiņas ir notikušas somatiskajās šūnās.

Veicot gēna *IKZF1* sekvenēšanu otrajā eksonā (pirmajā proteīnu kodējošajā eksonā) un trešajā eksonā, netika atrastas nekādas sekvenču izmaiņas, šie abi eksoni ir obligāti visās proteīna izoformās. Analizējot sekvenču, tika

izvērtēti arī apkārtējie simts līdz divsimt introna nukleotīdi, pieguļošās secības gan 5' virzienā, gan 3' virzienā. Analizējot pirmo un otro eksonu, alēliskie varianti netika identificēti.

Sekvenējot ceturto, piekto, sesto un septīto eksonu, alēliskie varianti eksonos netika identificēti. Analizējot tuvāk esošos introna nukleotīdus, tika identificēti astoņi dažādi alēliskie varianti, kuru pamatā ir viena nukleotīda punktveida nomainīšana: rs74412507 (MAF A = 5,6%), rs113125091 (MAF T = 6,7%), rs7789106 (MAF C = 3,9%), rs113962761 (MAF T = 16,88%), rs56278999 (MAF T = 27,27%), rs199614380 (MAF T = 2,6%), rs150440917 (MAF A = 1,3%) un rs4132098 (MAF A = 5,6%) un viens alēliskais variants, kur notikusi timīna insercija – indels rs72334180.

Lai izvērtētu alēlisko variantu iespējamo klīnisko nozīmi, tika analizēta to iespējamā iesaiste procesēšanā, izmantojot programmu *Human Splicing finder* (Desmet et al., 2009). Diviem no alēliskajiem variantiem tika konstatēta iespējama saistība ar pārveidotu procesēšanu. Pirmais no tiem ir alēliskais variants rs7789106, kad C alēles gadījumā introna *silencera* saits tiek pārrauts, šādu rezultātu iegūst, analizējot pēc diviem noteikšanas algoritmiem, nosakot: 1) intronu identitātes elementus, kas ļauj atpazīt intronus (Zhang et al., 2008); 2) eksonu splaisinga regulatorās secības (Goren et al., 2006). Otrs alēliskais variants, kurš varētu būt iesaistīts pārveidotā procesēšanā, ir rs199614380, kad T alēles gadījumā rodas jauns donora saits, arī šo atradni apstiprina divi dažādi splaisa saitu analīzes algoritmi (Desmet et al., 2009; Eng et al., 2004).

Analizējot rs199614380 un rs7789106, MAF bija mazāks par pieciem procentiem, un, saskaņā ar literatūras datiem, reti sastopamiem viena nukleotīda alēliskajiem variantiem statistiskais spēks (nozīmīgums) nav pietiekams, īpaši ja paraugu skaits ir ierobežots (Gorlov et al., 2008). Tāpēc šiem alēliskajiem variantiem satopamības biežums kontroles grupā netika analizēts.

Timīna insercija deviņdesmit trīs nukleotīdus pirms sestā eksona sākuma datu bāzē *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) atrodama ar references numuru rs72334180, kurai nav zināms biežums.

Pētījuma grupā šī insercija konstatēta 24,68% jeb 19 indivīdiem no 77. Saskaņā ar potenciālo splaisa saita identificētāju programmas *Human Splicing finder* (Desmet et al., 2009) datiem *consensus* varbūtība (CV), ka šajā vietā iespējams procesēšanas saita zarošanās (*branch*) punkts ir 52,82%. Kontroles grupā rs72334180 sastopamības biežums bija 16%, statistiski ticama atšķirība starp pētījuma un kontroles grupu netika atrasta (OR 1,72; 95%CI 0,77 – 3,86, p vērtība = 0,18).

Analizējot gēna *IKZF1* astoto eksonu, tika identificēti divi sinonīmi varianti. Pirmais no tiem bija rs61731355, NM_006060.5:c.1002C>A, NP_006051.1:p.Pro334=.

Pacientiem ar ALL šis variants tika identificēts trīsdesmit vienā alēlē, A alēles biežums bija 20,13%. Kontroles grupā tika analizēti septiņdesmit septiņi pēc vecuma un dzimuma atbilstoši indivīdi, kuriem A alēle tika identificēta septiņpadsmit alēlēs – 11,04%. A alēles sastopamības biežums pētījuma grupā bija statistiski ticami atšķirīgs no kontroles grupas (OR 2,03; 95%CI 1,03 – 4,05, p vērtība = 0,04).

Pēc datu bāzē *Human Splicing Finder* (Desmet et al., 2009) pieejamās informācijas, A alēles gadījumā potenciālais eksona splaisinga *enhancers* (ESE) tiek pārrauts, kā rezultātā potenciāli var tikt traucēta pēdējā introna “izgriešana” vai arī veidojas jauns eksona identitātes elements (Liu et al., 2000; Zhang et al., 2008). ESE pārrāvuma noteikšanai tika izmantota *Cartegni* un kolēģu izstrādātā matrice proteīnam SF2/ASF, *consensus* vērtība mainās no 76,41 uz 86,43, sliekšnis 72,98.

Otrs analizētais sinonīmais variants bija rs61731356, NM_006060.5:c.1176C>T, NP_006051.1:p.Asn392=. Pētījuma grupā T alēle identificēta septiņās alēlēs (4,54%). Kontroles grupā variants tika identificēts

deviņās alēlēs. T alēles sastopamības biežums pētījuma un kontroles grupā nebija statistiski ticami atšķirīgs. Analizējot tā iespējamo ietekmi uz procesēšanu, tika konstatēts, ka, ja citozīns tiek nomainīts ar timīnu, izmainās potenciālais akceptora saits –CCCGAGCAACAGCT ar CV 79,6 uz cccgagcaatagCT ar CV 71,92 Δ CV 9,65%, ja jaunais akceptoru saits ir aktīvs, tādā gadījumā eksonā var iztrūkt 328 nukleotīdi.

Ņemot vērā Ikaros proteīna lielo nozīmi limfocītu diferenciācijā, gēna *IKZF1* eksonu delēciju analīze tika veikta vienīgajam pacientam, kuram akūta ALL attīstījās līdz viena gada vecumam. Ar MLPA metodi delēcijas netika konstatētas.

4. DISKUSIJA

Akūta limfoblastu leikoze ir biežākā ļaundabīgā saslimšana bērnu vecumā (*Tharnprisan et al.*, 2013). Tās etioloģija joprojām nav pilnībā izpētīta, tā tiek uzskatīta kā multifaktoriāla slimība, kuras attīstībā loma ir ģenētiskai predispozīcijai un vides faktoru mijiedarbībai (*Y Yan et al.*, 2014). Šajā pētījumā pirmo reizi Latvijas populācijā analizēti gēnu alēliskie varianti, kuriem iepriekš aprakstīta saistība ar palielinātu akūtas B limfoblastu priekšteču šūnu leikozes attīstības risku.

Pētījumā iekļautas divas gēnu alēlisko variantu grupas; pirmajā no tām analizēti alēliskie varianti, kuri iepriekš aprakstīti GWAS, papildus ietverot gēna *ARID5B* trešajā intronā lokalizētos alēliskos variantus, jo tas raksturots kā “karstais punkts” saistībā ar ALL attīstības risku (*Gutierrez-Camino et al.*, 2013). Otrajā grupā analizēti alēliskie varianti, kas saistīti ar ksenobiotiķu metabolismu, šajā grupā analizēta arī mātes genotipa iespējamā ietekme uz ALL attīstības risku, jo pēc literatūras datiem, ņemot vērā, ka saslimstības pīķis vērojams vecumā no diviem līdz pieciem gadiem, patoloģijas etiopatogēnēzē varētu būt loma vides faktoru iedarbībai jau intrauterīni (*Nousome et al.*, 2013).

Pētījumā iekļauti trīs gēnā *IL15* lokalizētie alēliskie varianti, kuriem iepriekš aprakstīta saistība ar leikozes attīstības risku pieaugušo vecumā (*D Lin et al.*, 2010). Papildus tika analizēts viens alēliskais variants gēnā *PAX5*, kas potenciāli saistīts ar leikozes attīstības risku ģimenēs (*Shah et al.*, 2013).

Ņemot vērā iepriekš literatūrā aprakstīto Ikaros proteīna lomu limfocītu diferenciācijā un leikozes patogēnēzē (*Heizmann et al.*, 2013), šajā pētījumā pirmo reizi mēģināts izvērtēt gēna *IKZF1* alēlisko variantu nozīmi ne-somatiskajās šūnās, kā arī noteikt Ikaros proteīna ekspresijas līmeni gan leukemoīdās šūnās, gan leukocītos remisijas brīdī.

Pētījumā iekļauti pacienti sākot no 2005. gada, kad kļuva iespējams diferencēt B šūnu leikozi no T šūnu leikozes, ņemot vērā, ka B un

T limfocītiem ir nedaudz atšķirīgs diferenciācijas ceļš un tajā iesaistīti gēni (*Kalia et al.*, 2006). Šajā pētījumā iekļauti tikai pacienti ar B limfocītu priekšteču šūnu leikozi. Tomēr paraugu kolekcija tika uzsākta 2009. gadā, kad jau bija miruši deviņi no iepriekš diagnosticētiem pacientiem, kas samazināja iekļauto pacientu skaitu, kā arī varēja ietekmēt rezultātu ticamību gadījumos, kad tika analizēta predispozīcija akūtai limfoblastu leikozei, recidīva un mirstības saistība ar alēliskajiem variantiem.

Pētījuma lielākais ierobežojums bija ierobežotais pacientu skaits, lai gan pētījumā atteicās piedalīties tikai septiņi pacienti (vai viņu vecāki), kas sastāda 8,33% no visiem pētījuma veikšanas laikā dzīvi esošiem un bez kaulu smadzeņu transplantācijas esošiem indivīdiem, pētījumā iekļauto indivīdu skaits ir septiņdesmit septiņi.

Jāatzīmē, ka pētījumā, galvenokārt, atteicās piedalīties pacienti (vai viņu vecāki), kam leikoze diagnosticēta pirms vairākiem gadiem un atteikšanās iemesls, galvenokārt, bija emocionāla vēlēšanās nebūt vairs saistītiem ar leikozes diagnozi. Neskatoties uz to, ka tie bija tikai 8,33% no kopējās populācijas, šiem pacientiem bija garš notikumiem brīvais periods un arī šis fakts varētu ietekmēt rezultātu ticamību, kas attiecas uz recidīva un mirstības saistību ar gēna alēliskajiem variantiem. Tomēr pētījumā neiekļauto pacientu proporcija, kura bija miruši un kuriem ilgstoši nebija recidīvs bija līdzīgs, varam izdarīt pieņēmumu, ka šis faktors pētījuma rezultātus iespaidoja nenozīmīgi.

Pētījumā iekļauti Latvijas iedzīvotāji, tomēr pacienti nav dalīti pēc tautības, jo vairākos gadījumos bērniem nebija nosakāma piederība vienai tautībai, jo bērni bija no jauktām ģimenēm, vienam no pētījumā iekļautiem bērniem tēvs bija meksikānis, bet vēl vienam ēģiptietis. Šis faktors varētu ietekmēt rezultātus, īpaši analizējot gēna alēliskos variantus, kuriem raksturīgi atšķirīgi sastopamības biežumi starp populācijām.

Vēl viens no faktoriem, kurš apgrūtina rezultātu izvērtēšanu ir tas, ka nav pieejami pētījumu dati par gēnu alēlisko variantu sastopamību un iespējamo saistību ar ALL attīstības risku Lietuvā un Igaunijā, kuras ir tuvākās kaimiņvalstis.

4.1. Alēliskie varianti, kas lokalizēti gēna *ARID5B* 3.intronā

Gēna *ARID5B* funkcija joprojām nav pilnībā skaidra, pēc iepriekš veiktiem pētījumiem zināms, ka gēns pieder transkripcijas faktoru saimei un tam ir nozīmīga loma embrija attīstībā, šūnu tipam specifisko gēnu ekspresijā un šūnu augšanas regulācijā. Kā arī zināms ka *knock-out* pelei izveidojas nepareiza tīmusa un liesas uzbūve, kā arī ir traucēta B šūnu diferenciācija, tomēr precīzs darbības mehānisms nav zināms. GWAS tika atklāts, ka trešajā intronā lokalizētie alēliskie varianti ir saistīti ar paaugstinātu leikozes attīstības risku, īpaši hiperdiploīdas leikozes gadījumos, taču, sekvenējot trešo un ceturto eksonu šajā reģionā, netika atrasts neviens kodējošs alēliskais variants (*Trevino et al.*, 2009). Vēlāk rezultāti replicēti dažādās populācijās, tajā skaitā arī mūsu pētījumā Latvijas bērnu populācijā. Kopumā šajā pētījumā pierādīta ALL attīstības riska saistība ar astoņiem gēna *ARID5B* trešajā intronā lokalizētajiem gēna alēliskajiem variantiem, sešiem no tiem literatūrā aprakstīta saistība ar ALL. Interesanti, ka diviem no alēliskajiem variantiem (rs10821938 un rs10994982) šajā pētījumā nebija statistiski ticama saistība gadījuma – kontroles pētījuma modelī, bet ģimeņu pētījuma modelī un, apvienojot hibrīdmodelī, statistiskā ticamība apstiprinājās, jādoma, ka viens no iespējamiem skaidrojumiem ir mazā pētījuma grupa un relatīvi vājā atsevišķā alēliskā varianta ietekme.

Visplašāk ir analizēti gēna alēliskie varianti rs10821936, rs10994982 un rs7089424 (*Papaemmanuil et al.*, 2009; *Trevino et al.*, 2009). Literatūrā atrodami arī dati par alēliskajiem variantiem rs10821938 (*Vijayakrishnan et al.*,

2010), rs7896246 un rs7923074 (*H Xu et al.*, 2012) saistību ar ALL. Pēc pašreizējās informācijas šis ir pirmais pētījums, kurā analizēta un pierādīta alēlisko variantu rs10821937 un rs7908445 saistība ar ALL attīstības risku.

Šajā pētījumā papildus astoņiem gēna alēliskajiem variantiem, kuri lokalizēti “karstajā punktā” analizēti divi alēliskie varianti, kuru MAF < 5%, jo tie atradās analizējamās sekvenču ietvaros. Lai gan kopumā tika izanalizētas 598 alēles, analizējot alēlisko variantu rs12246030, G alēle netika identificēta nevienam indivīdam. Pēc literatūras datiem, balstoties uz 1000 genomu projekta pirmajā fāzē iegūtajiem datiem, alēliskā varianta retāk sastopamā alēle ir G, kuru sastop 3% gadījumu (*Abecasis et al.*, 2012). Jādomā šī ir kā pētījuma blakus atradne, kas liecina, ka būtu interesanti, ja Latvijas iedzīvotāju ģenētiskā informācija tiktu iekļauta alēlisko variantu sastopamības biežuma izpētē. Tomēr šī pētījuma ietvaros šī atradne neļauj izdarīt nekādus būtiskus secinājumus.

Interesanti, ka šie alēliskie varianti analizēti arī saistībā ar probandu dzimumu un iegūtie dati ir ļoti neviennozīmīgi. Divos pētījumos tika konstatēts, ka gēna alēliskā varianta riska alēle biežāk saistīta ar meiteņu dzimumu (*Gutierrez-Camino et al.*, 2013). Savukārt, citos publicētos pētījumos netika novērotas riska alēles sastopamības biežuma atšķirības starp dzimumiem (*Lautner-Csorba et al.*, 2013) un ir pētījumi, kuru rezultāti sakrīt ar mūsu pētījuma rezultātiem, ka riska alēles biežums vairāk saistīts ar zēnu dzimumu (*Healy et al.*, 2010). Šie nevienlīdzīgie pētījumu rezultāti liecina par to, ka, visticamāk, dzimumam nav liela loma ar gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu saistībai ar leikozes attīstības risku.

Salīdzinoši maz tiek arī pētīta gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu saistība ar ALL attīstības vecumu, visticamākais tas saistīts tieši ar to, ka relatīvi maz ir zināms par šī gēna darbības mehānismu. Literatūrā atrodams viens pētījums, kurā norādīts, ka riska alēle biežāk sastopama bērniem, kuriem leikoze attīstās līdz piecu gadu vecumam un retāk sastopama bērniem, kuriem leikoze attīstās pēc desmit gadu vecuma (*Evans et al.*, 2014). Šajā pētījumā tika

analizēta trešajā intronā lokalizēto alēlisko variantu potenciālā saistība ar vēlīnu leukozes attīstības risku, tas ir pēc desmit gadu vecuma, bet statistiski ticama saistība netika atrasta.

Literatūrā apraksta varianta rs10821936 C alēles saistību ar hiperdiploidiju (*Trevino et al.*, 2009). Mūsu pētījumā, analizējot izolēti tikai šo alēlisko variantu, šāda saistība netika atrasta. Veicot haplotipu analīzi, varēja novērot, ka T alēle biežāk sastopama indivīdiem, kuriem nav novērota hiperdiploidija, kas būtībā sakrīt ar pētījumos publicētajiem datiem. Jāatzīmē, ka, veicot statistisko analīzi, kurā tika salīdzināta genotipa iespējamā saistība ar hromosomu skaitu leukemoīdās šūnās, analīzē tika iekļauta informācija par 64 indivīdiem, citoģenētiskā analīze nebija pieejama trīspadsmit indivīdiem, kas vēl vairāk samazināja analizējamo grupu, tādējādi iegūtā statistiskā ticamība jāvērtē kritiski.

Analizējot alēliskos variantus atsevišķi gadījuma – kontroles modelī un ģimeņu pētījumā, rezultāti būtiski neatšķīrās, tomēr haplotipu analīzē rezultātu ticamība – izredžu attiecība un p vērtība starp abiem pētījuma modeļiem atšķīrās ar augstāku ticamību ģimeņu pētījuma modelī. Pēc literatūras datiem ģimeņu pētījuma modelim ir lielāks statistiskais spēks retu slimību gadījumā, salīdzinājumā ar gadījuma – kontroles modeli (*De et al.*, 2013), lai gan mūsdienās arvien vairāk literatūras avotu haplotipu analīzei iesaka abu modeļu kombināciju, lai palielinātu statistisko spēku (*Wen et al.*, 2014), kas arī veikts šajā pētījumā. Otrkārt, katrā no pētījuma modeļiem iekļauts atšķirīgs indivīdu skaits, jo, analizējot ģimeņu pētījumu modeli, bija pieejamas tikai piecdesmit pilnas triādes, savukārt gadījuma – kontroles modelī tika analizēti septiņdesmit septiņu indivīdu genotipi un simt divdesmit divu kontroles indivīdu genotipi.

Analizējot haplotipus, tika novērots, ka haplotipus, kuriem bija visaugstākā statistiskā ticamība saistībā ar ALL, bija iekļauts alēliskais variants rs10821936 un/vai alēliskais variants rs7923074, kas attiecīgi nozīmē, ka, balstoties uz relatīvo risku, salīdzinājumā ar kontroles grupu indivīdiem ar

alēlisko variantu rs7923074 leikozes attīstības risks pieaug par 1,37 reizēm, bet indivīdiem ar alēlisko variantu rs10821936 – 1,16 reizes.

Pētījuma rezultāti replicē iepriekš publicētos rezultātus par gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu saistību ar ALL risku, tomēr neļauj izprast darbības mehānismu, kā šie alēliskie varianti varētu būt saistīti ar ALL patoģenēzi.

4.2. Gēnos *CEBPE*, *IKZF1* un *CDKN2A* lokalizētie alēliskie varianti

Viens no aprakstītajiem alēliskajiem variantiem, kurš ir saistīts ar paaugstinātu leikozes attīstības risku bērniem, ir gēnā *CEBPE* lokalizētais alēliskais variants rs2239633, lai gan GWAS pētījumos saistība ar ALL risku bija vājāka salīdzinājumā ar gēnos *ARID5B* un *IKZF1* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem $p = 2,88 \times 10^{-7}$ (Papaemmanuil et al., 2009). GWAS rezultāti tika replicēti vairākos pētījumos un, veicot meta-analīzes pētījumu, kurā tika analizētas vienpadsmit publikācijas, visciešākā saistība ar ALL risku bija spāņu izcelsmes rases indivīdiem un eiropēdās rases pārstāvjiem, bet, lai arī statistiskie rezultāti bija ticami, tomēr izredžu attiecības 95% CI bija 1,09 – 1,30. Šajā pētījumā statistiski ticama saistība starp gēna *CEBPE* alēlisko variantu un ALL risku netika iegūta nevienā no pētījuma modeļiem, atšķirību iemesls varētu būt alēliskā varianta relatīvi vājā ietekme uz ALL attīstības risku, kā arī populāciju atšķirības. Ģeogrāfiski vistuvākā populācija, kurā tika analizēta šī alēliskā varianta ietekme uz ALL attīstības risku, bija poļu. Neskatoties uz to, ka poļu kolēģu veiktajā pētījumā iekļauto pacientu skaits bija daudz lielāks, salīdzinājumā ar mūsu, viņi analizēja trīssimt deviņdesmit astoņu pacientu genotipus, tomēr arī viņu pētījumā ALL risks nebija statistiski ticams ar variantu rs2239633 (Pan et al., 2014; Pastorczak et al., 2011).

Interesanti rezultāti tika iegūti, analizējot gēnā *IKZF1* lokalizēto alēlisko varianta rs4132601 G alēli, kura ir riska alēle ar biežumu 29,4%, alēles biežums

sakrīt ar literatūras datiem, balstoties uz 1000 genomu projekta pirmajā fāzē iegūtajiem datiem Eiropas populācijā $MAF = 31\%$ (*Abecasis et al.*, 2012). Tomēr, lai gan GWAS un visos veiktajos replikācijas pētījumos alēliskais variants bija statistiski ticami saistīts ar paaugstinātu ALL risku, mūsu veiktajā pētījumā saistība neapstiprinājās. Tomēr jāatzīmē, ka visos pētījumos pētītā populācija bija lielāka. Tikai vienā pētījumā, kurš veikts Taivānā, iekļauto pacientu skaits bija septiņdesmit deviņi, statistiski ticama saistība netika atrasta (*CY Lin et al.*, 2014). Ar vislielāko varbūtību jādodomā, ka mazā pētījuma grupa ir iemesls rezultātu nesakrītībai. Tomēr pastāv neliela varbūtība, ka arī šī alēliskā varianta saistība ar ALL vērojama etniskā atšķirība.

Mūsu pētījumā identificētā alēliskā varianta saistība ar mātes genotipu, kad alēliskais variants homozigotiskā stāvoklī mātes genotipā palielina ALL attīstības risku bērnam, šāda saistība iepriekš nav publicēta.

Analizējot Ikaros proteīna ekspresijas līmeni kaulu smadzeņu šūnās, netika atrasta saistība ar ekspresijas līmeni un gēna alēliskā varianta rs4132601 genotipu, šis bija pirmais mums zināmais pētījums par proteīna ekspresijas līmeņa saistību ar genotipu.

Literatūrā atrodams vienīgi pētījums, kurā identificētas devas atkarīga mRNS ekspresijas līmeņa atšķirības atkarībā no genotipa, riska alēle bija saistīta ar zemāku mRNS ekspresiju (*Papaemmanuil et al.*, 2009).

Literatūrā ir atrodami pierādījumi gēnā *CDKN2A* lokalizētā alēliskā varianta rs3731217 saistībai ar ALL attīstības risku, šis alēliskais variants iniciāli identificēts vācu populācijā, pētījumā, kurā, lai noskaidrotu jaunus iespējamus riska variantus trīsdesmit četriem alēliskiem variantiem, tika replicēti genoma plašos pētījumos iegūtie dati. Vēlāk alēliskais variants rs3731217 tika analizēts spāņu, ungāru un kanādiešu populācijā (*Sherborne et al.*, 2010). Mūsu pētījumā neizdevās replicēt alēliskā varianta saistību ar paaugstinātu ALL risku. Publicētajos pētījumos no Polijas un Taizemes, kur mēģināts replicēt šo datu saistību ar ALL risku, arī neizdevās pierādīt

(Pastorczak et al., 2011; Vijayakrishnan et al., 2010). Jādomā, ka, ja šo gēna alēlisko variantu neizdevās identificēt jau pirmajos GWAS pētījumos, asociācija ar ALL risku nav ļoti cieša.

4.3. Gēna *PAX5* ģenētiskais variants

Izolētos gadījumos akūta limfoblastu leikoze tiek aprakstīta arī kā monogēna patoloģija, piemēram, Lī Fraumeni sindroma gadījumā. Bērniem ar ALL tiek aprakstīta mutācija gēnā *TP53* heterozigotiskā stāvoklī ne – somatiskajās šūnās (Felix, Nau, et al., 1992). Tomēr literatūrā ir aprakstītas ģimenes, kurās pēc ciltskoka datiem jādomā par ALL kā mendelējošu pazīmi, *TP53* mutācijas tiek atrastas tikai somatiskajās šūnās, tātad ar vislielāko varbūtību šajās ģimenēs leikoze vai nu nav pārmantota, vai to izraisījusi mutācija citā gēnā (Felix, D'Amico, et al., 1992).

Šobrīd ģimenēs ar ALL ir atrasta alēliskā variācija p.Gly183Ser gēnā *PAX5*, kura pārmantojas autosomāli dominantī ar nepilnīgu penetranci, lai attīstītos akūta leikoze, nepieciešams heterozigotitātes zudums, kas, galvenokārt, rodas, jo otrā alēlē veidojas devītās hromosomas izohromosoma, kuras veidošanās rezultātā tiek zaudēts devītās hromosomas īsais plecs (Shah et al., 2013).

Pacientiem, kam diagnoze uzstādīta pirms ilgāka laika, tika noteikta tikai Filadelfijas hromosomas klātbūtne. Starp indivīdiem, kuriem veikta detalizēta citogēnētiska izmeklēšana, tikai vienā gadījumā konstatēta 9. hromosomas īsā pleca delēcija, bet pacienta vecāki atteicās piedalīties pētījumā.

Ņemot vērā gēna izpausmes nepilnīgo penetranci, p.Gly183Ser klātbūtne tika noteikta visiem probandiem. Jo pacientu vecāku un pētnieku galvenā interese ir vērsta tieši uz iespējamo monogēno ALL pārmantošanas risku, jo ne-somatisko šūnu mutāciju gadījumā nepieciešamības gadījumā iespējams pielietot prenatalo diagnostiku.

Nevienam no pārbaudītajiem indivīdiem šis ģenētiskais variants netika identificēts, neskatoties uz to, ka ģimenes anamnēzē vairākām ģimenēm bija saslimšanas gadījumi ar leikozi, tomēr apakštips netika precizēts, un vienam bērnam ģimenes anamnēzē brālis nomira neiroblastomas dēļ, bet vēl vienam indivīdam mātei bija agrīns *exitus letalis* leikozes dēļ, tips nav precīzi zināms.

Nākotnē būtu vēlams veikt *PAX5* gēna pilnu sekvenēšanu bērniem ar ALL, lai varētu izvērtēt ALL attīstības risku sībiem.

4.4. Gēnā *IL15* lokalizētie alēliskie varianti rs10519612, rs10519613 un rs17007695

Literatūrā atrodamas arvien vairāk publikācijas saistībā ar alēliskajiem variantiem rs10519612, rs10519613 un rs17007695 un ALL attīstības risku pieaugušajiem. Ēģiptē veiktajā pētījumā tika pierādīta statistiski ticama saistība ar visiem trim alēliskajiem variantiem, bet B šūnu leikozei tieši ar gēna alēliskā variantu rs17007695 genotipiem CT un CC (*Aly et al.*, 2015).

Bērnu populācijā ir identificēta saistība ar *IL15* gēna alēliskajiem variantiem rs10519612, rs10519613 un rs17007695, un minimālo reziduālo slimību (MRD). Mūsu pētījumā 33. dienā MRD bija tikai diviem pacientiem, tāpēc statistiskā apstrāde netika veikta, jo šiem datiem būtu tikai informatīvs raksturs.

Pētījumos alēliskie varianti rs10519612 un rs10519613 tiek aplūkoti atsevišķi, bet mūsu pētījumā šie alēliskie varianti atradās gandrīz pilnīgā saistībā $r^2 = 0,97$. Analizējot haplotipus alēliskajiem variantiem, haplotipiem no biežāk sastopamām alēlēm ALL attīstībā bija protektīva loma, pieaugušo populācijā retāk sastopamā alēle bija riska alēle, līdz ar to pētījumu rezultāti nav pretrunīgi ar iepriekš veiktajiem (*D Lin et al.*, 2010). Lai pilnīgāk spriestu par iespējamo interleikīna nozīmi akūtas leikozes etioloģijā, nepieciešami plašāki pētījumi, kuros analizēti genotipi bērniem.

4.5. Alēliskie varianti gēnos, kas iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā

4.5.1. Gēnā *MDR1* lokalizētie alēliskie varianti rs1045642 un rs2032582

Neskatoties uz GWAS identificētajiem alēliskajiem variantiem, akūtas leikozes etioloģija joprojām nav pilnīgi skaidra un joprojām tiek uzskatīts, ka ksenobiotiķu metabolismā iesaistītajiem proteīniem varētu būt loma akūtas limfoblastu leikozes attīstībā (*Nousome et al.*, 2013). Literatūrā atrodama hipotēze, ka P glikoproteīna alēliskie varianti var saistīties ar atšķirīgu uzņēmību pret ārvides karcinogēniem un samazinātas enzīma aktivitātes gadījumā novest pie paaugstināta audzēju attīstības riska (*Semsei et al.*, 2008).

Analizējot gēnā *MDR1* lokalizēto alēlisko variantu rs1045642, šajā pētījumā netika identificēta varianta saistība ar paaugstinātu leikozes risku, kas ir saskaņā ar jaunāko meta-analīzes pētījumu. Meta-analīzes pētījumā analizēti kopumā deviņi pētījumi, kuros kopumā iekļauti 1462 akūtas leikozes pacienti un 1522 kontroles indivīdi, un identificēts, ka alēliskā varianta rs1045642 T alēle homozigotiskā stāvoklī saistīta ar paaugstinātu leikozes attīstības risku tikai aziātiem, bet ne eiropēidās rases pārstāvjiem (*Yue et al.*, 2015). Šie rezultāti, savukārt, varētu būt saistīti ar alēlisko variantu sastopamības biežuma atšķirībām starp populācijām (*Leal-Ugarte et al.*, 2008).

Analizējot alēlisko ne-sinonīmo ģenētisko variantu rs2032582, tika identificēta G alēle kā potenciāli protektīva alēle, bet, ņemot vērā, ka statistiskā ticamība tika zaudēta homozigotiskā stāvoklī, rezultāti vērtējami kritiski. Rezultātu ticamību atbalsta tas, ka G alēle homozigotiskā stāvoklī saistīta ar agrāku leikozes sākšanās vecumu, kas kopumā asociējās ar labāku prognozi. G alēle kā potenciāli protektīva tika identificēta arī meta-analīzes pētījumā, tomēr kopumā šajā meta-analīzes pētījumā tika analizēta gan akūtas mieloīdas leikozes pacienti, gan ALL pacienti, diferencējot subtipu, un statistiskā

ticamība tika balstīta, galvenokārt, uz p vērtību, un vairākos gadījumos izredžu attiecības ticamības intervāls nebija vērtējams, tāpēc šajā gadījumā kritiski vērtējami literatūras dati (Y Yan *et al.*, 2014).

Mūsu pētījumā, analizējot alēlisko variantu rs2032582, nevienam indivīdam A alēle netika identificēta homozigotiskā stāvoklī, bet heterozigotiskā stāvoklī tā identificēta kā potenciāla riska alēle. Literatūrā A alēles nozīmīgums tiek analizēts tikai atsevišķos pētījumos, kuros nav atrasta statistiski ticama saistība ar leikozes attīstības risku un A alēli, kā arī nav identificēti iespējamie riska haplotipi (Semsei *et al.*, 2008; Urayama *et al.*, 2007).

Apvienojot identificētos genotipus alēliskajiem variantiem rs1045642 un rs2032582 Latvijas populācijā bērniem, kuri slimojuši ar ALL, varianta rs2032582 A alēle un T alēle alēliskajam variantam rs1045642 veido riska haplotipu.

Statistiski analizējot ģimeņu pētījuma modeļa datus, identificēta mātes genotipa saistība ar ALL attīstības risku – haplotipa TT gadījumā samazinās bērna risks saslimt ar ALL. Šis ir pirmais pētījums, kurā analizēta mātes genotipa saistība ar bērna ALL attīstības risku. Tomēr, ņemot vērā, ka leikozes attīstības pirmsākumi ir jau intrauterīni, mātes ksenobiotiku metabolismā iesaistīto proteīnu aktivitāte var ietekmēt leikozes attīstības pirmos posmus jau intrauterīni.

4.5.2. Gēnā *MTHFR* lokalizētie alēliskie varianti rs1801131 un rs1801133

Neskatoties uz to, ka pēdējos gados ir veikti daudz pētījumi, kuros ir analizēti gēnā *MTHFR* lokalizēto alēlisko variantu rs1801131 un rs1801133 iespējamā saistība ar ALL attīstības risku, rezultāti joprojām ir pretrunīgi. Lai gan vairums pētījumu kohorta ir vairākas reizes lielāka salīdzinājumā ar šo pētījumu, tomēr ir arī pētījumi ar mazām kohortām, piemēram, pētījumā, kurā iekļauti deviņdesmit astoņi pacienti, un pretēji šim pētījumam indivīdiem ar

genotipu (AC+CC) alēliskā varianta rs1801131 gadījumā ir 1,1 reizi lielāks risks saslimt ar leikozi salīdzinājumā ar indivīdiem, kuru genotips ir AA (*X Li et al.*, 2014).

Atsevišķi pētījumi norāda uz etniskajām atšķirībām alēlisko variantu sastopamības biežumā, kas varētu ietekmēt dažādo pētījumu rezultātu pretrunīgumu (*Giovannetti et al.*, 2008). Tomēr jāatzīmē, ka veiktie meta-analīzes pētījumi vairāk norāda uz alēliskā varianta rs1801133 saistību ar ALL attīstības risku baltās rases pārstāvjiem, bet ne aziātiem (*Jiang et al.*, 2013).

Diemžēl, ļoti maz ir zināms par gēnā *MTHFR* lokalizēto alēlisko variantu saistību ar ALL Austrumeiropā. Pētījumā, kas veikts Slovēnijā, tika analizēta alēlisko variantu saistība ar recidīva risku, bet ne ar primāras leikozes attīstības risku (*Karas Kuzelicki et al.*, 2009).

Literatūrā atrodamie dati par mātes genotipa nozīmi gēnos, kas kodē enzīmus folāta metabolisma ceļā, arī ir pretrunīgi (*Lupo et al.*, 2012), un publikācijas ir salīdzinoši mazāk skaita ziņā. Tomēr mūsu pētījums parāda, ka, ja mātei ir neizmainīta gēna *MTHFR* kodētā enzīma aktivitāte, bērnam ir mazāks risks saslimt ar akūtu leikozi salīdzinājumā ar mātēm, kurām ir samazināta enzīma aktivitāte. Sievietēm grūtniecības pirmajā trimestrī tiek rekomendēts uzņemt papildus folskābi nervu caurulītes defektu riska samazināšanai (*Cordero et al.*, 2015). Papildus folskābes lietošana grūtniecības laikā potenciāli varētu samazināt akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku bērnam, tomēr šīs hipotēzes apstiprināšanai būtu nepieciešami papildus pētījumi.

4.5.3. Gēnu *GSTT1* un *GSTM1* delēcijas

Šajā pētījumā netika atrasta statistiski ticama saistība ar akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku un delēcijām glutaciona S transferāzes gēnos teta un mī. Šo delēciju analīzes pamatā ir metode, kura neļauj izšķirt

delēciju heterozigotiskā formā no normas varianta. Diagnostikās metodes ierobežojumi neļāva analizēt alēļu nodošanu/pārmantošanu ģimeņu pētījuma modelī, kā arī izvērtēt alēles sastopamības biežumu, jādoma, ka tas varēja ietekmēt kopējos rezultātus attiecībā uz *GSTT1* un *GSTM1* gēnu delēciju nozīmi ALL attīstībā.

Analizējot meta-analīzes pētījumus attiecībā uz abiem šiem gēniem, tiek norādīts, ka delēcijas ir nozīmīgāk vērtējamās aziātu starpā nekā baltās rases pārstāvju vidū (*Moulik et al.*, 2014; *ZH Tang et al.*, 2014; *LY Xu & Cao*, 2014).

4.5.4. Gēnā *NQO1* lokalizētais alēliskais variants rs1800566

Interesanti ir rezultāti, analizējot alēlisko variantu rs1800566, kurš lokalizēts gēnā *NQO1*, šis ir ne-sinonīms variants, kad T alēles gadījumā aminoskābe prolīns tiek nomainīta ar serīnu. Saskaņā ar literatūras datiem, homozigotiska genotipa gadījumā enzīms pilnībā zaudē savu aktivitāti. Tā sastopamības biežums eiropēidās rases pārstāvju vidū ir četri līdz pieci procenti (*Larson et al.*, 1999). Pētījuma grupā šis variants homozigotiskā stāvoklī tika identificēts tikai vienam indivīdam, kas atbilst 1,29%, bet kontroles grupā pieciem indivīdiem, kas atbilst četriem procentiem, rezultāti nav statistiski ticami atšķirīgi.

Meta-analīzes pētījums parāda, ka T alēle homozigotiskā stāvoklī saistīta ar paaugstinātu leikozes attīstības risku bērniem (*C Li & Zhou*, 2014), tomēr rezultātu nesakritība jāvērtē kritiski, jo analizētās pacientu grupas ir ģeogrāfiski tālu lokalizētas no Latvijas, tuvākās no tām Eiropā – Itālijā un Lielbritānijā, kā arī pētījumos plaši analizēti pacienti tieši ar agrīnu ALL attīstību *MLL* pozitīvi, tātad līdz 18 mēnešu vecumam (*Infante-Rivard et al.*, 2007), protams, jāņem vērā arī nelielais pētījumā iekļautais pacientu skaits.

4.6. Gēna *IKZF1* secība un proteīna ekspresijas līmenis

Ikaros proteīnam ir viena no galvenajām lomām leikocītu diferenciācijā praktiski visos leikocītu attīstības etapos. Ikaros trūkums B šūnu priekšteču stadijā apstādina diferenciāciju (*Yoshida & Georgopoulos, 2014*). Pētījumos ar pelēm ir pierādīta Ikaros proteīna deficīta saistība ar leikozes attīstību (*Masuda, 2011*). Analizējot izmaiņas somatiskajās leukemoīdajās šūnās, apmēram 20 – 30% gadījumu atrod mutācijas *IKZF1* gēnā (*Dupuis et al., 2013*). Piemēram, gēnam *PAX5*, kura secības izmaiņas ir raksturīgas leukemoīdās šūnās, novērotas arī mutācijas ne-somatiskajās šūnās (*Shah et al., 2013*).

Tāpat arī ir pierādīta 3' nekodējošā reģionā lokalizētā alēliskā varianta rs4132601 saistība ar ALL attīstības risku, tomēr precīzs mehānisms nav zināms (*Gorniak et al., 2014*).

Pēc analogijas ar gēnu *PAX5* šajā pētījumā ir analizēta gēna *IKZF1* pilna kodējošo eksonu secība septiņdesmit septiņiem probandiem. Nevienam indivīdam netika identificēta nukleotīdu nomaīņa, kas rezultējās aminoskābes nomaīņā, kas varētu būt tieši saistīta ar leikozes attīstības risku. Kā arī vienīgajam pacientam, kuram leikoze tika diagnosticēta līdz viena gada vecumam, netika identificētas delēcijas gēnā *IKZF1*. Līdz šim, nebija pieejamas publikācijas par gēna *IKZF1* alēlisko variantu nozīmi bērnu vecumā. Pētījuma veikšanas laikā tika publicēts gadījuma apraksts par 33. gestācijas nedēļā dzimušu bērnu ar iedzimtu pancitopēniju, tajā skaitā dziļu B šūnu limfopēniju un NK deficītu, un neizmainītu T limfocītu skaitu. Bērns mira 87. dzīves dienā 40 dienas pēc kaulu smadzeņu transplantācijas no multiorgānu disfunkcijas. Bērnam tika diagnosticēta *de novo* punktveida mutācija gēna *IKZF1* piektajā eksonā (*Goldman et al., 2012*).

Protams, balstoties uz vienu publikāciju, secinājumus izdarīt nav iespējams, bet arī citu publikāciju neesamība ļauj izvirzīt hipotēzi, ka gēna *IKZF1* kodējošajā daļā lokalizētajām mutācijām klīniskā simptomātika ir tik

agrīna un smaga, ka bērni mirst līdz leikozes attīstīšanās brīdim vai arī pārmantotas *IKZF1* mutācijas varētu būt bērniem, kuriem leikoze attīstās pirmajā dzīves mēnesī un ir ar ļoti sliktu prognozi. Par labu šai hipotēzi liecina arī tas, ka nevienam bērnam netika identificēta mutācija šajā gēnā, kā arī, analizējot proteīna ekspresiju bērniem, kuriem kaulu smadzenēs bija samazināts proteīna ekspresijas līmenis, tas atjaunojās remisijas brīdī perifērās asinīs.

Astotajā eksonā tika identificēti divi sinonīmi alēliskie varianti. Analizējot to nozīmi bioinformātikas rīkā *Human Splicing Finder*, gēna alēliskajam variantam rs61731355, kura sastopamības biežumā bija statistiski ticamas atšķirības starp pētījuma un kontroles grupu, bija nozīme ESE pārraušanā un jauna ESE veidošanā. Otram alēliskajam variantam rs61731356 nebija statistiski ticama atšķirība sastopamības biežumā starp pētījuma un kontroles grupu un, analizējot tā potenciālo ietekmi bioinformātikas rīkā, vērtības, kas norāda uz potenciālo akceptora saita ietekmi uz procesēšanu, bija uz robežas, jo CV bija 79,6, bet splaisa saits, sākot no CV 80, tiek uzskatīts par stipru splaisa saita variantu un ΔCV 9,65%, kas, savukārt, sākot no 10% skaitās nozīmīgs. Tomēr, lai precizētu šo pieņēmumu, būtu nepieciešami mRNS pētījumi, kas šajā pētījumā netika veikti tehnisku iemeslu dēļ. Nākotnē, veicot mRNS pētījumus, varētu izvērtēt šo sinonīmo variantu klīnisko nozīmi.

Šajā pētījumā tika aplūkots arī viens indels, kuram līdz šim nebija zināms sastopamības biežums, bet tas nebija statistiski nozīmīgi atšķirīgs starp pētījuma un kontroles grupu, kuram, jādoma nav klīniskas nozīmes.

Literatūrā jau iepriekš aprakstīts, ka gēns *IKZF1* ir augsti konservatīvs, tas, ka mūsu pētījumā neizdevās identificēt mutācijas šajā gēnā, jādoma, arī ir pierādījums tam, ka gēns ir augsti konservatīvs.

5. SECINĀJUMI

1. Izveidota pētījuma grupa no septiņdesmit septiņiem indivīdiem un piecdesmit no tiem jeb 64,94% bija pieejams abu bioloģisko vecāku ģenētiskais materiāls. Konstatēts, ka visvairāk bērnu ALL pacientu bija starp 2004. gadā dzimušajiem bērniem.
2. Analizējot pacientus pēc vecuma, leukocītu skaita diagnozes brīdī, minimālās reziduālās slimības un Filadelfijas hromosomas klātbūtnes, konstatēts, ka augsta riska grupai pieder divdesmit septiņi pacienti. Atrasts, ka analizētajam alēliskajam variantam, kas lokalizēts gēnā *MDR1*, rs2032582 G alēle ir saistīta ar leikozes attīstīšanos līdz desmit gadu vecumam, kas saistās ar labāku prognozi.
3. Atrasta statistiski ticama asociācija ar visiem astoņiem analizētajiem gēna *ARID5* 3. intronā lokalizētajiem alēliskajiem variantiem un ALL, kā arī identificēti potenciālie riska haplotipi. Pirmo reizi analizēta rs10821937 un rs7908445 saistība ar akūtas leikozes attīstības risku.
4. Ar gēnos *CEBPE*, *CDKN2A* un *IKZF1* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem rs2239633, rs3731217 un rs4132601 statistiski ticama saistība netika atrasta. Apvienojot iegūtos datus par alēliskajiem variantiem rs3731217, rs2239633, rs4132601, rs10821936 un rs10994982, tika identificētas iespējamās ALL risku palielinošās genotipu kombinācijas.
5. Gēnā *MDR1* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem identificēti riska un protektīvie haplotipi, kā arī mātes genotipa ietekme uz leikozes attīstību bērnam. Gēnā *MTHFR* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem identificēta mātes genotipa ietekme uz ALL attīstības risku. Gēnā *IL15* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem identificēti protektīvie haplotipi. Gēnos *NQO1* un *PAX5* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem, kā arī gēnu *GSTT1* un *GSTM1* delēcijām nav statistiski ticama saistība ar leikozes attīstības risku.

6. Veicot gēna *IKZF1* pilnu sekvenēšanu, patogēni alēliskie varianti nav atrasti, ir identificēti divi alēliskie varianti – rs199614380 un rs7789106; viens indels – rs72334180 un astotajā eksonā lokalizēti divi sinonīmi varianti – rs61731355 un rs61731356, kuriem ir iespējama iesaiste splaisingā. Alēliskajiem variantiem nav būtiska saistība ar proteīna ekspresijas līmeni, nevienam no indivīdiem nav konstatēts absolūts proteīna Ikaros deficīts perifērās asinīs, kas varētu liecināt par iedzimtu proteīna deficītu.

6. PUBLIKĀCIJAS

Kreile M, Rots D, Piekuse L, Cebura E, Grūtupa M, Kovalova Z, Lace B. Lack of Association between Polymorphisms in Genes MTHFR and MDR1 with Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(22):9707-11

Kreile M, Piekuse L, Rots D, Shteinberga Z, Kovalova Zh, Lace B. Analysis of possible genetic risk factors contributing to development of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Latvian population. *Arch Med Sci*.2016; 12 (3) in press

Kreile M., Piekuse L., Kovaļova Ž., Cebura E., Medne G., Grūtupa M. Akūtas pre-B šūnu limfoblastu leikozes bērnu vecumā aatīstības risks saistība ar alēliskie variantiem *MDR1* un *IKZF1* gēnā. Rīgas Stradiņa universitātes Zinātniskie raksti 2013, 391- 396 lpp

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Abecasis G. R., Auton A., Brooks L. D., et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes // *Nature*, 2012; 491: 56-65.
2. Agostini C., Trentin L., Sancetta R., et al. Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome // *Blood*, 1997; 90: 1115-23.
3. Alpman A., Ozkinay F., Tekgul H., et al. Multidrug resistance 1 (MDR1) gene polymorphisms in childhood drug-resistant epilepsy // *J Child Neurol*, 2010; 25: 1485-90.
4. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res*, 1997; 25: 3389-402.
5. Aly R. M., Taalab M. M., Ghazy H. F. Influence of interleukin-15 polymorphism on the survival of adult patients with acute lymphoblastic leukemia in Egypt // *Leuk Lymphoma*, 2015; 56: 151-6.
6. Ayaz G., Batar B., Kanigur G., et al. The association of MDR1 C3435T and G2677T/A polymorphisms with plasma platelet-activating factor levels and coronary artery disease risk in Turkish population // *Gene*, 2013; 527: 301-5.
7. Belson M., Kingsley B., Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review // *Environ Health Perspect*, 2007; 115: 138-45.
8. Cordero A. M., Crider K. S., Rogers L. M., et al. Optimal serum and red blood cell folate concentrations in women of reproductive age for prevention of neural tube defects: world health organization guidelines // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2015; 64: 421-3.
9. De G., Yip W. K., Ionita-Laza I., Laird N. Rare variant analysis for family-based design // *PLoS One*, 2013; 8: e48495.
10. Desmet F. O., Hamroun D., Lalande M., et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals // *Nucleic Acids Res*, 2009; 37: e67.
11. Dunna N. R., Vure S., Sailaja K., et al. Deletion of GSTM1 and T1 genes as a risk factor for development of acute leukemia // *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013; 14: 2221-4.
12. Dupuis A., Gaub M. P., Legrain M., et al. Biclinal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with IKZF1 mutations // *Leukemia*, 2013; 27: 503-7.
13. Eng L., Coutinho G., Nahas S., et al. Nonclassical splicing mutations in the coding and noncoding regions of the ATM Gene: maximum entropy estimates of splice junction strengths // *Hum Mutat*, 2004; 23: 67-76.
14. Evans T. J., Milne E., Anderson D., et al. Confirmation of childhood acute lymphoblastic leukemia variants, ARID5B and IKZF1, and interaction with parental environmental exposures // *PLoS One*, 2014; 9: e110255.
15. Fehniger T. A., Caligiuri M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease // *Blood*, 2001; 97: 14-32.
16. Felix C. A., D'Amico D., Mitsudomi T., et al. Absence of hereditary p53 mutations in 10 familial leukemia pedigrees // *J Clin Invest*, 1992; 90: 653-8.

17. Felix C. A., Nau M. M., Takahashi T., et al. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia // *J Clin Invest*, 1992; 89: 640-7.
18. Giovannetti E., Ugrasena D. G., Supriyadi E., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and thymidylate synthase promoter (TSER) polymorphisms in Indonesian children with and without leukemia // *Leuk Res*, 2008; 32: 19-24.
19. Goldman F. D., Gurel Z., Al-Zubeidi D., et al. Congenital pancytopenia and absence of B lymphocytes in a neonate with a mutation in the Ikaros gene // *Pediatr Blood Cancer*, 2012; 58: 591-7.
20. Goren A., Ram O., Amit M., et al. Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers // *Mol Cell*, 2006; 22: 769-81.
21. Gorlov I. P., Gorlova O. Y., Sunyaev S. R., et al. Shifting paradigm of association studies: value of rare single-nucleotide polymorphisms // *Am J Hum Genet*, 2008; 82: 100-12.
22. Gorniak P., Pastorczak A., Zalewska-Szewczyk B., et al. Polymorphism in IKZF1 gene affects age at onset of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leuk Lymphoma*, 2014;
23. Gutierrez-Camino A., Lopez-Lopez E., Martin-Guerrero I., et al. Intron 3 of the ARID5B gene: a hot spot for acute lymphoblastic leukemia susceptibility // *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013; 139: 1879-86.
24. Hanson N. Q., Aras O., Yang F., Tsai M. Y. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease // *Clin Chem*, 2001; 47: 661-6.
25. Healy J., Richer C., Bourgey M., et al. Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Haematologica*, 2010; 95: 1608-11.
26. Heizmann B., Kastner P., Chan S. Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals // *J Exp Med*, 2013; 210: 2823-32.
27. Hunger S. P., Loh M. L., Whitlock J. A., et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia // *Pediatr Blood Cancer*, 2013; 60: 957-63.
28. Inaba H., Greaves M., Mullighan C. G. Acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet*, 2013; 381: 1943-55.
29. Infante-Rivard C., Vermunt J. K., Weinberg C. R. Excess transmission of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism in families of children with acute lymphoblastic leukemia // *Am J Epidemiol*, 2007; 165: 1248-54.
30. Jain M., Pandey P., Tiwary N. K., Jain S. MTHFR C677T polymorphism is associated with hyperlipidemia in women with polycystic ovary syndrome // *J Hum Reprod Sci*, 2012; 5: 52-6.
31. Jiang Y., Hou J., Zhang Q., et al. The MTHFR C677T polymorphism and risk of acute lymphoblastic leukemia: an updated meta-analysis based on 37 case-control studies // *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013; 14: 6357-62.

32. John S. W., Weitzner G., Rozen R., Scriver C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes // *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 408.
33. Jugessur A., Shi M., Gjessing H. K., et al. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia // *PLoS One*, 2009; 4: e5385.
34. Kalia V., Sarkar S., Gourley T. S., et al. Differentiation of memory B and T cells // *Curr Opin Immunol*, 2006; 18: 255-64.
35. Karas Kuzelicki N., Milek M., Jazbec J., Mlinaric-Rascan I. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL) // *Leuk Res*, 2009; 33: 1344-8.
36. Kim Y. O., Kim M. K., Woo Y. J., et al. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics // *Seizure*, 2006; 15: 67-72.
37. Kimura Y., Selmi C., Leung P. S., et al. Genetic polymorphisms influencing xenobiotic metabolism and transport in patients with primary biliary cirrhosis // *Hepatology*, 2005; 41: 55-63.
38. Kondo S., Sturgis E. M., Li F., et al. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and risk of salivary gland carcinoma // *Int J Clin Exp Med*, 2009; 2: 68-75.
39. Larson R. A., Wang Y., Banerjee M., et al. Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia // *Blood*, 1999; 94: 803-7.
40. Lautner-Csorba O., Gezsi A., Erdelyi D. J., et al. Roles of genetic polymorphisms in the folate pathway in childhood acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian relevance and effect size analysis // *PLoS One*, 2013; 8: e69843.
41. Leal-Ugarte E., Gutierrez-Angulo M., Macias-Gomez N. M., et al. MDR1 C3435T polymorphism in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia and in healthy individuals // *Hum Biol*, 2008; 80: 449-55.
42. Li C., Zhou Y. Association between NQO1 C609T polymorphism and acute lymphoblastic leukemia risk: evidence from an updated meta-analysis based on 17 case-control studies // *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014; 140: 873-81.
43. Li X., Liao Q., Zhang S., Chen M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms with the susceptibility of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in Chinese population // *Eur J Med Res*, 2014; 19: 5.
44. Lin C. Y., Li M. J., Chang J. G., et al. High-resolution melting analyses for genetic variants in ARID5B and IKZF1 with childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility loci in Taiwan // *Blood Cells Mol Dis*, 2014; 52: 140-5.
45. Lin D., Liu C., Xue M., et al. The role of interleukin-15 polymorphisms in adult acute lymphoblastic leukemia // *PLoS One*, 2010; 5: e13626.
46. Liu H. X., Chew S. L., Cartegni L., et al. Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions // *Mol Cell Biol*, 2000; 20: 1063-71.
47. Llaudo I., Colom H., Gimenez-Bonafe P., et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study // *Transpl Int*, 2013; 26: 177-86.

48. Lupo P. J., Noursome D., Kamdar K. Y., et al. A case-parent triad assessment of folate metabolic genes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Causes Control*, 2012; 23: 1797-803.
49. Masuda S. More on NK-cell and B-cell deficiency with a thymic mass // *N Engl J Med*, 2011; 364: 1979-80; author reply 80-1.
50. Mejia-Arangure J. M., Fajardo-Gutierrez A., Flores-Aguilar H., et al. Environmental factors contributing to the development of childhood leukemia in children with Down's syndrome // *Leukemia*, 2003; 17: 1905-7.
51. Milne E., Greenop K. R., Metayer C., et al. Fetal growth and childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the childhood leukemia international consortium // *Int J Cancer*, 2013; 133: 2968-79.
52. Misra V., Grondin A., Klamut H. J., Rauth A. M. Assessment of the relationship between genotypic status of a DT-diaphorase point mutation and enzymatic activity // *Br J Cancer*, 2000; 83: 998-1002.
53. Moulik N. R., Parveen F., Kumar A., Agrawal S. Glutathione-S-transferase polymorphism and acute lymphoblastic leukemia (ALL) in north Indian children: a case-control study and meta-analysis // *J Hum Genet*, 2014; 59: 529-35.
54. Mullighan C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012; 2012: 389-96.
55. Mullighan C. G., Goorha S., Radtke I., et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia // *Nature*, 2007; 446: 758-64.
56. Noursome D., Lupo P. J., Okcu M. F., Scheurer M. E. Maternal and offspring xenobiotic metabolism haplotypes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leuk Res*, 2013; 37: 531-5.
57. Pan Y., Chen H., Liang H., et al. Meta-analysis of the association between CCAAT/enhancer binding protein-epsilon polymorphism and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Int J Clin Exp Med*, 2014; 7: 5553-7.
58. Papaemmanuil E., Hosking F. J., Vijayakrishnan J., et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Nat Genet*, 2009; 41: 1006-10.
59. Pastorczak A., Gorniak P., Sherborne A., et al. Role of 657del5 NBN mutation and 7p12.2 (IKZF1), 9p21 (CDKN2A), 10q21.2 (ARID5B) and 14q11.2 (CEBPE) variation and risk of childhood ALL in the Polish population // *Leuk Res*, 2011; 35: 1534-6.
60. Payne K. J., Dovat S., Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia // *Crit Rev Oncog*, 2011; 16: 3-12.
61. Pui C. H., Robison L. L., Look A. T. Acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet*, 2008; 371: 1030-43.
62. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am J Hum Genet*, 2007; 81: 559-75.
63. Redaelli A., Laskin B. L., Stephens J. M., et al. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL) // *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2005; 14: 53-62.

64. Rosner B. Fundamentals of biostatistics // 6th ed. Published: Thomson-Brooks/Cole, 2006. -
65. Safarinejad M. R., Shafiei N., Safarinejad S. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T, A1298C and G1793A polymorphisms: association with risk for clear cell renal cell carcinoma and tumour behaviour in men // Clin Oncol (R Coll Radiol), 2012; 24: 269-81.
66. Seghatoleslam A., Monabati A., Bozorg-Ghalati F., et al. Expression of UBE2Q2, a putative member of the ubiquitin-conjugating enzyme family in pediatric acute lymphoblastic leukemia // Arch Iran Med, 2012; 15: 352-5.
67. Semsei A. F., Erdelyi D. J., Ungvari I., et al. Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia // Leuk Res, 2008; 32: 1214-20.
68. Shah S., Schrader K. A., Waanders E., et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia // Nat Genet, 2013; 45: 1226-31.
69. Sherborne A. L., Hosking F. J., Prasad R. B., et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk // Nat Genet, 2010; 42: 492-4.
70. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics, 2014 // CA Cancer J Clin, 2014; 64: 9-29.
71. Sterjev Z., Trencavska G. K., Cvetkovska E., et al. The association of C3435T single-nucleotide polymorphism, Pgp-glycoprotein gene expression levels and carbamazepine maintenance dose in patients with epilepsy // Neuropsychiatr Dis Treat, 2012; 8: 191-6.
72. Tang Q., Li J., Zhang S., et al. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and childhood acute leukemia risk: evidence from 26 case-control studies // PLoS One, 2013; 8: e78810.
73. Tang Z. H., Zhang C., Cheng P., et al. Glutathione-S-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and acute leukemia risk in Asians: a meta-analysis // Asian Pac J Cancer Prev, 2014; 15: 2075-81.
74. Tharnprisan P., Khiewyoo J., Sripraya P., Wiangnon S. Relapse-free rate with childhood acute lymphoblastic leukemia treated under the Thai national protocol // Asian Pac J Cancer Prev, 2013; 14: 1127-30.
75. Trevino L. R., Yang W., French D., et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia // Nat Genet, 2009; 41: 1001-5.
76. Urayama K. Y., Chokkalingam A. P., Metayer C., et al. SNP association mapping across the extended major histocompatibility complex and risk of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children // PLoS One, 2013; 8: e72557.
77. Urayama K. Y., Wiencke J. K., Buffler P. A., et al. MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007; 16: 1172-7.
78. Vijayakrishnan J., Sherborne A. L., Sawangpanich R., et al. Variation at 7p12.2 and 10q21.2 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk in the Thai population and may contribute to racial differences in leukemia incidence // Leuk Lymphoma, 2010; 51: 1870-4.

79. Wang H., Wang J., Zhao L., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia-evidence from an updated meta-analysis including 35 studies // BMC Med Genet, 2012; 13: 77.
80. Wen S. H., Tsai M. Y. Haplotype association analysis of combining unrelated case-control and triads with consideration of population stratification // Front Genet, 2014; 5: 103.
81. Williams M. T., Yousafzai Y., Cox C., et al. Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia // Blood, 2014; 123: 3116-27.
82. Winandy S., Wu P., Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma // Cell, 1995; 83: 289-99.
83. Woo J. S., Alberti M. O., Tirado C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update // Exp Hematol Oncol, 2014; 3: 16.
84. Xu H., Cheng C., Devidas M., et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia // J Clin Oncol, 2012; 30: 751-7.
85. Xu L. Y., Cao L. F. GSTT1 genetic polymorphism and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis // Tumour Biol, 2014; 35: 1433-7.
86. Yan J., Yin M., Dreyer Z. E., et al. A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children // Pediatr Blood Cancer, 2012; 58: 513-8.
87. Yan Y., Liang H., Xie L., et al. Association of MDR1 G2677T polymorphism and leukemia risk: evidence from a meta-analysis // Tumour Biol, 2014; 35: 2191-7.
88. Yang S., Jin T., Su H. X., et al. The Association between NQO1 Pro187Ser Polymorphism and Bladder Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of 15 Studies // PLoS One, 2015; 10: e0116500.
89. Yoshida T., Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation // Int J Hematol, 2014; 100: 220-9.
90. Yousefian E., Kardi M. T., Allahveisi A. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphism in Iranian Women With Idiopathic Recurrent Pregnancy Losses // Iran Red Crescent Med J, 2014; 16: e16763.
91. Yue Q., Xiong B., Chen L., et al. MDR1 C3435T polymorphism and childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility: an updated meta-analysis // Biomed Pharmacother, 2015; 69: 76-81.
92. Zhang C., Li W. H., Krainer A. R., Zhang M. Q. RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination // Proc Natl Acad Sci U S A, 2008; 105: 5797-802.