

Madara Kreile

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

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – pediatrija

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med. **Baiba Lāce**

Rīga, 2015

ANOTĀCIJA

Akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze (ALL) ir biežākā ļaundabīgā saslimšana bērnu vecumā. Lai gan šobrīd astoņdesmit procentos gadījumu bērni tiek sekmīgi ārstēti, tomēr joprojām ļoti maz ir zināms par akūtas limfoblastu leikozes etioloģiju. Šobrīd tiek uzskatīts, ka tā ir multifaktoriāla patoloģija, kas attīstās, mijiedarbojoties ģenētiskiem un ārvides faktoriem. Pētījumos arvien lielāka uzmanība tiek pievērsta ģenētisko faktoru analīzei, kas, pēc literatūras datiem, nosaka no astoņiem līdz divdesmit pieciem procentiem no leikozes attīstības riska. Līdzās genoma plašiem asociāciju pētījumiem, kuros tiek identificēti gēna alēliskie varianti, kas paaugstina ALL attīstības risku bērniem, joprojām tiek analizēti arī alēliskie varianti, kas ietekmē proteīnu aktivitāti gēnos, kas ietekmē ksenobiotiķu metabolismu.

Promocijas darba ietvaros analizēti septiņdesmit septiņi indivīdi, kuri slimojuši ar akūtu B limfoblastu priekšteču šūnu leikozi laika posmā no 2005. gada līdz 2014. gada jūnijam un ārstējušies Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas hematoonkoloģijas nodaļā. Diagnozes uzstādīšanas brīdī pacientu vecums bijis no vienpadsmit mēnešiem līdz astoņpadsmit gadiem. Pētījumā iekļautā pacientu grupa aptver 91,67% no dzīvi esošiem ALL pacientiem, kas slimojuši minētajā laika periodā. Lai izvērtētu ģenētisko marķieru iespējamo saistību ar ALL, izveidoti divi dažādi pētījuma modeļi: gadījuma – kontroles un ģimeņu pētījuma modelis, kurš iekļauj sevī pacientu un viņa bioloģiskos vecākus, kā arī statistiskā spēka palielināšanai abi modeļi analizēti vienlaicīgi, izmantojot hibrīdmetodi.

Izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju un tai sekojošu restrikcijas fragmentu garuma polimorfismu analīzi vai sekvenēšanas reakciju, pētījumā iekļautajiem indivīdiem analizēti iepriekš genoma plašos asociāciju pētījumos identificētie gēna alēliskie varianti, kas lokalizēti gēnos *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE* un *CDKN2A*, kā arī indivīdiem veikta alēlisko variantu analīze gēniem, kuri iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā – *MTHFR*, *MDR1*, *GSTT1*, *GSTM1* un *NOQ1*. Papildus tika analizēti alēliskie varianti gēnā *IL15*, kuru saistība ar ALL iepriekš aprakstīta tikai pieaugušo populācijā, un viena mutācija gēnā *PAX5*, kuras gadījumā ALL pārmantojas kā mendelējoša pazīme ar nepilnīgu penetranci. Darba novitāte ir promocijas darba ietvaros veiktā gēna *IKZF1* sekvenēšana un proteīna Ikaros ekspresijas analīze.

Veiktā pētījuma ietvaros konstatēts, ka visvairāk bērnu ALL pacientu bija starp 2004. gadā dzimušajiem bērniem. Analizējot genotipus saistībā ar ALL augstu risku, konstatēts, ka vienīgais alēliskais variants, kuram ir saistība ar augsta riska grupas leikozi, ir rs2032582, kurš atrodas gēnā *MDR1*. Atrasta statistiski ticama asociācija ar visiem astoņiem analizētajiem gēna *ARID5* 3. intronā lokalizētajiem alēliskajiem variantiem un ALL, kā arī

identificēti potenciālie riska haplotipi. Šajā gēnā pirmo reizi analizēta rs10821937 un rs7908445 saistība ar akūtas leikozes attīstības risku. Apvienojot iegūtos datus par alēliskajiem variantiem rs3731217, rs2239633, rs4132601, rs10821936 un rs10994982, tika identificētas iespējamās ALL risku palielinošās genotipu kombinācijas. Analizējot ksenobiotiķu metabolismā iesaistītos gēnus, gēnā *MDR1* lokalizētajiem polimorfismiem 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. Savukārt, gēnā *IL15* lokalizētajiem alēliskajiem variantiem identificēti protektīvie haplotipi.

Veicot gēna *IKZF1* pilnu sekvenēšanu, patogēnas mutācijas netika atrastas, tika identificēti pieci alēliskie varianti – rs199614380, rs7789106, rs72334180, rs61731355 un rs61731356, kuriem iespējama iesaiste splaisingā. Tiem nebija būtiska saistība ar proteīna ekspresijas līmeni, nevienam no indivīdiem netika konstatēts absolūts proteīna līkaros deficīts perifērās asinīs, kas varētu liecināt par iedzimtu proteīna deficītu.

ANNOTATION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. More than 80% of children diagnosed with ALL can be cured with current multiagent regimens. Despite numerous studies very little is still known about etiology of ALL. It is thought that initiation of leukemogenesis occurs during fetal life or in early infancy and is likely caused by interactions between exogenous or endogenous exposures, genetic (inherited) susceptibility. The heritable basis of susceptibility to ALL is further supported by recent candidate gene and genome wide association studies (GWAS), suggesting that co-inheritance of multiple germline variants may contribute to the risk of the disease. One potentially important genetic pathway suspected in playing a role in childhood ALL is xenobiotic metabolism.

Our cohort consisted of 77 patients with childhood B cell progenitor cells ALL in complete remission, and 122 age and gender adjusted healthy controls. In addition, parental DNA was available for 50 probands. Patients were diagnosed with ALL between 2005 and 2014, aged 0-18 years at that time. Our study covered 91.67% of all patients. To separate study models case – control and case – parent study was used to analyse genetical factors which might contribute risk of childhood leukaemia. To increase statistical power hybrid model, was used to analyse results from both models at once.

To analyse previously described polymorphisms from GWAS and polymorphisms which are involved in xenobiotic metabolism by decreasing enzyme activity polymerase chain reaction with subsequent restriction fragment length polymorphism analysis was performed, or polymorphisms were analysed by sequencing reaction. During this study in total twenty two polymorphisms were analysed located in genes: *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, *MTHFR*, *MDR1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *NOQ1*, *IL15* and *PAX5*. This is a first time when full *IKZF1* gene sequencing was performed to search germline mutations as well as Ikaros expression analysis.

As a result we found out that most frequently affected children are born in the 2004. Between the analysed polymorphisms only polymorphism rs2032582 located in gene *MDR1* might be associated with development of high risk leukaemia. Polymorphisms located in gene *ARID5B* were strongly associated with increased leukaemia risk, so were their haplotypes. This is the first study were possible association between polymorphisms rs10821937 and rs7908445 and leukaemia was investigated. These results replicate results from previous studies, but cannot explain mechanism how pathogenesis of leukaemia can be influenced by these single nucleotide polymorphisms.

During this study we identified possible risk combinations of polymorphisms rs3731217, rs2239633, rs4132601, rs10821936 and rs10994982 which might contribute susceptibility of leukaemia. Analysis of polymorphisms in genes *MDR1* and *MTHFR* showed some risk and protective haplotypes, as well pointed out influence of mother genotype. Analysis of *IL15* showed some protective haplotypes.

We could not identify any pathogenic mutations in gene *IKZF1* but we were able to discover some genetical variants which might affect splicing activity, two of them were polymorphisms rs199614380 and rs7789106, one was indel rs72334180, and two of them were located in exon 8, they were synonyms variants rs61731355 and rs61731356. None of the investigated polymorphisms show association with protein level and none of the children in complete remission had total lack of this protein.

SATURS

Anotācija	2
Anotation	4
Darbā lietotie saīsinājumi	8
1. IEVADS	10
1.1. Darba aktualitāte	10
1.2. Darba hipotēze	11
1.3. Darba zinātniskā novitāte	11
1.4. Darba mērķis	11
1.5. Darba uzdevumi	11
1.6. Darba praktiskā nozīme	12
1.7. Promocijas darba apjoms un struktūra	12
2. LITERATŪRAS APSKATS	13
2.1. Normāla B limfocītu attīstība un tajā iesaistītie gēni	13
2.2. Ikaros proteīns	15
2.2.1. Ikaros funkcijas	17
2.3. Vēsturiski fakti	20
2.4. Epidemioloģija	20
2.5. Klīniskie simptomi un raksturīgās laboratorās izmaiņas ALL gadījumā	21
2.6. Diagnostika	23
2.7. Diferenciāldiagnoze	24
2.8. Ārstēšana	25
2.9. Komplikācijas	26
2.10. Prognoze	27
2.11. Recidīvs	28
2.12. Etiopatoģenēze	28
2.12.1. Citoģenētiskās izmaiņas lekemoīdās šūnās	29
2.12.2. Submikroskopiskas ģenētiskas izmaiņas	31
2.12.3. Genoma plašos asociāciju pētījumos identificētie alēliskie varianti ...	33
2.12.4. Alēliskie varianti gēnos, kas iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā	35
2.12.5. Citi faktori, kas potenciāli ietekmē akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku	39
3. MATERIĀLS UN METODES	41
3.1. Materiāls	41
3.2. Metodes	42
3.2.1. Ģenētisko marķieru atlase	42
3.2.2. DNS izdalīšana no venozajām asinīm	43
3.2.3. Polimerāzes ķēdes reakcija	44
3.2.4. Restrikcijas fragmenta garuma polimorfisma noteikšana	45
3.2.5. Sekvēšanas reakcijas veikšana	48
3.2.6. Kaulu smadzeņu imūnhistoķīmiskā analīze	50
3.2.7. Asins paraugu imūnhistoķīmiskā analīze	51
3.2.8. Asins parauga analīze, lai noteiktu iespējamās gēna <i>IKZF1</i> delēcijas ...	52
3.2.9. Datu statistiskā apastrāde	52

4.	REZULTĀTI	55
4.1.	Pētījumā iekļauto akūtas limfoblastu leikozes pacientu raksturojums	55
4.2.	Gēnā <i>ARID5B</i> 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu analīze	57
4.3.	Gēnos <i>CEBPE</i> , <i>IKZF1</i> un <i>CDKN2A</i> lokalizēto alēlisko variantu analīze	65
4.4.	Gēnā <i>PAX5</i> lokalizētās ģenētiskās variācijas noteikšana	66
4.5.	Gēnā <i>IL15</i> lokalizēto alēlisko variantu rs10519612, rs10519613 un rs17007695 analīze	66
4.6.	Alēlisko variantu analīzes rezultāti, kas lokalizēti gēnos, kuri saistīti ar ksenobiotiķu metabolismu	67
4.6.1.	Gēnā <i>MDR1</i> lokalizēto alēlisko variantu rs1045642 un rs2032582 analīze	67
4.6.2.	Gēnā <i>MTHFR</i> lokalizēto alēlisko variantu rs1801131 un rs 1801133 analīze	68
4.6.3.	Gēnā <i>NQO1</i> lokalizētā alēliskā varianta rs1800566 analīze	68
4.6.4.	Delēcijas gēnos <i>GSTT1</i> un <i>GSTM1</i>	68
4.7.	<i>IKZF1</i> gēna secības un Ikaros proteīna ekspresijas analīze	69
5.	DISKUSIJA	75
5.1.	Alēliskie varianti, kas lokalizēti gēna <i>ARID5B</i> 3. intronā	76
5.2.	Gēnos <i>CEBPE</i> , <i>IKZF1</i> un <i>CDKN2A</i> lokalizētie alēliskie varianti	78
5.3.	Gēna <i>PAX5</i> ģenētiskais variants	80
5.4.	Gēnā <i>IL15</i> lokalizētie alēliskie varianti rs10519612, rs10519613 un rs17007695	81
5.5.	Alēliskie varianti gēnos, kas iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā	81
5.5.1.	Gēnā <i>MDR1</i> lokalizētie alēliskie varianti rs1045642 un rs2032582	81
5.5.2.	Gēnā <i>MTHFR</i> lokalizētie alēliskie varianti rs1801131 un rs1801133 ...	82
5.5.3.	Gēnu <i>GSTT1</i> un <i>GSTM1</i> delēcijas	83
5.5.4.	Gēnā <i>NQO1</i> lokalizētais alēliskais variants rs1800566	83
5.6.	Gēna <i>IKZF1</i> secība un proteīna ekspresijas līmenis	84
6.	SECINĀJUMI	86
7.	PUBLIKĀCIJAS	87
7.1.	Publikācijas starptautiska mēroga recenzējamās izdevumos	87
7.2.	Publikācija vietēja mēroga recenzējamās izdevumos	87
7.3.	Ziņojumi kongresos un konferencēs	87
8.	PATEICĪBAS	89
9.	IZMANTOTĀ LITERATŪRA	90
10.	PIELIKUMI	101

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ALL	– akūta limfoblastu leikoze
ARID5B	– AT bagātais interaktīvais domēnu 5B kodējošais gēns (AT rich interactive domain 5B)
BFM	– Berlīne – Frankfurte – Minstere
BKUS	– Bērnu klīniskā universitātes slimnīca
bp	– bāzu pāris
CI	– ticamības intervāls (<i>confidence interval</i>)
CMV	– citomegalovīruss
CNS	– centrālā nervu sistēma
COG	– Bērnu onkoloģijas grupa (<i>Children Oncology group</i>)
DN	– dominanti negatīvs
DNS	– dezoksiribonukleīnskābe
EBV	– Epšteina Barra vīruss
EDTA	– etilēndiamīntetraacetāts
ESE	– eksona splaisinga <i>enhancers</i>
FISH	– flouriscentā <i>in situ</i> hibridizācija
GWAS	– genoma plaši asociāciju pētījumi (<i>genome wide association studies</i>)
HIV	– cilvēka imūndeficīta vīruss (<i>Human human immunodeficiency virus</i>)
HR	– augsta riska (<i>High risk</i>)
HSC	– hematopoētiskas cilmes šūnas (<i>Haemotopoetic stem cells</i>)
IKZF1	– Ikaros saimes cinka pirkstu 1 kodējošais gēns (<i>Ikaros family zinc finger 1</i>)
IL	– interleikīns
IT	– intratekāli
LD	– nelīdzsvarotā saistība (<i>linkage disequilibrium</i>)
MAF	– retāk sastopamās alēles biežums (<i>minor allele frequency</i>)
Mb	– mega bāžu
MDR1	– P glikoproteīnu kodējošais gēns (<i>Multidrug resistance gene</i>)
MGZL	– Medicīniskās ģenētikas zinātniskā laboratorija
MLPA	– multipleksā ligācijas atkarīgā zondes amplifikācija (Multiplex ligation-dependent probe amplification)
MRD	– minimālā reziduālā slimība (<i>minimal residual disease</i>)
MTHFR	– metilēna tetrahidrofolāta reduktāze
NK	– naturālie killeri

OR	– izredžu attiecība (<i>Odds ratio</i>)
PCR	– polimerāzes ķēdes reakcija (<i>polymerase chain reaction</i>)
r^2	– korelācijas koeficients
RR	– relatīvais risks
SAP	– sārmainā fosfatāze (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
TNF	– audzēja nekrozes faktors
VDJ	– variablais, dažādības un savienošanās segments (<i>variable, diversible, joining</i>)
χ^2	– Hī kvadrāts

1. IEVADS

1.1. Darba aktualitāte

Akūta limfoblastu leikoze (ALL) ir biežākā ļaundabīgā saslimšana bērnu vecumā (*El Ansary et al.*, 2015). Ikgadējā incidence ir apmēram 9-10 jauni gadījumi uz 100 000 bērniem ar augstāko saslimstības biežumu vecumā starp diviem un pieciem gadiem (*J Yan et al.*, 2012). Vairāk nekā astoņdesmit procentos leikoze tiek sekmīgi ārstēta, tomēr joprojām daļai pacientu attīstās recidīvs un daļa pacientu nomirst (*Bhojwani et al.*, 2009).

Neskatoties uz plašajiem pētījumiem par ALL, tās etioloģija joprojām nav pilnībā izpētīta (*Healy et al.*, 2010) un tiek uzskatīts, ka ALL attīstība ir daudzpakāpju process, kas veidojās mijiedarbojoties ārvides faktoriem, piemēram, jonizējošā starojuma vai kancerogēnu vielu iedarbībai un predisponējošiem ģenētiskiem faktoriem (*Lopes et al.*, 2015). Identificēt nozīmīgus ārvides faktorus un pārmantotus gēnu alēliskos variantus un atšifrēt kā un kad tie iesaistās daudzpakāpju procesā sākot ar ALL iniciāciju (parasti *intrauterīni*) beidzot ar slimības evolūcijas procesu līdz leikozes attīstībai ir liels izaicinājums. Uzdevumu sarežģītāku padara tas, ka ALL ir relatīvi reta saslimšana un tai izšķirami bioloģiski atšķirīgi subtipi, kuriem iespējams nav vienota etioloģiskā mehānisma (*Inaba et al.*, 2013).

Šobrīd joprojām grūti izsvērt apkārtējās vides un ģenētisko faktoru īpatnību ALL etioloģijā, literatūrā atrodama viena publikācija, kurā aprēķinātā ģenētisko faktoru ietekme uz ALL attīstības risku ir astoņi līdz divdesmit pieci procenti (*Enciso-Mora et al.*, 2012). Lai identificētu ģenētiskos riska faktorus veikti vairāki genoma plaši asociāciju (GWAS) pētījumi, kuros identificēti vairāki riska reģioni – 7p12.2, 9p21.3, 10q21.2 un 14q11.2, kas modificē ALL attīstības risku un saistās ar noteiktu fenotipu (*Migliorini et al.*, 2013). Turpinot GWAS pētījumus, tiek identificēti arvien jauni ALL attīstības risku ietekmējošie reģioni, piemēram, 10p12.31-12.2 (*Deng et al.*, 2015), kas ļauj domāt, ka ģenētisko faktoru izpēte ALL etioloģijā nav noslēgusies.

Līdzās GWAS pētījumiem, joprojām tiek veikti daudz pētījumu, kuros tiek analizēta ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto gēnu alēliskie varianti, kuru nozīme īpaši varētu pieaugt ar ALL attīstības vecumu, jo pieaug ārvides faktoru ekspozīcijas laiks, kā arī ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto enzīmu aktivitātes līmenis bērna mātes organismā, kas ietekmē *intrauterīno* vidi un potenciāli varētu ietekmēt ALL attīstības risku (*Nousome et al.*, 2013).

ALL etiopatoģenēzes izpēte nākotnē ļautu vēl vairāk uzlabot terapijas efektivitāti, jo jau tagad atsevišķos gadījumos terapijas izvēle ir atakrīga no citoģenētiskās atradnes, kā piemēram Filadelfijas hromosomas pozitīviem indivīdiem, lai uzlabotu paredzamo iznākumu terapijā jāpievieno tirozīna kināzes inhibitori (*Roberts et al.*, 2014). Perspektīvā ALL

etioloģijas ģenētikas izpēte varētu veicināt riska aprēķinus ģiemens locekļiem. Šobrīd pasaulē arvien vairāk attīstās molekulārās ģenētikas metodes un to izmaksas samazinās līdz ar to ALL ģenētisko faktoru izpēte kļūst arvien akutālāka. Šis pētījums ir aktuāls jo pirmo reizi Latvijā tiek veikta gēna alēlisko variantu izpēte ALL pacientiem, kas varētu modificēt saslimšanas risku.

1.2. Darba hipotēze

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

1.3. 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.

1.4. 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.

1.5. 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.

1.6. 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 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.

1.7. Promocijas darba apjoms un struktūra

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā uz 107 lappusēm pēc klasiskas darba struktūras. Darbs strukturēts desmit nodaļās: ievads; literatūras apskats; materiāli un metodes; rezultāti; diskusija; secinājumi; publikācijas; pateicības; literatūras saraksts un pielikumi. Promocijas darbs satur 17 tabulas, 15 attēlus un 5 pielikumus. Literatūras sarakstā ir 233 autoru un autoru kolektīvu darbi.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Normāla B limfocītu attīstība un tajā iesaistītie gēni

Hematopoēze ir daudzpakāpju process, kura rezultātā attīstās asins un imūnās sistēmas šūnas, kas veidojas, diferencējoties pluripotentām hematopoētiskām cilmes šūnām (HCS).

Dzīves laikā izšķir primāro un definitīvo hematopoēzi. Primārā hematopoēze aizsākas dzeltenuma maisā, definitīvā hematopoēze aizsākas aortā – gonādās – mezonefrosā (*Pietila et al.*, 2005), pēc tam HCS migrē uz placentu un augļa aknām, vēlāk uz liesu. Pēc dzimšanas hematopoēze pārvietojas uz kaulu smadzenēm (*LD Wang et al.*, 2011) un sekundāriem limfoīdiem audiem (limfmezgliem un liesu), kur notiek limfocītu funkcionāla nobriešana (*LeBien et al.*, 2008).

HCS fizioloģijā svarīga loma ir daudziem transkripcijas faktoriem, nozīmīgākie no tiem ir: GATA saistošais proteīns 2 (GATA-2), cilmes šūnu leikēmijas hematopoētiskais transkripcijas faktors (SCL) un RUNX1 (*ar pundurismu saistītais transkripcijas faktors 1*) (*Lim et al.*, 2013; *Zhu et al.*, 2002). RUNX1 ir definitīvās hematopoēzes galvenais regulators, un tas ir nepieciešams, lai rastos HCS no hemogēnā endotēlija (*Knezevic et al.*, 2011). Hemogēnā endotēlija šūnas ir retas, diferencējušās vaskulārā endotēlija šūnas, kuru galvenā funkcija ir asinsrades šūnu radīšana (*Antas et al.*, 2013). Nepietiekams vai pārmērīgi liels RUNX1 daudzums noteiktos attīstības posmos var traucēt HCS attīstību un homeostāzi. RUNX1 funkcijas zudums var būt kā “pirmais solis” leikozes attīstībai, lai gan šis notikums viens pats nespēj izraisīt leikozi (*Knezevic et al.*, 2011).

Cilmes šūnām daloties, veidojas divas šūnu līnijas: mieloīdās rindas progenitori (MRP) un limfoīdās rindas progenitori (*LB John et al.*, 2011). Limfoīdās rindas multipotentie progenitori (MLRP) tālāk diferencējas par kopējiem limfoīdās rindas progenitoriem (KLRP), kas turpmāk spēs diferencēties par B un T limfocītiem, kā arī naturālajiem killeriem (NK).

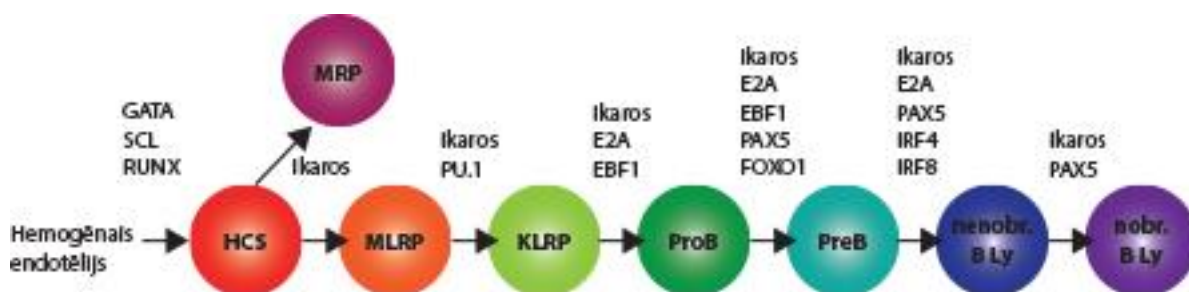
Lai limfoīdās rindas multipotentie progenitori diferencētos par kopējiem limfoīdiem progenitoriem, nepieciešama transkripcijas faktoru – Ikaros saimes cinka pirksta 1 (Ikaros) un Spi-1 protoonkogēna kodētā proteīna (PU.1) darbība. PU.1 regulē sadali starp mieloīdās un limfoīdās rindas attīstību (*Ramirez et al.*, 2010).

Kopējo limfoīdo progenitoru attīstībai seko pro-B limfocītu stadija, kuru veidošanās priekšnosacījums ir aktivēti transkripcijas faktori – E boks saistošais proteīns 2A (E2A) un agrīno B šūnu faktors 1 (EBF1).

Pētījumi pierāda, ka pelēm, kurām trūkst šie transkripcijas faktori, raksturīga B limfocītu attīstības apstāšanās pro-B limfocītu stadijā, kā arī imūnglobulīna gēnu nepārslēgšanās (*Kwon et al.*, 2008; *Zandi et al.*, 2008). Šajā posmā nozīme ir arī transkripcijas

faktoram – FOXO-1 (*Forkhead box protein O1*), kura delēcijas gadījumā tiek bloķēta pro-B limfocītu attīstība no pre-pro B limfocītiem, kā arī traucēta imūnglobulīnu smago ķēžu V(D)J pārslēgšanās, kas notiek pro-B limfocītu stadijā (*Trinh et al.*, 2013). Jaunākie pētījumi norāda FOXO-1 neapstrīdami nozīmīgo lomu B limfocītu attīstībā, nosakot to nākamo identitāti kopējo limfoīdo progenitoru stadijā, savstarpēji mijiedarbojoties ar abiem iepriekš minētajiem transkripcijas faktoriem (*Mansson et al.*, 2012).

Gēna pāra boksa gēns 5 (*PAX5*) kodētais transkripcijas faktors PAX5 sāk ekspresēties pro-B limfocītu stadijā, un tā aktivitāte saglabājas līdz nobriedušu šūnu līmenim. E2A un EBF1 kopīgas darbības rezultātā aktivē PAX5. Proteīnam ir ļoti liela nozīme limfocītu attīstībā, tas pat tiek saukts par “B šūnu identitātes sargu”. PAX5 inducē B šūnām specifisku transkripcijas programmu, kas saistās ar nepiemērotu gēnu no alternatīvām attīstības līnijām supresiju un transkripcijas faktoru, kā arī to proteīnu aktivāciju, kas ir iesaistīti B šūnu signālsistēmā, adhēzijā, migrācijā, antigēnu prezentācijā un B šūnu formēšanā, tādējādi nodrošinot tā lomu B šūnas identitātes uzturēšanā un diferenciācijā (*Barneda-Zahonero et al.*, 2012). PAX5 darbība nav kā terminēts notikums, bet tas darbojas visu B limfocīta dzīves laiku. Interesanti, ka, ja nobriedušos B limfocītos tiek inaktivēts PAX5 gēni, attīstās B limfoblastu priekšteču (pre-B) šūnu leikoze. Tas tiek skaidrots ar limfocītu atdiferenciāciju. PAX5 aktivē interferonu regulējošo faktoru 4 (IRF4) un interferonu regulējošo faktoru 8 (IRF8) (*Holmes et al.*, 2008). IRF4 un IRF8 ir nepieciešami, lai pre-B limfocīti varētu diferencēties nenobriedušos B limfocītos, jo piedalās imūnglobulīna vieglās ķēdes reorganizācijas regulācijā un ekspresijā, kas ir absolūti nepieciešams nenobriedušam B limfocītam (*Shukla et al.*, 2014). Šūnas, kas ekspresē funkcionālu B šūnu receptoru, kas satur imūnglobulīnu smagās un vieglās ķēdes, migrē uz liesu, kur pabeidz nobriešanas procesu (*Sellars et al.*, 2011). Limfoīdās rindas leukocītu attīstība un to ietekmējošie faktori attēloti 2.1. attēlā.



2.1. att. Limfoīdās rindas leukocītu attīstība

HCS – hematopoētiskās cilmes šūnas; MRP – mieloīdās rindas progenitori; MLRP – multipotentie limfoīdās rindas progenitori; KLRP – kopējie limfoīdās rindas progenitori; ProB – Pro-B limfocīts; PreB – Pre-B limfocīts; nenobried. B Ly – nenobriedis B limfocīts; nobr. B Ly – nobriedis B limfocīts. Treknrakstā norādīti transkripcijas faktori, kuri iesaistās noteiktā posmā.

Viena no galvenajām lomām limfocītu diferenciācijā ir Ikaros proteīnam, kurš tiks apskatīts atsevišķi.

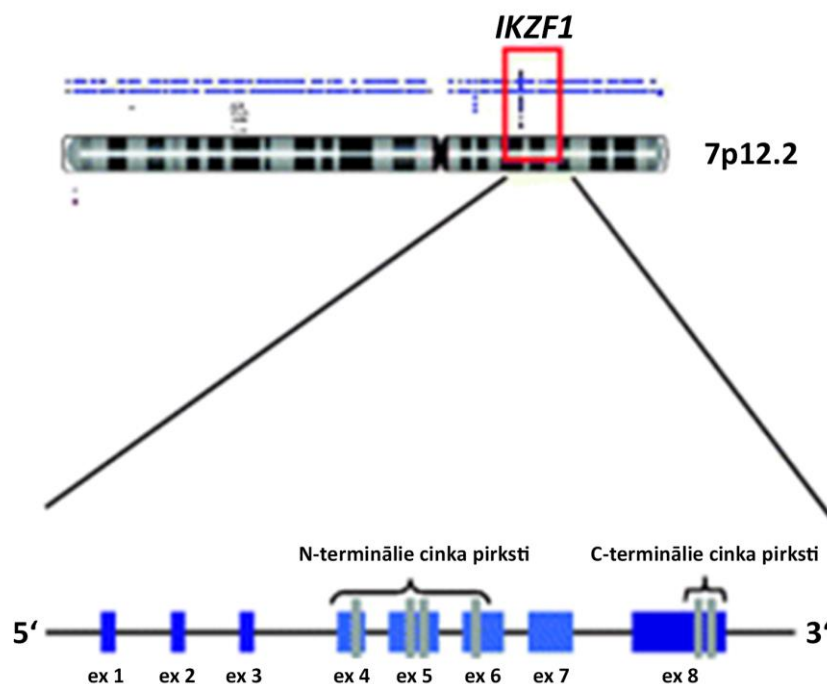
2.2. Ikaros proteīns

Ikaros un Ikaros saimes cinka pirkstu transkripcijas faktoriem ir izšķiroša nozīme hematopoēzē, galvenokārt, limfoīdās rindas nodrošinot šūnu diferenciāciju, homeostāzi un funkciju (Payne *et al.*, 2011). Zīdītājiem pie Ikaros saimes pieder pieci dažādi proteīni: Ikaros, Helios, Aiolos, Eos un Pegasus.

Aiolos ir augsti konservatīvs un ekspresējas liesā, tīmā un perifēro asiņu limfocītos. Helios ekspresējas embrionālās hematopoēzes norises vietās, vēlāk HCS, tomēr ar tendenci vairāk ekspresēties T limfocītu priekštečos, tā funkcija ir saistīta ar T limfocītu diferenciāciju. Eos ekspresējas arī skeleta muskulatūrā, sirdī, aknās, kā arī hematopoētiskos audos, tā funkcija vēl nav pilnībā izpētīta, tāpat kā Pegasus funkcija, kas, atšķirībā no pārējiem Ikaros saimes proteīniem, saistās pie citas dezoksiribonukleīnskābes (DNS) secības (LB John & Ward, 2011; LB John *et al.*, 2009; Rebollo *et al.*, 2003).

Visplašāk pētītais Ikaros saimes proteīns ir Ikaros. Ikaros ir cinka pirkstu proteīns, kuru kodē gēns Ikaros saimes cinka pirksts 1 (*IKZF1*), kas sastāv no astoņiem eksoniem. Alternatīvā splaisinga rezultātā var veidoties vienpadsmit izoformas. Proteīnam izšķir amino (N) terminālo galu, kurā ir četri cinka pirksti, un kuram ir nozīme secības TGGGAA specifiskā piesaistē pie DNS, un divi karboksil (C) galā lokalizētie cinka pirksti, kuru funkcija ir mijiedarboties ar citiem Ikaros saimes proteīniem. Gēna lokalizāciju un shematiskais atēlojumu skatīt 2.2. attēlā. Normas variantā cilvēkam ekspresējas, galvenokārt, pirmā un otrā izoforma.

Proteīni, kuriem N terminālajā galā ir mazāk par trīs cinka pirkstiem, darbojas kā dominanti negatīvi (DN) faktori, kas inhibē pilna garuma proteīna spējas saistīties pie DNS. Visplašāk pētītā un klīniski nozīmīgākā ir sestā izoforma (ik6), kuras gadījumā proteīna veidošanā neiesaistās ceturtais, piektais, sestais un septītais eksons (Capece *et al.*, 2013). Eksperimentos ar pelēm pierādīts, ja gēnam *IKZF1* nav neviena aktīva kopija, tad HCS aktivitāte samazinās trīsdesmit līdz četrdesmit reizes, savukārt, ja viena kopija ir normāla, bet otra – DN, tad HCS aktivitāte samazinās vairāk nekā simtkārtīgi (Georgopoulos, 2002). Pētījumos ar pelēm ir pierādīts, ka pelēm, kurām ekspresējas DN izoformas, attīstās smagākas fenotipiskās izpausmes nekā pelēm, kurām šī proteīna darbība ir pilnībā izslēgta. Pelēm un cilvēkiem ir pierādīts, ka DN Ikaros izoformas ir saistītas ar hematopoētiskās sistēmas un hipofīzes ļaundabīgiem audzējiem (Z Li *et al.*, 2011).



2.2. att. Gēna *IKZF1* lokalizācija 7. hromosomā un uzbūves shematiskais attēlojums

Attēls adaptēts pēc (Martinelli et al., 2009)

Ikaros proteīns ir augsti konservatīvs, 95% aminoskābes ir homologas pelēm un cilvēkiem (Molnar et al., 1996). Dažādi peļu modeļi tika izmantoti, lai pētītu Ikaros funkcijas. Pētījumi ar pelēm, kurām tika izslēgts Ikaros kodējošais gēns (*knockout*), neattīstījās B limfocīti un to prekursori, kā arī fetālie T limfocīti, lai gan pēc dzimšanas T limfocīti attīstījās normāli. Pieaugot peļu vecumam, *knockout* pelēm un pelēm, kurām ekspresējās DN izoformas, liesā samazinājās koloniju veidojošās vienības, kas liecina, ka Ikaros proteīns veicina progenitoru pašatjaunošanos. Divu līdz trīs nedēļu vecumā šīm pelēm attīstījās smaga anēmija, jo samazinājās eritroblastu normāla augšana un diferenciācija. Cits pētījums pierādīja, ka viņām paaugstinās megakariocītu un trombocītu skaits. Kopumā tas ļāva secināt, ka Ikaros proteīnam piemīt izšķiroša nozīme sabalansētā un normālā asins un imūno šūnu attīstībā (LB John & Ward, 2011).

Pelei, kurai ir heterozigotiska mutācija Ikaros proteīnu kodējošā gēnā, B un T limfocītu skaits dzīves pirmajā mēnesī ir tāds pats kā veselajiem sibiem, bet jau divu – trīs mēnešu vecumā liesā izteikti pieaug T limfocītu skaits, kā arī B limfocītu skaits. Apmēram trīs mēnešu vecumā simtprocentīgi visām pelēm vēro limfadenopātiju, kā arī limfoido orgānu obliterāciju, kuru izraisa limfoblastisku limfocītu populācijas akumulācija. Laika posmā no trīs līdz sešu mēnešu vecumam, heterozigotitātes zuduma rezultātā, visām pelēm attīstījās ar dzīvi nesavienojama leukēmija un limfoma (Winandy et al., 1995).

2.2.1. Ikaros funkcijas

Gēnu ekspresijas regulators. Ikaros var darboties gan kā transkripcijas aktivators, gan kā nomācējs. Lai regulētu gēnu transkripciju, Ikaros piesaistās pie savu mērķa gēnu pastraumes (*upstream*) regulatorajiem reģioniem. Ikaros atpazīst un saistās pie specifiskas DNS secības: TGGGAA/T (Z Li *et al.*, 2011).

Aktivējot transkripciju, tas nodrošina hematopoētisko šūnu progenitorus ar limfoīdās rindas diferenciācijas potenciālu, bet, nomācot transkripciju, Ikaros proteīns ierobežo multipotentās šūnas, kas potenciāli var attīstīties par limfoīdiem un mieloīdiem progenitoriem, nomācot šūnu līnijai nepiemērotos gēnu programmas, tajā skaitā hematopoētisko cilmes šūnu specifiskos gēnus (Georgopoulos, 2009; Yoshida *et al.*, 2014). Transkripcijas aktivācija vai nomākšana ir atkarīga arī no proteīna vai proteīna kompleksa, ar kuru Ikaros mijiedarbojas. Mehānismi, ar kuru palīdzību Ikaros nodrošina represiju, ietilpst trijās plašās kategorijās: hromatīna modifikācija, papildus represoru rekrutēšana un konkurence. Ikaros lokalizējas pericentromēriskā heterohromatīna rajonā un mijiedarbojas ar histona deacetilāzes kompleksa komponentiem, veidojot hromatīnu remodelējošu kompleksu (Sellars *et al.*, 2011). Mērķa gēni tiek rekrutēti no transkripciju atļaujošas vides uz transkripciju nomācošu vidi, respektīvi, tas saskaras ar pericentromērisko heterohromatīnu (Brown *et al.*, 1997).

Process var notikt arī otrādi, kad hromatīnu remodelējošie kompleksi tiek rekrutēti pie mērķgēniem, tādējādi “uzspiežot” tiem neaktīvo hromatīnu. Paralēli Ikaros proteīnam jākonkurē ar transkripcijas aktivatoriem (Sellars *et al.*, 2011).

Ikaros proteīns var nomākt gēnu darbību, iedarbojoties tieši, neatkarīgi no histonu deacetilāzes kompleksa, piemēram, mijiedarbojoties ar gēnu inhibētēju – C teminālo piesaistes proteīnu (Koipally *et al.*, 2000).

Mazākā Ikaros proteīna frakcija (apmēram piecas reizes mazāka) iesaistās SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) hromatīna remodelējošā kompleksā. Šis komplekss satur Brahma vai Brahma saistītā gēna 1 ATFāzes, kas nodrošina enerģiju nukleosomu slīdēšanai (*sliding*) gar DNS, atbrīvojot piesaistes vietu transkripcijas faktoriem, kas aktivē transkripciju (KL Davis, 2011).

Darbojas kā tumorsupresors. Nefunkcionējošs Ikaros proteīns ir saistīts ar akūtu limfoblastu leikozi gan bērnu, gan pieaugušo vecumā, kas norāda, ka viena no Ikaros funkcijām ir tumorsupresija. Joprojām nav zināms precīzs mehānisms, kā Ikaros regulē šūnu proliferāciju cilvēkiem. Pētījumi par Ikaros tumorsupresora aktivitāti, galvenokārt, tiek veikti ar pelēm. Pētot Ikaros aktivitāti cilvēka šūnās, tika konstatēts, ka šūnas sintēzes (S) fāzē tas ar augstu afinitāti piesaistās pie pericentromēriskā heterohromatīna, bet, salīdzinājumā ar postmitotisko (G1) fāzi, ar zemu afinitāti piesaistās pie savu mērķgēnu regulatorajiem

reģioniem, kas liecina par šūnas ciklam specifiskām funkcijām. Pētījuma autori piesaisti pericentromēriskam heterohromtīnam S fāzē skaidro ar iespējamību, ka tas nepieciešams pareizai hromatīna organizācijai DNS replikācijas laikā. Kazeīna kināze 2 (CK2) fosforilē Ikaros proteīnu, tādējādi šūnas S fāzē Ikaros proteīns nespēj saistīties pie mērķa gēna pa straumes regulējošiem reģioniem (Z Li *et al.*, 2012). Ja proteīnu hiperfosforilizē, tā līmenis samazinās, jo notiek ubikvitīna mediēta proteīna degradācija. Pārmērīgas CK2 ekspresijas gadījumā Ikaros var zaudēt savas audzēja supresora īpašības ar tam sekojošu leikozes attīstību, pat bez struktūras izmaiņām. Defosforilizāciju nodrošina proteīna fosfatāze 1 (PP1), kas palielina stabilitāti un atjauno Ikaros spēju saistīties pie DNS (Song *et al.*, 2011).

Pētot retrovīrusu inserciju peļu genomā starp piecdesmit pieciem analizētajiem gēniem, visbiežāk insercijas tika atrastas tieši Ikaros kodējošā gēnā. Veicot statistiskus aprēķinus, kuros tika izmantots intragēno inserciju biežumu, autori secina, ka Ikaros piemīt augsta tumorsupresora aktivitāte (Uren *et al.*, 2008).

Ikaros regulē ekspresiju tādām molekulām, kas kontrolē šūnas dzīves ciklu, šūnas izdzīvošanu, kas norāda uz audzēja nomācēja aktivitāti (Francis *et al.*, 2011). Piemēram, Ikaros palielina folikulīna (*Flcn*) un ar proteīna 1, kas mijiedarbojas ar folikulīnu (*Fnip1*), ekspresiju, šo proteīnu darbība ir nozīmīga šūnas enerģijas homeostāzes nodrošināšanā, bet tie ir arī būtiski B limfocītu priekšteču šūnu dzīves cikla kontrolpunktu, kurā tiek kontrolēts, vai pre-B šūnām pietiek metabolā kapacitāte, lai turpinātu dalīšanos (Heizmann *et al.*, 2013).

Nozīme imūnglobulīnu smagās ķēdes rekombinācijā. Viens no būtiskiem soļiem B limfocītu attīstībā ir imūnglobulīnu smago un vieglo ķēžu pārkārtošanās, lai nodrošinātu antivielu daudzveidību. Imūnglobulīna smagajā ķēdē DNS starp dažādības (*diversity* – D) un savienošanās (*joining* – J) segmentu tiek izdzēsts. Jaunizveidotais komplekss pievienojas vienam no mainīgajiem (*variable* – V), tie segmenti, kas vairs nav nepieciešami, tiek izdzēsti, rezultātā smagā ķēde satur V-D-J segmentus un divus konstantos segmentus C – μ un δ (C_μ un C_δ). VDJ rekombinācija tiek regulēta divos līmeņos. Pirmajā līmenī tiek regulēta rekombināciju aktivējošo gēnu 1 un 2 (*Rag1* un *Rag2*) ekspresija. Ikaros proteīns piesaistās pie *Rag* gēnu regulatorajiem reģioniem, izņemot *Rag2* promoteru, tādējādi nodrošinot histonu acetilēšanu un transkripcijas aktivāciju. Otrajā līmenī VDJ regulācijā tiek kontrolēta pieejamība imūnglobulīna segmentiem, kuri tiks pakļauti rekombinācijai. Pētījumi pierāda, ka, lai RAG proteīni sasniegtu smagās ķēdes mainīgos segmentus, ir nepieciešama Ikaros proteīna klātbūtne. Tādējādi Ikaros ir obligāts komponents, kas regulē imūnglobulīnu smago ķēžu pārslēgšanos (Reynaud *et al.*, 2008).

Iesaistās apoptozē. Pelēm ar neaktīvu Ikaros proteīnu kaulu smadzeņu eritroīdās šūnās pēc oksidatīva stresa novēroja samazinātu apoptozi salīdzinājumā ar veselām pelēm.

Savukārt, leukemoīdās šūnās, kurās ekspresējās pilna garuma Ikaros proteīns, novēro augstāku apoptozes aktivitāti nekā šūnās ar defektīvu Ikaros proteīnu, bet, ekspresējoties DN izoformām, leukemoīdās šūnas netiek pakļautas apoptozei (*Capece et al.*, 2013).

Regulē B šūnu receptoru signālsistēmu molekulārā līmenī. Pre-B šūnu signālsistēma ir būtiska, lai šūna varētu turpināt šūnas ciklu, tā defekta gadījumā šūnas ciklu turpināt nevar. Ikaros olbaltumviela kopā ar Ikaros saimes pārstāvi Aiolos ir nozīmīgas, lai terminētu B limfocītu priekšteču signālsistēmu un limfocīti varētu turpināt diferenciāciju. Ikaros proteīns iesaistās B šūnu receptoru aktivācijā (*Merkenschlager*, 2010). Šūnās, kurās nav aktīva Ikaros proteīna, fosfolipāze Cγ2 ir hipofosforilēta, kā rezultātā samazinās tās aktivitāte, kuras pilnvērtīga darbība ir nepieciešama kalcija mobilizācijas kaskādē, tādējādi novedot pie B šūnu signālsistēmas defekta. Ikaros proteīns nepieciešams gan pre-B šūnu receptora signālsistēmas terminēšanai, gan sekmīgai B šūnu receptoru signālsistēmas darbības uzsākšanai (*Nera et al.*, 2006).

Gēna *IKZF1* delēcija ir viena no biežāk sastopamajām submikroskopiskajām izmaiņām leukemoīdās šūnās, to sastopamības biežumā literatūrā atrodamas plašas variācijas sākot no apmēram 7% gadījumu (*Volejnikova et al.*, 2013) līdz 16 – 27% (*Vitanza et al.*, 2014). Analizējot citoģenētiskās izmaiņas, augstas riska grupas pacientiem delēcijas vai punktveida mutācijas biežums sasniedz pat 28,6% (*Mullighan et al.*, 2009). Analizējot gēna *IKZF1* mutāciju spektru, B limfoblastu priekšteču šūnu leukozes gadījumā identificēja, ka 15% gadījumu sastop lielas septītās hromosomas delēcijas: 15% gadījumos vēro delēciju no otrā līdz septītajam eksonam, 30% gadījumu delēciju no ceturtā līdz septītajam eksonam, bet punktveida mutācijas tikai 10% gadījumu (*Dupuis et al.*, 2013).

Analizējot gēnu ekspresijas līmeni gēna *IKZF1* delēcijas vai mutācijas gadījumā, pētnieki pierādīja, ka leukemoīdās šūnās augstā līmenī ekspresējas hematopoētisko cilmes šūnām un B šūnu priekštečiem raksturīgie gēni, bet gēni, kas raksturīgi nobriedušiem limfocītiem, netiek ekspresēti pietiekamā daudzumā, kas, pēc autoru domām, ir saskaņā ar iepriekš publicētajiem datiem, ka Ikaros ir nepieciešams limfocītu attīstībai, un DN izoformas traucē limfocītu diferenciāciju (*Mullighan et al.*, 2009).

Indivīdiem, kuriem vēro delēciju šajā gēnā, ir sliktāka prognoze nekā tiem, kuriem delēcijas nav. Analizējot notikumiem brīvo periodu un dzīvildzi, pētījumi pierāda, ka indivīdiem ar *IKZF1* delēciju ir lielāks risks recidīvam, piecu gadu notikumiem brīvais periods samazinās no 88,8% uz 62,7% , kā arī samazinās piecu gadu izdzīvošanas izredzes no 90,2% uz 71,8% (*Asai et al.*, 2013). Meta analīze, kurā iekļauti 15 pētījumi, izvērtējot riska izredzes (*hazard ratio* – *HR*), arī pierāda statistiski ticamas atšķirības notikumiem brīvā perioda samazināšanās $HR=2,32$ 95%CI 1,97–2,74 un izdzīvošanas iespējas samazināšanās

HR=2,56 95%CI 1,75–3,74 (*Jia et al.*, 2014). Šī gēna delēcijas tiek sauktas par Filadelfijas (Ph) hromosomai līdzīgo, jo saistāmas ar tikpat sliktu prognozi. Četrdesmit līdz septiņdesmit procentos gadījumu indivīdiem ar Filadelfijas hromosomu tiek atrastas delēcijas gēnā *IKZF1*. Kombinējoties abām ģenētiskajām izmaiņām, tirozīnkināzes inhibitora terapija, ko parasti izmanto pie Ph pozitīvas leikozes, var būt nesekmīga (*Woo et al.*, 2014) (*van der Veer et al.*, 2014).

Kopumā literatūras dati liecina, ka Ikaros darbojas kā klīniski nozīmīgs tumor-supresors B šūnu limfoblastu leikozē, īpaši augsta riska limfoblastu leikozes gadījumā. Pārmantoti *IKZF1* varianti ir saistīti ar ALL attīstības risku un sliktu prognozi. Pat neliela proteīna aktivitātes līmeņa samazināšanās ir spējīga sekmēt leukemoģenēzi (*Payne & Dovat*, 2011).

2.3. Vēsturiski fakti

1960. gadā tiek veikti pirmie citoģenētiskie ALL pētījumi. Jau divus gadus vēlāk tiek veikti precīzi pētījumi, kuros tiek konstatēts, ka leukemoīdas šūnas var saturēt 48 hromosomas (*Ford*, 1960). 1970. gadā pirmo reizi aprakstīja Filadelfijas hromosomas pozitīvu akūtu limfoblastu leikozi (*Propp et al.*, 1970). 1978. gadā publicēja pētījumu par hiperploīdiju akūtas limfoblastu leikozes gadījumā, kas saistīta ar ilgāku remisijas periodu (*Secker-Walker et al.*, 1978). Kopš 1981. gada ir iespējams imunoloģiski monitorēt minimālo reziduālo slimību. 1984. gadā pētnieki identificēja translokācijas (starp pirmo un deviņpadsmito hromosomu) saistību ar imūnfenotipu B limfoblastu priekšteču šūnu leikozes gadījumā (*CH Pui et al.*, 2013). 1991. gadā divas grupas neatkarīgi viena no otras atklāja, ka gēns *IKZF1* kodē Ikaros proteīnu (*Payne & Dovat*, 2011). 2007. gadā veica genoma plaša DNS kopiju skaita izmaiņu analīzi, kurā identificēja, ka somatiskās mutācijas visbiežāk skar *PAX5* gēnu (31,7% gadījumu), kā arī pirmo reizi identificēja delēciju *IKZF1* gēnā (*Mullighan et al.*, 2007). 2009. gadā pirmo reizi tika veikti genoma plaši asociāciju pētījumi, lai noteiktu iespējamo ģenētisko predispozīciju akūtai limfoblastu leikozei, kas attīstās bērnu vecumā (*Trevino et al.*, 2009).

2.4. Epidemioloģija

Akūta limfoblastu leikoze (ALL) ir visbiežāk sastopamā ļaundabīgā slimība bērnu vecumā. Pēc statistikas datiem tā sastāda 25% no ļaundabīgiem audzējiem, kas izpaužas līdz 15 gadu vecumam un 19% no audzējiem, kas manifestējas līdz 20 gadu vecumam (*Hunger et al.*, 2013). ALL raksturojas ar ļaundabīgu B vai T limfocītu priekšteču uzkrāšanos kaulu smadzenēs un/vai perifērajās asinīs. Lai gan perifērijā var notikt daļēja šūnu maturācija, kaulu

smadzenēs proliferējošās šūnas tiek apstādinātas agrīnās attīstības stadijās (*Runge et al.*, 2006). Pre-B šūnu jeb B limfocītu priekšteču akūta limfoblastu leikoze ir biežākais akūtas limfoblastu leikozes apakštips un attīstītajās valstīs sastāda apmēram 80% no visiem ALL gadījumiem (*Urayama et al.*, 2013). Saslimšanas pīķi parasti vēro bērniem vecumā no diviem līdz pieciem gadiem (*Seghatoleslam et al.*, 2012). Ikgadējā ALL incidence ir 1 – 4,75 saslimšanas gadījumiem uz 100 000 bērnu vecumā līdz 15 gadiem (*Redaelli et al.*, 2005). Nezināmu iemeslu dēļ leikozes incidence pēdējo pāris dekāžu laikā ir pieaugusi par 50% (*Runge & Patterson*, 2006).

Zīdaiņu leikozes gadījumā (leikoze, kas attīstās līdz viena gada vecumam) konkordance starp dvīņiem ir gandrīz 100% – tas nozīmē, ka leukemoģenēze ir gandrīz pabeigta un diagnoze ir nenovēršama. Vēlākā vecumā, starp diviem un pieciem gadiem, ALL konkordance starp monozigotiskiem dvīņiem ir 10 – 15%, taču konkordances līmenis samazinās, pieaugot bērna vecumam, ja leikoze nav attīstījusies līdz septiņu gadu vecumam, tad leikozes risks dvīnim ir tāds pats kā populācijā. Starp dizigotiskiem dvīņiem ļoti reti novērojami konkordanti pāri, un nav veikti pietiekami plaši pētījumi konkordances izvērtēšanai (*MF Greaves et al.*, 2003; *Orkin*). Akūtu limfoblastu leikozi biežāk sastop zēniem, aprēķinātā sastopamības biežuma attiecība starp zēniem un meitenēm Amerikas Savienotajās valstīs ir 1,35 : 1 (*Siegel et al.*, 2014). Bērnu vecumā piecu gadu izdzīvošanas iespēja ir palielinājusies no desmit procentiem, pagājušā gadsimta sešdesmitajos gados, līdz deviņdesmit procentiem mūsdienās, piecu gadu notikumiem brīvais periods sasniedz apmēram astoņdesmit procentus pacientu. Pieaugušo vecumā piecu gadu izdzīvošanas iespēja joprojām saglabājas tikai piecdesmit procenti (*Du et al.*, 2013; *JJ Yang et al.*, 2012). Salīdzinot savā starpā zēnus un meitenes, zēniem ir nedaudz sliktāka prognoze (*CH Pui et al.*, 1999), jo apmēram 2,8% gadījumu zēniem vērojams leikozes recidīvs sēkliniekos (*Kulkarni et al.*, 2010).

2.5. Klīniskie simptomi un raksturīgās laboratorās izmaiņas ALL gadījumā

Akūtai limfoblastu leikozei raksturīga prodromālā stadija, kas var ilgt vairākas nedēļas vai pat mēnešus. Bieži sākotnējie simptomi ir nespecifiski, kā drudzis (apraksta no 17% līdz 70% gadījumu), nogurums (apraksta 12 – 39% gadījumu), apetītes zudums, svīšana naktīs, viegla nobrāzumu veidošanās, asiņošana – deguna, smaganu, gastro-intestināla, bālums. Apmēram vienai trešdaļai pacientu ir sūdzības par sāpēm ekstremitātēs vai locītavās (*AS Davis et al.*, 2014; *Zombori et al.*, 2013). Pēc literatūras datiem, bērniem ar sūdzībām par muskuloskeletālām sāpēm ļaundabīgas neoplāzijas atrod 0,3 – 1% gadījumu, biežākā no tām ir akūta limfoblastu leikoze (*Goncalves et al.*, 2005). Bērniem ar ALL 67% – 75% gadījumu

atrod hepato- vai splenomegāliju, bet 60% – 75% gadījumu – limfadenopātiju (Robazzi *et al.*, 2008; Yasmeen *et al.*, 2009).

Centrālās nervu sistēmas (CNS) iesaiste vērojama pieciem līdz septiņiem procentiem no visiem pacientiem (Ma *et al.*, 1997). CNS iesaistei izšķir sešas klīniskās grupas:

1. apmēram 90% gadījumu no visām CNS iesaistes formām vērojami simptomi, kas liecina par paaugstinātu intrakraniālo spiedienu (piemēram, galvassāpes no rītiem, vemšana, sestā kraniālā nerva parēze vai optiskā diska tūska;
2. simptomātika, kas liecina par III, IV, VI, VIII kraniālo nervu inervācijas traucējumiem, un meningisms;
3. simptomi, kas liecina par smadzeņu vielas iesaisti (piemēram, hemiparēze, krampji, ataksija, hipotonija, hiperrefleksija);
4. hipotalamiski sindromi (piemēram, polifāģija, hirsutisms, uzvedības traucējumi);
5. hipofīzes iesaiste – *diabetes insipidus*;
6. ļoti retos gadījumos – muguras smadzeņu simptomātika, piemēram, transversāla mielopātija vai CNS hemorāģija (Cortes *et al.*, 1995; Lanzkowsky, 1995; Yavuz *et al.*, 2001).

Akūta limfoblastu leikoze apmēram vienā trešdaļā gadījumu var manifestēties ar oftalmoloģiskiem simptomiem, visbiežāk tā ir tīklenes hemorāģija, blastu infiltrācija – optiskajā nervā, orbītā, varavīksnenē, tīklenē, konjunktīvā. Specifisks symptoms ir *hipopion*, kad leukocīti uzkrājas acs priekšējā kambarī, kas klīniski raksturojas ar sāpēm un fotofobiju. Vēsturiski bērniem ar recidīvu apmēram 10% diagnosticēja oftalmoloģiskus simptomus, šobrīd, uzlabojoties terapijai, to biežums ir samazinājies (C-H Pui, 2012). Gadījumos, kad oftalmoloģiskie simptomi prevalē no CNS puses, klīniski tie manifestējas ar redzes miglošanos, diplopiju, ekstraokulāro muskuļu parēzēm (kraniālo nervu iesaistes dēļ), kā arī tīklenes tūska (paaugstināta intrakraniālā spiediena dēļ) (Reddy *et al.*, 1998).

Apmēram 50% no pacientiem diagnozes brīdī ir paaugstināts leukocītu skaits (CH Pui *et al.*, 2004). Hiperleikocitozes, kad leukocītu skaits ir lielāks par 50 000 mm³, sastopamības biežums diagnozes brīdī bērnu vecumā, pēc literatūras datiem, variē no sešiem līdz deviņpadsmit procentiem (Kong *et al.*, 2014). Savukārt, hiperleikocitoze, kad leukocītu skaits ir lielāks par 200 000 mm³, sastop piecos līdz astoņos procentos gadījumu (Kong *et al.*, 2014). Pacientiem ar ļoti augstu leukocītu skaitu, kurš lielāks par 400 000 mm³, ir augsts risks diseminētas intravazālas koagulopātijas attīstībai, audzēja līzes sindromam, elektrolītu vielmaiņas traucējumiem, nieru mazspējai, krampjiem un CNS hemorāģijai (Voûte, 2005).

Bieža atradne ir neitropēnija, kas ir saistāma ar augstu infekcijas risku. Apmēram 80% pacientu diagnozes brīdī vērojama anēmija, kad hemoglobīna līmenis ir zemāks par 10 g/dl,

parasti tā ir normohroma, normocitāra ar zemu retikulocītu skaitu. Trombocitopēniju, kad trombocītu skaits mazāks par $100\,000\text{ mm}^3$, vēro apmēram trīs ceturtdaļām no visiem pacientiem. Tomēr izolēta trombocitopēnija ir reta atradne (*Pizzo et al.*, 2006).

ALL diagnostiku mēdz apgrūtināt reta simptomātika, piemēram, leikozes prezentācija ar periodisku drudzi (*Koffeman et al.*, 2005) vai ciklisku neitropēniju (*Goraya et al.*, 2002).

Viens no retiem ALL prezentācijas veidiem var būt hiperkalciēmija, kas potenciāli ir dzīvību apdraudoša metabola patoloģija, kas bieži asociējas ar nespecifiskiem simptomiem, kā gastrointestināliem, sliktu dūšu, vemšanu, anoreksiju, aizcietējumiem vai svara zudumu. Bērnu vecumā hiperkalciēmija diagnozes brīdī ir salīdzinoši reti sastopama (0,4 – 1,3%), pieaugušo populācijā biežāk (pat līdz 30% gadījumu). Interesanti, ka bērni parasti ir salīdzinoši vecāki un perifērajās asinīs viņiem nav blastu. Vienā no lielākajiem publicētajiem pētījumiem, kas veikts *St Jude* bērnu klīniskajā slimnīcā, ALL inducēta hiperkalciēmija manifestācijas brīdī bija tikai 7 no 2816 pacientiem (0,25%) (*CH Pui & Evans*, 2013).

ALL var manifestēties arī ar hipereozinofīliju, kas parasti asociējas ar subfebrilu temperatūru, nogurumu un purpurai līdzīgiem izsitumiem. Bieži hipereozinofīlija saistās ar citoģenētisko formu, kur tranlokācija notikusi starp piekto un četrpadsmito hromosomu. Hipereozinofīliju diagnosticē mazāk nekā vienam procentam pacientu, biežāk tie ir zēni ar vidējo vecumu 14 gadi diagnozes brīdī. Viena no hipotēzēm, kas skaidro hipereozinofīlijas patoģenēzi, ir, ka leukemoīdās šūnas stimulē eozinofilos faktorus – interleikīnu 3 un interleikīnu 5. Hipereozinofīlija diagnozes brīdī saistāma ar sliktu prognozi (*Parasole et al.*, 2014).

Starp B limfoblastu priekšteču šūnu leikozes prezentējošiem simptomiem jāizceļ leikoze, kuras simptomi attīstās līdz viena gada vecumam. Apmēram 3 – 5% no akūtas leikozes pacientiem ir bērni vecumā līdz vienam gadam. Parasti manifestācijas brīdī bērniem ir augsts leukocītu skaits, hepatosplenomegālija, un, salīdzinot ar vecākiem bērniem, biežāk vērojama CNS iesaiste. ALL, kas manifestējas līdz viena gada vecumam, ir saistāma ar sliktāku prognozi (*Arceci et al.*, 2006).

2.6. Diagnostika

Jebkuram pacientam ar aizdomām par ALL jāveic pilna asins aina. Līdz pat 20% pacientu iniciāli var būt tikai pancitopēnija, un blasti perifērajās asinīs var neparādīties (*Ganesan et al.*, 2009). Papildus nozīmē: elektrolītu līmeni, aknu, nieru proves, urīnskābes līmeni, laktātdehidrogenāzes līmeni, koagulogrammu (protrombīnu, fibrinogēnu), D – dimērus, asinsgrupu, antivielas. Asins analīzēs var būt hiperkalciēmija, hipokalciēmija, hiperkalēmija, hiperfosfatēmija, paaugstināts urīnskābes līmenis, kā arī koagulācijas traucējumi (*Murakami et al.*, 2013). Ja laboratorā atradne norāda uz iespējamu leikozes

diagnozi, papildus jāveic rentgenizmeklējums, lai vizualizētu tīmusu un izvērtētu videni, jo apmēram 8% ALL gadījumu ir mediastinālā iesaiste (*Redaelli et al.*, 2005).

Lai pierādītu akūtas limfoblastu leikozes diagnozi, nepieciešama kaulu smadzeņu aspirācija un biopsija, ar tai sekojošu imūnfenotipēšanu, precizējot attīstības pakāpi ar plūsmas citometriju (*Inaba et al.*, 2013), kā arī nepieciešams veikt mielogrammu un citoģenētisko analīzi, kura sniedz būtisku informāciju vairāk nekā 90% gadījumu.

Par iespējamu leikozes diagnozi jādomā, ja kaulu smadzenēs ir vairāk nekā 5% blastu (*Lanzkowsky*, 1995). Galīgās diagnozes noteikšanai nepieciešams, lai biopsijas materiālā vismaz 20% no šūnām būtu blasti (*Jabbour et al.*, 2005).

CNS iesaistes izvērtēšanai nepieciešams veikt lumbālpunkciju, lai izvērtētu šūnu klātbūtni cerebrospinālajā šķidrumā. Par CNS iesaisti liecina vairāk nekā pieci leukocīti uz kubikmilimetru. CNS iesaistes izvērtēšanai tiek izmantota šāda klasifikācija: CNS1 – mazāk par pieciem leukocītiem kubikmilimetrā, starp tiem nav blasti, CNS2 – mazāk par pieciem leukocītiem kubikmilimetrā, bet starp tiem ir blasti, un CNS3 – vairāk par pieciem leukocītiem kubikmilimetrā un starp tiem ir blasti. CNS1 un CNS2 prognoze ir vienāda (*Burger et al.*, 2003). Gadījumos, kad ir simptomātika no CNS puses, ir indicēta kompjūtertomogrāfija vai magnētiskā rezonanse galvas smadzenēm (*Voûte*, 2005).

Papildus šiem izmeklējumiem nepieciešama arī vīrusu seroloģiskā izmeklēšana: Epšteina Barra vīrusa (EBV), citomegalovīrusa (CMV), *varicella zoster*, masalu, vīrusa hepatītu (B un C) un cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV). Jāveic elektrokardiogrāfija un ehokardioskopija, lai izvērtētu sirds funkciju, kā arī ultrasonogrāfija vēdera dobuma orgāniem. Pēc diagnozes apstiprināšanas nepieciešams noteikt Filadelfijas hromosomas jeb translokācijas t(9;22)(q23;p13) klātbūtni (*Arceci et al.*, 2006).

2.7. Diferenciāldiagnoze

Iniciāli akūta limfoblastu leikoze var būt jādiferencē gan no labdabīgām, gan no ļaundabīgām saslimšanām. Starp labdabīgām jāmin: juvenīls idiopātisks artrīts, infekciozā mononukleoze (Epšteina-Barra vīruss, citomegalovīruss), idiopātiska trombocitopēniska purpura, garais klepus, aplastiska anēmija, akūta infekcioza limfocitoze.

Starpt. ļaundabīgām saslimšanām ALL jādiferencē no neiroblastomas, retinoblastomas, rabdomiosarkomas, ne-Hodžkina limfomas.

Netipiskos prezentācijas gadījumos ALL var būt ļoti grūti diagnosticējama, sākotnēji to var nākties diferencēt pat no hipereozinofīlijas sindroma (*Pizzo & Poplack*, 2006)

2.8. Ārstēšana

Parasti terapijas ilgums ir no diviem līdz diviem ar pusi gadiem, kas sastāv no trīs fāzēm: remisijas indukcija, intesifikācija (jeb konsolidācija) un uzturošā terapija. Lielākā daļa no terapijā izmantotajiem medikamentiem tika sintezēti pirms 1970. gada. Taču medikamentu devas un nozīmēšanas shēma tiek piemērota atkarībā no leukemoīdo šūnu bioloģiskajām īpatnībām, atbildes reakcijas uz terapiju (minimālā reziduālā slimība), kā arī pacienta individuālajām farmakodinamiskajām un farmakogenomiskajām īpatnībām. Kaulu smadzeņu transplantācija tiek apsvērta tikai pacientiem ar ļoti augstu risku (*Inaba et al.*, 2013).

Šobrīd Latvijā visplašāk pielietotais protokols ALL ārstēšanai ir Berlīnes – Frankfurtes – Minsteres grupas 1995. gadā izstrādātais protokols – BFM – 95. Balstoties uz šo protokolu, tiek izšķirtas standarta, vidēja un augsta riska pacientu grupas. BFM – 95 tika izstrādāts uz iepriekšējā 1990. gada protokola bāzes, tā mērķis bija uzlabot terapijas iznākumu un riska grupu stratifikācijai tika pievienota nelabvēlīga citogēnētiskā atradne $t(9;22)$ un $t(4;11)$ (*Moricke et al.*, 2008).

Riska grupas izvērtēšanai galvenā nozīme ir pacienta atbildes reakcijai uz indukcijas terapiju ar prednizolonu. Atbildes reakcija tiek izvērtēta terapijas astotajā dienā, izvērtējot blastu skaitu perifērajās asinīs, kā arī piecpadsmitajā un trīsdesmit trešajā dienā, izvērtējot atlieku jeb minimālo reziduālo slimību (MRD) kaulu smadzenēs (*Lauten et al.*, 2012). Ja minimālā reziduālā slimība jeb blastu īpatsvars terapijas 33. dienā ir lielāks par 5% vai pacientam identificēta Filadelfijas hromosoma vai translokācija starp ceturto un vienpadsmito hromosomu, pacients pieder augsta riska grupai.

Standarta un vidēja riska grupai BFM- 95 protokols būtiski neatšķiras. Medikamenti, kuri tiek ievadīti intratekāli, turpmāk tekstā aiz medikamenta nosaukuma tiek atzīmēti ar abreviatūru iekavās – (IT). Indukcijas terapijas A fāzē pacients saņem šādus medikamentus: prednizolonu, vinkristīnu, daunorubicīnu, L – aspargināzi un metotreksātu (IT), pēc šīs terapijas 33. dienā tiek izvērtēta riska grupa.

Standarta riska gadījumā divdesmit astoņas dienas tiek turpināta B fāze, kurā pacients saņem: ciklofosfamīdu, citarabīnu, 6-merkaptopurīnu un metotreksātu. Papildus pacienti saņem M protokolu, kas ilgst 56 dienas, kura sastāvā ir 6-merkaptopurīns un metotreksāts (IT). Tālāk seko reindukcijas fāze, kurai ir divas daļas (A un B), pirmā daļa ilgst 28 dienas, kad bērns saņem deksametazonu, vinkristīnu, doksirubicīnu un L-asparagināzi, B daļa ilgst 14 dienas, kuras laikā pacientam tiek nozīmēta terapija ar ciklofosfamīdu, citarabīnu, 6-tioguanīnu un metotreksātu (IT).

Pēc tam tiek uzsākta uzturošā terapija ar 6-merkaptopurīnu, kuru pacients saņem katru dienu un metotreksātu, kas tiek nozīmēts vienu reizi nedēļā. Uzturošā terapija meitenēm ilgst

104 nedēļas, sākot no diagnozes brīža, zēniem 156 nedēļas no diagnozes uzstādīšanas brīža (Moricke *et al.*, 2008). Zēniem uzturošās terapijas ilgums ir garāks, jo apmēram 1-2,8% zēnu izveidojas recidīvs sēkliniekos, kura sākotnējais simptoms ir nesāpīgs pietūkums. Recidīvu pierāda ar sēklinieku biopsiju, izdzīvošanas rādītāji arī pēc testikulāra recidīva saglabājas labi (Kliegman *et al.*, 2007; Kulkarni *et al.*, 2010).

Augsta riska grupas pacienti indukcijas terapijā B bloka vietā saņem trīs terapijas blokus, kuri terapijas laikā secīgi tiek atkārtoti trīs reizes, no kuriem katrs ilgst piecas dienas; 1. bloka ietvaros pacients saņem terapiju ar: deksametazonu, vinkristīnu, metotreksātu, ciklofosfamīdu, citarabīnu, L-aspargināzi un vienreizēju metotreksāta/citarabīna/prednizolona (IT) ievadi; 2. bloka ietvaros pacientam tiek nozīmēts deksametazons, vindezīns, metotreksāts, ifofosfamīds, daunorubicīns, L-aspargināze, vienreizēja metotreksāta /citarabīna/prednizolona (IT) ievade. Trešais bloks sastāv no: deksametazona, citarabīna, etopsīda, L-aspargināzes un vienreizējas metotreksāta/citarabīna/prednizolona (IT) ievades.

Otra atšķirība, kas minama starp augsta un standarta riska pacientiem, ir staru terapija. Pacientiem ar augstu risku pirms uzturošās terapijas sākuma tiek rekomendēta staru terapija. Uzturošās terapijas ilgums neatšķiras, uzturošās terapijas devas tiek koriģētas atkarībā no pacienta kopējā leukocītu skaita, mērķa leukocītu skaits ir 2000 (Moricke *et al.*, 2008). Terapijas shēmu skatīt 1. pielikumā.

Visiem zināmajiem pretleikēmijas medikamentiem ir zināmi akūti toksiski blakus efekti un daudzas nopietnas ilgtermiņa komplikācijas, kas uzsver lielo nepieciešamību, lai sintezētu efektīvākus un mazāk toksiskus medikamentus. Attiecībā uz staru terapijas – jonizējošā starojuma pielietojumu, neskatoties uz to, ka radiācijas kaitīgās blaknes ir labi izpētītas, ieskaitot sekundāru audzēju attīstību, neirokognitīvus traucējumus un multiplu endokrinopātiju, profilaktiska staru terapija joprojām tiek pielietota līdz pat 20% pacientu, kuriem ir augsts CNS recidīva risks.

Turpmākajā dekadē, samazinoties izcenojumam un pieaugot ģenētisko analīžu iespējām, kopumā izvērtējot pārmantotas ģenētiskas izmaiņas, izmaiņas audzēja šūnās un epiģenētiku, būs iespējams veidot jaunas, uz pacientu vērstas, specifiskas terapijas shēmas (CH Pui & Evans, 2013).

2.9. Komplikācijas

Agrīna komplikācija var būt tumora līzes sindroms (attīstās, pārāk ātri sabrūkot audzēja šūnām), kas raksturojas ar hiperurikēmiju, hiperkalēmiju, hiperfosfatēmiju un hipokalciēmiju. Kālija līmenis paaugstinās, jo tas atbrīvojas no lizētiem limfocītiem, kā rezultātā samazinās nieru funkcija. Tumora līzes sindroms var būt dzīvībai bīstams

(Rajendran *et al.*, 2013). Vēl pie agrīnajām komplikācijām var būt blastu veidota obstrukcija, kuras dēļ attīstīsies mikrocirkulācijas traucējumi, piemēram, venozas trombozes (īpaši pacientiem, kas ārstēti ar aspargināzi); kā arī terapijas laikā var attīstīties sēnīšu, vīrusu un bakteriālas infekcijas (Arceci *et al.*, 2006).

Neraugoties uz sekmīgu ārstēšanu, bērni pēc terapijas nonāk ārstu uzraudzībā ar sūdzībām, kas ir pašas leikozes vai tās terapijas izraisītas sekas. Terapijas rezultātā var rasties traucējumi centrālajā nervu sistēmā, kas var izpausties arī kā neiropsiholoģiski traucējumi, kas biežāk izpaužas meitenēm. Bērniem var rasties endokrīni traucējumi, piemēram, aptaukošanās un hipotireoze; pacientiem, kas pārslimojuši ALL, ir raksturīgs mazs augums, taču nav pietiekami daudz datu par augšanas hormona terapijas drošību attiecībā uz recidīva risku. Iespējama avaskulāras nerozes attīstība. Alkalizējošo aģentu dēļ pacientiem var būt samazināta auglība. Starp komplikācijām vēl jāpiemin pēc terapijas kardiomiopātijas risks, osteoporoze, galvas smadzeņu audzēji pēc apstarošanas, mielodisplastiskais sindroms (Voûte, 2005).

2.10. Prognoze

Atbildes reakcija uz terapiju dažādiem indivīdiem pat ar vienādu ģenētisku subtipu var būt atšķirīga, daļēji tas ir saistīts ar mērķšūnu, kurā notiek ļaundabīga transformācija, un daļēji tas ir saistīts ar dažādu “driver” jeb palaidējmutāciju esamību (CH Pui & Evans, 2013).

Pacientu dzīvildze un recidīva risks ir atkarīgs no daudziem faktoriem. Vairākas pētnieku grupas ir izstrādājušas augsta riska leukēmijas kritērijus. Kopumā literatūrā ir atrodami vienpadsmit riska grupu stratifikācijas kritēriji.

Berlīnes-Frankfurtes-Minsteres BFM -95 grupa augsta riska stratifikāciju balstās uz trīs kritērijiem: MRD 33. dienā, Filadelfijas hromosomu jeb t(9;22)(q23;p13) un translokāciju starp 4. un 11. hromosomu t(4;11)(q21;q23). Šādiem augsta riska pacientiem pēc literatūras datiem 6 gadu notikumiem brīvais periods ir tikai $49,2\% \pm 3,2\%$, kas ir viens no aprakstītajiem, salīdzinot ar citām grupām, kas riska stratifikācijai izmanto citus parametrus.

Vienu no jaunākajiem augsta riska grupas stratifikācijas kritērijiem 2008. gadā ir izstrādājusi Bērnu onkoloģijas grupa (COG), kur augsta riska kritēriji ir: vecums diagnozes brīdī ≥ 10 gadiem, leukocītu skaits $\geq 50\,000$, bez papildus citoģenētiskām izmaiņām ar sliktu prognozi. COG ļoti augsta riska grupas kritēriji ir: nesekmīga indukcijas terapija, Filadelfijas hromosomas klātbūtne, izteikta hipodiploidija (< 44 hromosomām), *MLL* un/vai *MDR* $> 0,1\%$ pēc indukcijas (Bhojwani *et al.*, 2009).

Hromosomālās izmaiņas ir neatkarīgs indikators prognozes noteikšanai un recidīva riska novērtēšanai. Riska stratifikācijai tiek izmantots hromosomu kopējais skaits leukemoīdās šūnās (*Inaba et al.*, 2013).

Meitenēm ir nedaudz labāka prognoze nekā zēniem (*CH Pui et al.*, 1999). Baltās rases pārstāvjiem ir labāka prognoze, salīdzinot ar melnās rases pārstāvjiem un spāņu izcelsmes indivīdiem, bet sliktākas salīdzinājumā ar aziātiem (*Kadan-Lottick et al.*, 2003). Kopumā pēc jaunākajiem literatūras datiem, izdzīvošanas varbūtība pacientiem ar ALL ir 90% (*Inaba et al.*, 2013).

2.11. Recidīvs

Neskatoties uz intensīvo terapiju, 25-30% bērnu piedzīvo kaulu smadzeņu recidīvu, kas var būt izolēts (tikai kaulu smadzenēs) vai kombinēties arī ar citām sūdzībām (*Celkan et al.*, 2005). Bērniem, kuriem recidīvs attīstās sešu mēnešu laikā pēc terapija pabeigšanas, ir ļoti slikta prognoze, un šādiem pacientiem jādomā par kaulu smadzeņu transplantāciju. Ja recidīvs attīstās sešus mēnešus pēc terapijas beigām, prognoze ir labāka, tomēr nepieciešams terapijā izmantot citu protokolu.

Kā atsevišķas grupas izceļamas CNS un sēklinieku recidīvs (*Celkan et al.*, 2005).

Pētījumā, kuru veica Mullighan ar kolēģiem, kurā viņi analizēja ģenētiskās izmaiņas leukozes recidīva šūnās, tika identificētas 52 somatiskas mutācijas 32 dažādos gēnos, no kurām lielākā daļa iepriekš nebija diagnosticētas leukemoīdās šūnās – 18,3% recidīvu gadījumos bija mutācijas gēnā *CREBBP* (cAMP-response element-binding protein), kas autoriem ļauj domāt, ka, iespējamas arī citas ģenētiskas izmaiņas, kas saistāmas ar terapijas neizdošanos. Pētījums norāda, ka mutatīvā mainība un epigenētiskā mainība recidīva gadījumā varētu būt plašs pētījumu lauks nākotnē, pareizai terapijas pieejai (*Mullighan, Zhang, et al.*, 2011).

2.12. Etiopatogēnēze

Precīzi patoģenētiski mehānismi, kas noved pie ALL attīstības, nav zināmi. Mazāk nekā 5% gadījumu ALL saistās ar ģenētiskiem sindromiem, kā Dauna sindroms, Blūma sindroms, ataksija – teleangiektāzija vai Nīmegenas hromosomu trausluma sindroms (*CH Pui et al.*, 2008). Bērniem ar Dauna sindromu ir desmit līdz divdesmit reižu lielāks risks saslimt ar akūtu limfoblastu leikozi, salīdzinot ar populāciju (*Seif*, 2011). Bērniem ar Dauna sindromu ir sliktāki terapijas rezultāti, jo vērojama biežāka rezistence pret nozīmēto terapiju, kā arī augstāka ar terapiju saistītā mirstība (*Buitenkamp et al.*, 2014).

Uzskata, ka akūtas limfoblastu leikozes attīstība ir saistīta ar ģenētiskiem bojājumiem, kas rodas T vai B leukocītu prekursoru šūnās, kas noved pie to neierobežotas pašatjaunošanās un/vai tādām ģenētiskām izmaiņām, kas noved pie tālākas diferenciācijas apstāšanās (Mullighan, 2012). B limfocītu priekšteči spēj dalīties ar ātrumu – 10^{11} jaunas šūnas vienas dienas laikā. Ņemot vērā šo īpatnību, tiek uzskatīts, ka, lai attīstītos leukēmija, ir nepieciešamas skaitliski mazāk ģenētiskas izmaiņas, salīdzinot, piemēram, ar solidiem tumoriem, kuru attīstībai nepieciešams šo metastātisko dalīšanās veidu nodrošināt caur ģenētiskām mutācijām (Wiemels, 2012).

2.12.1. Citogēnētiskās izmaiņas leukemoīdās šūnās

Apmēram 75% no visiem akūtas limfoblastu leikozes gadījumiem ir sastopamas citogēnētiskas izmaiņas, kas ir nosakāmas, izmantojot kariotipa analīzi, fluorescento *in situ* hibridizāciju (FISH) vai molekulāras metodes.

Hiperdiploīdija ir hromosomu skaits, kas ir lielāks par 50, kas parasti saistāms ar labu prognozi, īpaši, ja kombinējas ar 4., 10., 17., vai 18. hromosomas trisomiju (Nachman et al., 2007). Hiperdiploīdiju sastop apmēram 33% B limfocītu priekšteču ALL gadījumos, ar biežāku sastopamību starp zēniem, gados jaunākiem bērniem un ar zemu leukocītu skaitu prezentācijas brīdī. Dastugue ar kolēģiem pierāda, ka prognoze uzlabojas, pieaugot hromosomu skaitam – ja kariotipā tika atrastas 58 – 66 hromosomas, sešu gadu dzīvildze bija 100% (Dastugue et al., 2013).

Hipodiploīdija ir hromosomu skaits, kas ir mazāks par 46 hromosomām. Hipodiploīdija ir saistīta ar augstu terapijas risku un sliktu prognozi, jo mazāk hromosomu šūnā, jo sliktāka prognoze. Pēc literatūras datiem hipodiploīdija sastopama apmēram 5% pacientu, neatkarīgi no vecuma, kas tiek sīkāk iedalīta: augsta diploīdija (42 – 45 hromosomas), zema diploīdija (33 – 39 hromosomas) un gandrīz haploīdija (23 – 29 hromosomas), kas ir sastopama gandrīz tikai bērnu vecumā (Nachman et al., 2007).

Salīdzinot klīniskos iznākumus, ir aprakstīts, ka, mazāk samazinoties hromosomu skaitam leukemoīdās šūnās, pasliktinās prognoze, piemēram, bērniem, kuriem bija 25-39 hromosomas, trīs gadu notikumiem brīvais periods bija tikai 29%, bet bērniem ar hromosomu skaitu 42 – 45 hromosomas, tas jau bija 66% (Harrison et al., 2004).

Visbiežākās hromosomālās izmaiņas akūtas leukēmijas gadījumā ir translokācijas un delēcijas. Gadījumos, ja delēcija skar audzēja supresora gēnu, tiek zaudēta kontrole pār šūnas ciklu, un notiek nekontrolēta šūnu augšana. Translokācijas, kuru rezultātā rodas saliktie gēni jeb himērgēni, nosacīti iedala divās grupās: pirmā, kad gēni zaudē normālo transkripcijas kontroli un tiek translocēti uz lokusu, kur promoteri nepiemēroti aktivē to transkripciju; otrā,

kad translokācijas rezultātā izveidots himērgēns kodē jaunu produktu, kas kavē normālu šūnu izdzīvošanu, proliferāciju un diferenciāciju, respektīvi, no proonkogēna veidojas onkogēns (Runge & Patterson, 2006).

Visbiežāk sastopamā translokācija, kas atrodama leukemoīdās šūnās bērniem līdz 10 gadu vecumam, ir t(12;21)(p13;q22): TEL-AML1 (*ETV6 – RUNX1*) (K. M. Walsh *et al.*, 2014). Kopumā šī translokācija sastopama apmēram 25% no visiem saslimšanas gadījumiem un tiek saistīta ar labu prognozi (Martineau *et al.*, 2005). *ETV6-RUNX1* himērgēna attīstība tiek aprakstīta jau intrauterīni, kā iespējamais iemesls preleikēmisku klonu produkcijai, kā rezultātā var attīstīties leikoze, ja papildus tiek uzkrātas pietiekami daudz ģenētiskas izmaiņas (Kantner *et al.*, 2013).

Monozigotisko dvīņu leukemoīdās šūnās konstatēja, ka ALL konkordantajam pārim translokācijai ir pilnīgi identisks lūzuma punkts (tāda atradne bija arī *MLL* gēna gadījumā). Lai gan monozigotiskie dvīņi ir ģenētiski identiski, himērgēnu lūzuma punkti nav mantoti, jo citoģenētiskās izmaiņas izzūd remisijas gadījumā. Vienīgais ticamais izskaidrojums, kāpēc dvīņiem konstatē vienādus lūzuma punktus gēnos, ir, ka himērgēns ir veidojies vienam no dvīņiem vienā cilmes šūnā jau *intrauterīni*, tālāk šīs šūnas meitšūna ir nonākusi otra dvīņa asinsritē, visticamāk caur anastomozēm, kas eksistē monohoriona gadījumā. Pētnieki izsaka hipotēzi, ka šis klīniski nenozīmīgais preleikēmiskais klons var būt iesaistīts leikozes attīstībā jebkurā postnatālās attīstības vecumā, laika posmā no divu mēnešu līdz pat četrpadsmit gadu vecumam. Bērniem, kuriem attīstās leikoze, leukemoīdo šūnu līnijā lūzuma punkta vieta ir tāda pati kā asins paraugā, kas analizēts pirms leikozes attīstības. Šī atradne norāda uz prenatalo notikumu nozīmīgumu (M Greaves, 2002). Mutācijas vai *MLL* himērgēns var būt pietiekams, lai izraisītu malignitāti, kam nav nepieciešami papildus notikumi, tas izskaidro augsto konkordanci starp monozigotiskiem dvīņiem. Tomēr mehānisms nav pilnībā skaidrs, pastāv idavs hipotēzes pirmā, ka tiek traucēta dubultspirāļu pārrāvuma atpazīšana, otrā, tiek traucēta šūnas kontrolpunktu darbība (Moricke *et al.*, 2008).

Vairākas pētnieku grupas analizējušas himērgēna (*ETV6 – RUNX1*) sastopamības biežumu jaundzimušo asinīs, bet pētījumu rezultāti ir neviennozīmīgi. Vienā no pētījumiem *ETV6 – RUNX1* atrod 2% veselu jaundzimušo (Zuna *et al.*, 2011), bet, palielinot pētāmo grupu, hromosomālās aberācijas biežums ir tikai 0,64% (Lausten-Thomsen *et al.*, 2011).

Vairākās publikācijās *ETV6 – RUNX1* tiek uzskatīts par iespējamo “pirmo soli” leukemoģenēzē, kas attīstās *intrauterīni* (Morak *et al.*, 2013). Pre-B šūnu limfoblastu leikozes šūnās bieži atrodama arī otras *ETV6* alēles delēcija vai himērgēna veidošanās, kas liecina par iespējamu šī lokusa nozīmīgumu arī tālākā leukemoģenēzes norisē (Harrison *et al.*, 2010).

Filadelfijas hromosomu jeb translokāciju t(9;22)(q23;p13), kuras rezultātā veidojas himērgēns *BCR-ABL1*, sastop apmēram 25% gadījumos ALL pieaugušo vecumā, bet bērnu vecumā tās sastopamības biežums ir tikai 3 – 4%. Sastopamības biežums pieaug, pieaugot bērna vecumam. Filadelfijas hromosoma ir saistāma ar sliktu prognozi. Prognoze ir uzlabojusies, kopš Filadelfijas hromosomas pozitīvās leikozes terapijā pievieno tirozīnkināzes inhibitorus (piemēram, imatinibu). Šobrīd hematopoētisko cilmes šūnu transplantācija vairs nav nepieciešama visiem bērniem ar Filadelfijas hromosomu. Kopumā prognoze ir sliktāka, salīdzinot ar indivīdiem, kuriem ir citas citoģenētiskas izmaiņas (Bernt *et al.*, 2014). Parasti Filadelfijas hromosomas pozitīviem pacientiem diagnozes brīdī ir lielāks leukocītu skaits un biežāka CNS iesaiste (Mullighan, 2012).

Pētījumā, kurā bija iekļauti 735 bērni ar akūtu limfoblastu leikozi, kuru veica *St. Jude* slimnīcā, analizējot translokācijas (1;19)(q23;p13) *TCF3-PBX1* sastopamības biežumus to atrada 5,6% bērnu, statistiski nozīmīgi šī izmaiņa bija sastopama melnās rases pārstāvjiem (Jeha *et al.*, 2009). Pētījuma rezultāti pierāda, ka t(1;19) ir saistāma ar labu prognozi, bet biežāk sastopamu CNS iesaisti (Felice *et al.*, 2011), kā arī CNS recidīvu (Jeha *et al.*, 2009). Precīzi dati par translokācijas izplatību baltās rases vidū nav zināmi, bet Austrijā veiktā pētījumā, kurā iesaistīti 859 bērni, hromosomālās aberācijas biežums bija 3,6% (Kager *et al.*, 2007).

Translokācija t(4;11)(q21;q23) rezultējas himērgēnā *MLL-AF4* jeb *MLL*, ko sastop, galvenokārt, bērniem līdz viena gada vecumam, un tā ir saistīta ar labu prognozi. Bērniem līdz sešu mēnešu vecumam ar ALL *MLL-AF4* atrod 50% gadījumu. Pēc viena gada vecuma šī translokācija ir sastopama tikai 2% gadījumu un saistīta ar sliktu prognozi (Mann *et al.*, 2007).

Intrahromosomāla 21. hromosomas amplifikācija, kad tiek amplificēts reģions 5,1 Mb (mega bāžu) garumā, ir sastopama apmēram 2% gadījumu, kā rezultātā genomā ir trīs vai vairāk gēna *RNFX1* kopijas. Tipiski pacienti ar šo citoģenētisko izmaiņu ir vidēji deviņus gadus veci, un manifestācijas brīdī sastop zemāku leukocītu skaitu. Pacientiem ar 21. hromosomas intrahromosomālu amplifikāciju ir sliktā atbildes reakcija uz standarta terapiju, bet, ārstējot pēc augsta riska protokola, recidīva risks samazinās (Harrison *et al.*, 2014; Moorman *et al.*, 2007).

2.12.2. Submikroskopiskas ģenētiskas izmaiņas

Pētījumi parāda, ka bez hromosomālām izmaiņām, kuras ir ļoti nozīmīgas precīzai diagnostikai un riska izvērtēšanai, nozīmīga loma ir arī ģenētiskām izmaiņām, kas nav identificējamās citoģenētiski. ALL gadījumā, salīdzinājumā ar solidiem audzējiem, genoma

nestabilitāte ir salīdzinoši reta, vidēji sešas līdz astoņas DNS kopiju skaita izmaiņas (kopiju skaita samazināšanās vai palielināšanās) vienam indivīdam (Mullighan & Willman, 2011). Pētījumi pierāda, ka delēcijas ir biežāk sastopamas, tās parasti ir neliela izmēra (< 1 Mb) un bieži atrodas viena gēna robežās (JJ Yang et al., 2008).

Submikroskopisko ģenētisko izmaiņu skaits ir saistīts ar ALL subtipu, *MLL* gadījumā atrod tikai atsevišķas izmaiņas, bet, piemēram, *ETV6-RUNX1* un *BCR-ABL1* leukēmijas gadījumā, sastop pat vairāk nekā astoņas submikroskopiskas izmaiņas (Mullighan & Willman, 2011; Schwab et al., 2013).

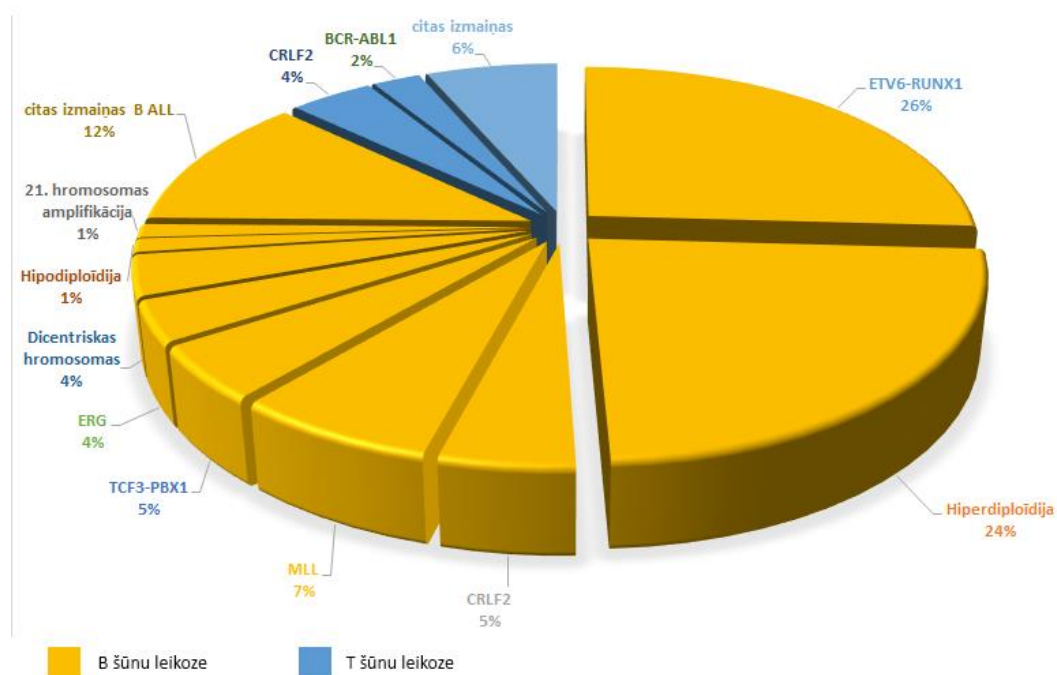
Pētnieki ir identificējuši vairāk nekā 50 reģionus, kuros var rasties DNS kopiju skaita izmaiņas. Pre-B šūnu ALL gadījumā, nozīmīgākās un biežāk sastopamās ir gēnos – *PAX5*, *IKZF1*, *CRLF2*, *JAK1/JAK2* un *CREBBP* (Inaba et al., 2013). Vairākiem gēniem, kas ir iesaistīti šajās submikroskopiskajās izmaiņās, ir zināma nozīme leukemoģenēzē. Apmēram 60% gadījumu pre-B šūnu ALL konstatēto izmaiņu skar gēnus – *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* un *LEF1*, kuri ir iesaistīti normālā B limfocītu attīstībā. Visbiežākās sekvenses variācijas ir funkcijas zuduma mutācijas ar dominanti negatīvas alēles veidošanos, kas bloķē normālu limfocītu attīstību (Mullighan et al., 2007).

Gēnā *PAX5* mutācijas atrod 32% ALL gadījumu (Woo et al., 2014). Mutācija Gly183Ser heterozigotiskā stāvoklī predisponē leikozes attīstību, kas pierādīts pētījumā ar divām, savā starpā neradnieciskām ģimenēm, ar puertorikāņu un Amerikas – afrikāņu izcelsmi, kas varētu norādīt uz gēna *PAX5* lomu iedzimtā ALL predizpozīcijā (Shah et al., 2013).

Apmēram 7% gadījumu pre-B šūnu ALL gadījumā un 50% gadījumu pre-B ALL kombinācijā ar Dauna sindromu, izmainās citokīna receptoram līdzīgā faktora 2 (*CRLF2*) ekspresija. Pārmērīga gēna *CRLF2* ekspresija saistās ar sliktu prognozi un augstāku recidīva risku (Cario et al., 2010). Apmēram pusē gadījumu, kad ir citokīna receptoram līdzīgā faktora 2 izmaiņas, atrod arī izmaiņas *Janus* kināzi kodējošos gēnos *JAK1* un *JAK2*, visbiežāk tās ir nukleotīdu nomainas, kas izraisa aminoskābes nomainu polipeptīdā, kas arī saistāmas ar sliktāku prognozi (Mullighan, 2013).

Apmēram 4% pre-B šūnu ALL gadījumā pacientiem konstatē gēna *ERG* intragēnu delēciju, kā rezultātā tiek sintezēts defektīvs proteīns (biežāk sastopama salīdzinoši vecākiem bērniem). 40% gadījumu to sastop kopā ar delēciju gēnā *IKZF1*. *ERG* intragēnu delēcija asociējas ar labu prognozi, pat gadījumos, ja novēro arī delēciju gēnā *IKZF1* (Zaliova et al., 2014).

2.3. attēlā attēlota apla diagramma, kurā apvienotas B un T šūnu leikozes biežākās ģenētiskās izmaiņas pēc literatūras datiem.



2.3. att. Biežākās ģenētiskās izmaiņas B un T šūnu akūtas limfoblastu leikozes gadījumā

2.12.3. Genoma plašos asociāciju pētījumos identificētie alēliskie varianti

Pirmajā genoma plašajā asociāciju pētījumā, kuru veica Trevino ar kolēģiem, tika analizēti 307 944 alēliskie varianti 317 bērniem, kuri bija slimojuši ar akūtu limfoblastu leikozi un 17 958 veseliem indivīdiem. Pētījumā tika identificēti 18 gēna alēliski varianti, kuru alēļu sastopamības biežums pētījuma un kontroles grupai atšķīrās ar ticamību $p < 1 \times 10^{-5}$. Pētījumā tika identificēta alēlisko variantu rs10821936 – NM_032199.2:c.502+23410C>T retāk sastopamā alēle (MAF) C = 0,36, ($p = 1,4 \times 10^{-15}$ OR = 1,91 95% CI 1,6–2,2) un rs10994982 – NM_032199.2:c.502+9937A>G MAF G = 0,43 ($p = 5,7 \times 10^{-9}$ OR = 1,61 95%CI 1,3–1,9) saistība ar paaugstinātu risku saslimt ar ALL. Identificētie alēliskie varianti savstarpēji atrodas nelīdzsvarotā saistībā (LD – *linkage disequilibrium*) ($r^2 = 0,42$, $P < 1 \times 10^{-10}$).

Abi iepriekš minētie alēliskie varianti ir lokalizēti gēna *ARID5B* (AT rich interactive domain 5B) trešajā intronā (Trevino *et al.*, 2009). AT – bagātais interaktīvais domēns 5B pieder pie ARID gēnu ģimenes, kas pēc funkcijas ir transkripcijas faktori, kuriem ir nozīmīga loma embrionālās attīstības regulācijā, šūnu augšanā un diferenciacijā (CY Lin *et al.*, 2014). Lai gan precīza *ARID5B* loma ALL patoģenēzē ir neskaidra, zināms, ka pelei, kurai nefunkcionē šis gēns (*knockout*), ir B limfocītu attīstības anomālijas (kaulu smadzenēs vēro samazinātu pro B šūnu skaitu (Lahoud *et al.*, 2001).

Šobrīd ir skaidrs, ka izmaiņas, kas ietekmē gēna funkciju, varētu ietekmēt ALL attīstības risku (Gutierrez-Camino *et al.*, 2013). Trevino un kolēģu atradne ir replicēta

vairākos pētījumos. *Guo* un kolēģi savā meta analīzes pētījumā, kurā analizēti trīspadsmit gadījuma – kontroles pētījumi, pierāda gēna alēliskā varianta rs10821936 statistiski nozīmīgo saistību ar ALL attīstības risku ($p < 0,0001$; OR = 1,27; 95%CI, 1,17–1,37) (*Guo et al.*, 2014). Savukārt *Zeng* un kolēģu veiktajā meta analīzes pētījumā, kurā iekļauti 16 gadījuma kontroles pētījumi, tiek pierādīta divu citu trešajā intronā lokalizētu alēlisko variantu saistība ar ALL attīstības risku: rs10994982 ($p < 0,00001$), rs7089424 – NM_032199.2:c.503–7691T>G MAF G = 0,37 ($p < 0,00001$) (*Zeng et al.*, 2014).

Viens no alēliskiem variantiem, kuram ir pierādīta cieša saistība ar ALL attīstības risku, ir rs4132601 NM_001220765.2:c.*2279T>G, MAF G = 0,22, kurš lokalizēts gēna *IKZF1* 3' netranslējamā reģionā. 2009. gadā pirmoreiz publicēti dati no GWAS, kuros analizēti 907 pacientu un 2 398 kontroles indivīdu paraugi, kad pētnieki identificē alēliskā varianta saistību ar leikozes attīstības risku (OR=1,69, CI95% 1,58-1,81, $p = 1,20 \times 10^{-19}$). Pētījumā autori izsaka hipotēzi, ka alēliskais variants, lai gan tieši neietekmē *IKZF1* funkcionalitāti, var būt saistīts ar tā izmainītu ekspresiju. Lai pierādītu, ka alēliskais variants ietekmē *IKZF1* ekspresiju, pētnieki analizēja mRNS ekspresijas līmeni EBV transformētos limfocītos un secināja, ka ekspresijas līmenis statistiski ticami ($p = 0,005$) ir saistīts ar genotipu. Ekspresijas līmenis atšķīrās heterozigotiem un homozigotiem (*dose dependent*). (*Papaemmanuil et al.*, 2009).

Pētījumā, kurš publicēts 2014. gada nogalē, iekļauts 21 pētījums, kurā analizēts rs4132601 biežums 5823 ALL pacientiem un 11 393 kontroles indivīdiem. Minētajā pētījumā, analizējot pēc visiem statistikas modeļiem, variants saglabāja statistisko ticamību kā iespējamā ALL riska alēle ($p < 0,001$ OR 1,44 95%CI (1,31-1,59) (*Dai et al.*, 2014).

Iepriekš aprakstītajā GWAS pētnieki pierādīja leikozes attīstības riska saistību arī ar 14. hromosomas garā pleca lokusā 11 lokalizētā gēna *CEBPE* (*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon*) alēlisko variantu rs2239633 NM_001805.3:c.-757C>T MAF A = 0,35 ($p = 2,88 \times 10^{-7}$ OR = 1,34, 95% CI 1,22-1,45) (*Papaemmanuil et al.*, 2009).

Gēna *CEBPE* alēliskā varianta rs2239633 saistība ar leikozes attīstības risku replicēta vairākos pētījumos. Meta analīzes pētījumā, kurā analizēti vienpadsmit gadījuma – kontroles pētījumi (kopumā iekļauti - 5 639 leikozes pacienti un 10 036 kontroles indivīdi), alēliskajam variantam ir statistiski ticama saistība ar leikozes attīstības risku ($p < 0,01$ OR = 1,29, 95 % CI 1,15-1,44) (*C Wang et al.*, 2014).

Gēns pēc savas būtības ir cinka pirkstu hematopoētiskais un apoptozes regulators, kurš ekspresējas mieloīdās rindas šūnās (*Kyle M. Walsh et al.*, 2014). Defektīva proteīna gadījumā tiek bloķēta granulocītu nobriešana un mielodisplāzija, kas norāda uz tā būtisko lomu

mielopoēzē. Noteikts proteīna līmenis ir būtisks pietiekamā citokīnu (piemēram, IL 4, IL6, IL12, audzēja nekrozes faktora α (TNF α)) līmeņa nodrošināšanā (*Yamanaka et al.*, 1997).

Alēliskais variants rs2239635, kas lokalizēts gēnā *CEBPE*, sagrauj kanonisko transkripcijas faktora piesaistes vietu, kur piesaistās Ikaros (*Kyle M. Walsh et al.*, 2014). Citā pētījumā tiek pierādīts, ka promoterā lokalizētais alēliskais variants varētu regulēt gēna *CEBPE* ekspresiju, savukārt G alēles gadījumā palielinātos gēna produkta apjoms, kas varētu veicināt leukemoģenēzi (*Ryoo et al.*, 2013).

Sherborne un kolēģi analizēja BFM grupas pētījumus, kuros tika analizēti trīsdesmit četri viena nukleotīda alēliskie varianti 1 428 ALL gadījumiem un 1 516 kontroles pacientiem. Trīsdesmit trijiem no tiem nebija statistiski ticamas nozīmības, izņemot rs3731217, kas lokalizēts gēna *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) 1. intronā. Analizējot apvienotos Spānijas (148 gadījumi un 187 kontroles), Ungārijas (550 gadījumi un 450 kontroles) un Kanādas (260 gadījumi un 266 kontroles) pētījumus, tika pierādīta gēna alēliskā varianta saistība ar ALL risku, kombinētais $p = 3,01 \times 10^{-11}$, OR = 0,71, 95% CI 0,64 – 0,78 (*Sherborne et al.*, 2010). Gēni *CDKN2A* un *CDKN2B* ir lokalizēti 9p21 un tiek raksturoti kā audzējsupresorgēni (*Sherborne et al.*, 2010). Ciklīna atkarīgie kināzes inhibitori, tajā skaitā arī *CDKN2A*, ir vieni no galvenajiem regulatoriem šūnas kontrolpunktā, kur šūnas cikls no postmitotiskā pāriet sintēzes fāzē, to galvenā darbība ir, lai šūna nešķērsotu kontrolpunktu ar DNS bojājumu vai atbildētu uz onkogēna signālu. Pētījumi pierāda, ka alēliskie varianti, kas lokalizēti gēnu *CDKN2A* un *CDKN2B* prometeros, spēj negatīvi ietekmēt gēna ekspresiju, tādejādi ietekmējot šūnas cikla kontroli (*Healy et al.*, 2007).

Gēna *CDKN2A* mutācijām somatiskajās šūnās (tāpat kā gēna *IKZF1*) ir nozīme ALL patoģenēzē. Gēna *CDKN2A* delēcija homozigotiskā vai heterozigotiskā stāvoklī ir sastopama līdz pat 33% no visiem pre-B šūnu ALL gadījumiem (*Sulong et al.*, 2009).

2.12.4. Alēliskie varianti gēnos, kas iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā

Gēna *MTHFR* iespējamā iesaiste ALL etiopatogēnēzē

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). Viens no būtiskākajiem enzīmiem folāta metabolisma ceļā ir metilēna tetrahidrofolāta reduktāze (*MTHFR*), kas katalizē 5,10-metilēna tetrahidrofolāta neatgriezenisku reducēšanos par 5-metiltetrahidrofolātu, tādejādi kontrolējot līdzsvaru starp DNS metilēšanu un sintēzi (*Lightfoot et al.*, 2010).

Gēns, kas kodē MTHFR, ir lokalizēts 1. hromosomas īsajā plecā (1p36.3). Divi nozīmīgāki alēliskie varianti šajā gēnā ir: NM_005957.4:c.665C>T (NP_005948.3:p.Ala222Val) MAF A = 0,25 (rs1801133), kā rezultātā 222. aminoskābē alanīns tiek aizvietots ar valīnu un NM_005957.4:c.1286A>C (NP_005948.3:p.Glu429Ala) MAF G = 0,25 (rs1801131), kā rezultātā 429. aminoskābē glutamīnskābe tiek aizvietota ar alanīnu (Zintzaras *et al.*, 2012). Ja indivīdam alēliskais variants rs1801133 ir heterozigotiskā stāvoklī, enzīmam piemīt 70% no normālās aktivitātes, bet homozigotiskiem indivīdiem enzīma aktivitāte ir tikai 30% (Jain *et al.*, 2012). Savukārt, ja indivīdam alēliskais variants rs1801131 ir homozigotiskā stāvoklī, saglabājas apmēram 60% no sākotnējās enzīma aktivitātes (Yousefian *et al.*, 2014). Literatūrā ir aprakstīts, ka gēna alēlisko variantu rs1801133 un rs1801131 gadījumā statistiski ticami samazinās folāta līmenis serumā (Zappacosta *et al.*, 2014).

Folāta deficīts var izraisīt deoksiuridīna monofosfāta piesaisti DNS ķēdei DNS replikācijas laikā, kas var novest pie DNS ķēdes pārrāvumiem, hromosomālām translokācijām un delēcijām. MTHFR deficīts veicina genoma hipometilāciju un genomisko nestabilitāti (Cadieux *et al.*, 2006). Savukārt, DNS hipometilācija var rezultēties proonkogēnu paaugstinātā ekspresijā un aktivizācijā, tādējādi palielinot audzēja risku. Līdz ar to augstāk minētie alēliskie varianti, kas lokalizēti *MTHFR* gēnā, varētu modificēt ALL risku (J Yan *et al.*, 2012).

Gēna *MDR1* iespējamā iesaiste ALL etiopatogēnēzē

Gēns *MDR1* (*multi drug resistance gene*) kodē P glikoproteīnu, kuram viena no funkcijām ir aizsargāt organismu pret ksenobiotiķiem, kuriem var būt mutagēna aktivitāte (Semsei *et al.*, 2008). Lai gan joprojām nav patoģenētiski izskaidrots, kā tieši P glikoproteīna aktīvāte ietekmē kancerogēnēzi, pētījumi ir pierādījuši, ka samazināta enzīma aktivitāte predisponē vairākiem audzēju veidiem, tādiem kā hepatokarcinoma, kolorektāli audzēji un akūta limfoblastu leikoze. (LH Wang *et al.*, 2013). Pētījumi ar pelēm, kurām ir neaktīvs enzīms (*knockout*), ir pierādījuši, ka viņām simtkārtīgi palielinās jutīgums uz neirotoksiku pesticīdu (ivermecitīnu) un trīskārtīgi – uz kancerostatisku medikamentu (vinblastīnu). Šīm pelēm novēroja arī palēninātu medikamentu elimināciju, kā arī kumulatīvu pesticīdu toksicitāti (Schinkel *et al.*, 1994).

Gēnā *MDR1* ir aprakstīti vairāk nekā 50 alēliskie varianti (Ren *et al.*, 2012), visvairāk pētītie ir NM_000927.4:c.2677T>A (NP_000918.2:p.Ser893Ala) un NM_000927.4:c.2677T>G (NP_000918.2:p.Ser893Thr), alēliskais variants – rs2032582, kā

rezultātā alanīns tiek nomainīts ar serīnu vai treonīnu un klusējoša mutācija NM_000927.4:c.3435T>C (NP_000918.2:p.Ile1145=; rs1045642) (*LH Wang et al.*, 2013).

Minētie alēliskie varianti ietekmē P glikoproteīna aktivitāti, piemēram, alēliskais variants rs1045642 homozigotiskā stāvoklī samazina enzīma aktivitāti par 10% (*Sterjev et al.*, 2012). Salīdzinot matrices ribonukleīnskābes (mRNS) un proteīna līmeni indivīdiem ar un bez polimorfisma, pētnieki atklāja, ka tas ir līdzīgs, bet proteīnam bija izmainīta konformācija. Pētnieki izteica domu, ka reti izmantojamā kodona klātbūtne ietekmē translācijas laiku un P-glikoproteīna inserciju membrānā, tādējādi mainot substrāta un inhibitora mijiedarbības vietas struktūru (*Kimchi-Sarfaty et al.*, 2007).

Gēna *MDR1* alēliskā varianta rs2032582 T alēle homozigotiskā stāvoklī enzīma aktivitāti samazina par apmēram 34% (*Llaudo et al.*, 2013). Samazinoties enzīma aktivitātei, samazinās P glikoproteīna spēja izvadīt toksiskos ksenobiotiķus un apkārtējās vides kancerogēnus no šūnas (*H Wang et al.*, 2012).

Gēnu *GSTT1* un *GSTM1* iespējamā iesaiste ALL etiopatogēnēzē

Ārvides prokarcinogēnus aktivē pirmās fāzes enzīmi, pārvēršot tos starpproduktos, tālāk tos atindē otrās fāzes enzīmi, ieskaitot glutaciona S transferāzi (GST) (*Chauhan et al.*, 2012). Divi galvenie enzīmi, kas pieder glutaciona S transferāzes klasei, ir GST mu-1 (*GSTM1*) un GST teta -1 (*GSTT1*), kuri aizsargā DNS no bojājumiem, atindējot daudzus elektrofilus savienojumus, tos pievienojot glutacionam, tajā skaitā arī aktivētus kancerogēnus, tāpēc, lai pasargātu organismu no kancerogēniem, ir nepieciešams pietiekami augsts GST enzīmu līmenis (*Alves et al.*, 2002; *D Liu et al.*, 2013). Apmēram 20 – 50% indivīdu ir delēcija gēnos *GSTT1* un *GSTM1*, līdz ar to viņiem 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). Indivīdiem ar enzīmu nulles alēlēm biežāk veidojas somatiskas mutācijas un DNS fragmenti, kas kovalenti saistīti ar ķīmisku vielu (DNA-adduct) (*Q Tang et al.*, 2013).

Gēna *NQO1* iespējamā iesaiste ALL etiopatogēnēzē

Gēns *NQO1* (*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*) kodē NAD(P)H dehidrogenāzes kvinonu 1. Kopumā ir aprakstīti vairāk nekā 93 alēliskie varianti, no kuriem viens no visplašāk pētītajiem ir NM_000903.2:c.559C>T (NP_001020604.1:p.Pro153Ser) jeb rs1800566. Homozigotiskiem indivīdiem pēc T alēles tiek zaudēta enzīma aktivitāte, jo pats proteīns kļūst nestabils (*Ouerhani et al.*, 2013). Homozigotiskiem indivīdiem enzīma aktivitāte ir divi līdz četri procenti no normālas enzīma aktivitātes (*Misra et al.*, 2000),

heterozigotiskiem indivīdiem enzīma aktivitāte ir trīs reizes zemāka, nekā homozigotiskiem indivīdiem pēc C alēles (Zheng *et al.*, 2014). NQO1 funkcija ir reducēt un detoksificēt kvinīnus un to derivātus, lai aizsargātu šūnas no oksidatīvā stresa un kancerogēnēzes. Alēliskie varianti, kuri ietekmē enzīma aktivitāti, var predisponēt audzēju attīstību (S Yang *et al.*, 2015).

Meta-analīzes pētījumā, kurā tika analizēti septiņpadsmit pētījumi, kuros kopumā iekļauti 2264 leikozes pacienti un 3798 kontroles indivīdi, tika pierādīts, ka alēliskais variants rs1800566 ir akūtas leikozes riska faktors. Analizējot atsevišķi pediatriko populāciju, T alēle homozigotiskā stāboklī statistiski ticami bija saistīta ar paaugstinātu leikozes risku (OR = 1,35 95%CI 1,05-17) (C Li *et al.*, 2014).

Gēna *IL 15* iespējamā iesaiste ALL etiopatogēnēzē

Literatūrā ir aprakstīts, ka gēna *IL15* kodētais produkts ir interleikīns 15 (IL15). IL 15 ir pleiotrops citokīns, kurš pēc struktūras un receptoru komponentiem ir ļoti līdzīgs IL 2. Abiem šiem citokīniem ir būtiska loma imūnās sistēmas regulācijā (Williams *et al.*, 2014).

IL 15 ietekmē normālu T un B limfocītu, neitrofilu un NK proliferāciju, augšanu un diferenciāciju (Agostini *et al.*, 1997; Fehniger *et al.*, 2001). Mijiedarbojoties ar interleikīna divi receptoru (IL-2R), IL 15 regulē neoplastisko proliferāciju (Trentin *et al.*, 1996).

Pētījumi pierāda, ka ALL šūnās lielā daudzumā tiek ekspresēts IL 15 receptors alfa. Arvien vairāk pierādījumu liecina, ka ar membrānu saistītais IL 15 tiek prezentēts blakus esošām šūnām, kuras ekspresē IL 15 receptoru alfa, tādējādi izmantojot šūnas – šūnas kontaktu, proliferāciju un signālsistēmu. IL 15 proteīns, kurš ir saistīts pie membrānas, piedalās gēnu darbības regulācijā. Tādējādi IL 15 varētu būt saistīts ar ALL progresēšanu, ietekmējot leukemoīdo šūnu izvietošanos, augšanu un izdzīvošanu, kā arī infiltrāciju (Wu *et al.*, 2010)

IL 15 inducē ERK1/2 un STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) fosforilāciju, abi šo proteīnu signālceļi ir iesaistīti ALL patogēnēzē. Konstitutīva Raf/Ras/MEK/ERK ceļa aktivācija ir raksturīga tieši bērnu vecuma leikozēi. STAT5 aktivācija bieži ir saistīta ar augsta riska leikozi – Filadelfijas hromosomas pozitīvu vai Filadelfijas hromosomai līdzīgo, kas saistītas ar augstu recidīva risku un MRD.

Divos, savstarpēji nesaistītos GWAS pētījumos gēna *IL15* alēliskie varianti tika identificēti kā marķieri leikozes attīstībai un nesekmīgai indukcijas terapijai (Williams *et al.*, 2014).

Analizējot *IL15* alēlisko variantu saistību ar ALL attīstības risku pieaugušajiem, pētnieki identificēja divus alēliskos variantus, kas statistiski ticami bija saistīti ar paaugstinātu

leikozes attīstības risku (rezultāti attēloti tabulā 2.1). *Lin* un kolēģi savā pētījumā analizējot piecus gēna alēliskos variantus (rs10519612, rs10519613, rs35964658, rs17007695 un rs17015014), kas lokalizēti IL15 kodējošā gēnā, atklāja, ka alēliskie varianti rs10519612 un rs17007695 ir statistiski ticami saistīti ar palielinātu leikozes attīstības risku pieaugušajiem (*D Lin et al.*, 2010). Otrajā pētījumā pētnieki pierāda interleikīna alēlisko variantu saistību ar minimālo reziduālo slimību. Analizējot piecu gēna alēlisko variantu saistību ar minimālo reziduālo slimību (rezultāti attēloti 2.1. tabulā), pētnieki konstatēja, ka šie SNP atrodas nelīdzsvarotā saistībā (r^2 0,48 – 0,97) (*JJ Yang et al.*, 2009).

2.1. tabula

Literatūrā aprakstītie IL 15 alēlisko variantu saistība ar akūtu limfoblastu leikozi

Alēliskais variants	HGVS nosaukums	MRD saistība ar IL15			ALL saistība ar IL 15	
		MAF	P vērtība	OR 95% CI	P vērtība	OR 95% CI
rs10519612	NM_000585.4:c.379-190A>C	C 0,13	$1,03 \times 10^{-3}$	2,42 (1,41, 4,15)	$4,2 \times 10^{-2}$	1,37 (1,01–1,87)
rs10519613	NM_000585.4:c.*83C>A	A 0,13	$8,62 \times 10^{-4}$	2,18 (1,3, 3,68)	$1,5 \times 10^{-1}$	1,26 (0,92–1,72)
rs17007695	-	C 0,10	$1,31 \times 10^{-4}$	2,67 (1,53, 4,68)	$4,1 \times 10^{-2}$	1,38 (1,01–1,88)
rs35964658	-	G 0,12	$1,27 \times 10^{-3}$	2,38 (1,38, 4,1)	$1,9 \times 10^{-1}$	1,23 (0,91–1,68)
rs17015014	-	C 0,19	$1,11 \times 10^{-4}$	2,2 (1,42, 3,41)	$7,3 \times 10^{-1}$	1,06 (0,78-1,43)

IL 15 tiek uzskatīts par spēcīgu iekaisuma citokīnu, kas spēj destabilizēt hromosomas un inducēt kancerogēnēzi kā arī kontrolēt ļaundabīgu šūnu proliferāciju, ietekmējot audzēja vidi un imūno sistēmu (*Zarogoulidis et al.*, 2014).

Joprojām nav precīzi zināms vai IL 15 alēlisko variantu asociācija ar ALL ir saistīta ar tā tiešo bioloģisko funkciju, tādā gadījumā IL 15 tieši iedarbotos uz leukemoīdiem blastiem. Vai IL 15 iedarbība ir netieša – modulējot imūno sistēma, tomēr iespējama ir abu šo ceļu kombinācija (*Williams et al.*, 2014).

2.12.5. Citi faktori, kas potenciāli ietekmē akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku

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. Kā viens no ticamākajiem aģentiem tiek minēta infekcija (*Inaba et al.*, 2013). *Greaves* ar kolēģiem izvirza tā saukto “aizkavētās infekcijas” hipotēzi: ja infekciozie aģenti iedarbojas bērna dzīves ļoti agrīnajā posmā, tad leikozes attīstības risks ir samazināts, jo tas modulē imūnās sistēmas nobriešanu. Vēlīna infekcijas ekspozīcija potencē leikozes attīstību, netieši veicinot leukemoģenēzi. No otras puses eksistē *Smith* hipotēze, kas apgalvo, ka onkogēnie vīrusi, ar kuriem inficējas intra uterīni vai dzīves pirmajā gadā, spēj inficēt

nenobriedušos limfocītus un veicināt leukemoģenēzi, tieši ietekmējot transformācijas mehānismu (*Morales-Sanchez et al.*, 2014). Meta-analīzes pētījums, kurā tika analizēts ALL sastopamības biežums bērniem, kas apmeklē pirmskolas vecuma bērnu iestādi agrīnā vecumā (līdz divu gadu vecumam), salīdzinājumā ar bērniem, kuri neapmeklē, tika atrasta statistiski ticama atšķirība, ka agrīna infekcijas ekspozīcija samazina ALL risku; kopumā pētījumā tika analizēti 6 108 ALL pacienti (*Urayama et al.*, 2010).

Epidemioloģiskie pētījumi ir pierādījuši, ka pastāv saistība starp jonizējošo starojumu un akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku, piemēram, Hirosimā un Nagasaki saslimšanas līmenis ar leikozi bija divdesmit reižu augstāks kā populācijā. Vispārliciecināmie pierādījumi ir tieši par postnatālu jonizējošā starojuma ekspozīciju un ALL risku (*Belson et al.*, 2007).

Starp akūtas limfoblastu leikozes attīstības riska faktoriem tiek minēts arī liels dzimšanas svars, bet jaunākos pētījumos vairāk vērā tiek ņemts – liels gestācijas vecumam. Meta – analīzes pētījumā par asociāciju starp ALL attīstības risku un dzimšanas svaru, kas ir liels gestācijas vecumam, pētījumā iekļauti 7 348 ALL pacienti un 12 489 veseli kontroles indivīdi no 12 pētījumiem, un atrasta statistiski ticami rezultāti leikozes attīstības riskam bērniem, kuri ir lieli gestācijas vecumam, salīdzinājumā ar bērniem, kas ir atbilstoši gestācijas vecumam OR 1,24 (95% CI 1,13 – 1,36). Interesanti, ka statistiski ticami rezultāti ir grupā, kurā ALL attīstās pēc viena gada vecuma, bet, atsevišķi izdalot B šūnu ALL, statistiskā ticamība saglabājas OR 1,2 (95 % CI 1,09 – 1,33). Pētījuma autori izsaka empīrisku viedokli, ka leikozes attīstības risks ir saistīts ar insulīnam līdzīgo augšanas faktoru 1 (IGF-1), kas ir iesaistīts šūnu proliferācijā un apoptozes novēršanā. IGF1 līmenis bērniem, kas ir mazi gestācijas vecumam, ir zemāks, salīdzinot ar bērniem, kas ir lieli gestācijas vecumam. Vēl citos pētījumos pierādītā IGF iesaiste normālā un ļaundabīgā hematopoēzē – jo augstāki IGF līmeņi, jo mazāka iespējamība, ka mutāciju saturošie B limfocītu priekšteči ies bojā apoptozes ceļā, līdz ar to ir lielāks ALL attīstības risks (*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. Kā viens no iespējamajiem riska faktoriem tiek minēts arī liels mātes vecums, iespējamais patoģenētiskais mehānisms ir hromosomālā neatiešana mejozes laikā, kā arī citu iemeslu izraisīts DNS bojājums (*Mejia-Arangure et al.*, 2003).

3. MATERIĀLS UN METODES

3.1. Materiāls

Pētījumā iekļauti pacienti, kuriem laika posmā no 2005. gada līdz 2014. gada jūlijam diagnosticēta B limfoblastu priekšteču šūnu leikoze Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas (BKUS) hematoloģijas nodaļā. Pētījumā iekļauti tikai tādi indivīdi, kuri slimības diagnosticēšanas brīdī vēl nebija sasnieguši 18 gadu vecumu. Pētījumā pacienti tika iekļauti gan prospektīvi, gan retrospektīvi, ņemot vērā, ka pētījums tika uzsākts 2009. gadā, tad indivīdi, kuri bija diagnosticēti ALL līdz 2009. gadam pētījumā tika iekļauti jau sasnieguši pilnu remisiju. Indivīdi, kuriem ALL manifestējās pēc 2009. gada tika iekļauti prospektīvi, sasniedzot remisiju.

Šajā laika posmā ALL diagnosticēti deviņdesmit astoņiem indivīdiem. Astoņi no tiem bija miruši pētījuma uzsākšanas brīdī. Četriem bija veikta kaulu smadzeņu transplantācija, un viņi mira pētījuma gaitā. Viens no pacientiem pētījuma gaitā mira, nesaņemot remisiju un vēl viens emigrēja, nesaņemot remisiju. Kopumā pētījuma laikā astoņdesmit četri indivīdi bija dzīvi un Latvijā dzīvojoši. Pētījumā piekrita piedalīties septiņdesmit septiņi indivīdi. Septiņi indivīdi atteicās piedalīties pētījumā.

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 medicīnas ētikas komitejas atļauju (skatīt 2. pielikuma). Kopumā pētījumā iekļauti 91,67% no dzīvi esošajiem indivīdiem, kuri Latvijā slimojuši ar akūtu B limfoblastu priekšteču šūnu leikozi pēdējo deviņu gadu un sešu mēnešu periodā.

Asins paraugi DNS analīzei ņemti no perifērām venozajām asinīm pilnas remisijas laikā. Pacientiem, kuri tika iekļauti pētījumā hospitalizācijas laikā asins paraugi tika ņemti vienlaicīgi ar rutīnas analīzēm. Ņemot vērā, ka daļa pacientu pētījumā tika iekļauti retrospektīvi sertificēta medicīnas bērnu māsa asins paraugus ieguva manā klātbūtnē punktējot perifēro vēnu pacienta dzīves vietā vai konsultatīvajā poliklīnikā pacientam un viņa vecākiem izdevīgā laikā.

Piecdesmit gadījumos bija pieejami abi bioloģiskie vecāki, kuri piekrita piedalīties pētījumā, pirms asins paraugu paņemšanas parakstot informētas personas piekrišanas formu.

Septiņdesmit vienam indivīdam bija pieejami parafīna bloki ar kaulu smadzeņu paraugiem, savākti uzliesmojuma brīdī, lai veiktu imūnhistoķīmisko analīzi Ikaros proteīnam.

Pacientu iekļaušanas kritērijus skatīt 3.1. attēlā.



3.1. 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. Dati par dzīvi dzimušo bērnu skaitu skaitu iegūti no Centrālās statistikas pārvaldes (www.csb.gov.lv).

3.2. Metodes

3.2.1. 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, balstoties uz analizētajiem literatūras avotiem, kuriem ar vislielāko varbūtību iespējama saistība ar paaugstinātu leikozes attīstības risku. Pētījumam izvēlēti biežāk un

vairāk pētītie 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 izvēlēti alēliskie varianti gēnā *IL15* (rs10519612, rs10519613, rs17007695), kuriem iepriekš literatūrā aprakstīta saistība ar paaugstinātu ALL risku pieaugušo vecumā.

Gēna *PAX5* alēliskais variants NM_001280547.1:c.547G>A NP_057953.1: p.Gly183Ser analīzei izvēlēta, jo literatūrā aprakstīts, ka mutācija, izolēta heterozigotiskā stāvoklī, spēj predisponēt leikozes attīstību.

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

3.2.2. DNS izdalīšana no venozajām asinīm

Venozās asinis, kas ir savāktas etilēndiamīntetraacetātu (EDTA) saturošā stobriņā, sadala pa 1 ml stobriņos un sasaldē.

- 1) Sākot DNS izdalīšanu, iepriekš sasaldēto venozo asiņu paraugus atkausē, ievietojot maisītājā, istabas temperatūrā (30' – 1 h).
- 2) Asinis pārlej 15 ml stobriņā, tad tām pievieno 10 ml eritrocītu līzes A1 šķīdumu (ķīmisko sastāvu skat 3. pielikumā) un stobriņu invertē 3 reizes.
- 3) Samaisīto paraugu ievieto ledusskapī pie temperatūras 4° C uz 15 minūtēm, tad centrifūgē 15 minūtes pie temperatūras 4°C ar apgriezienu skaitu 4 440 rpm.
- 4) Pēc centrifugēšanas iegūto supernatantu nolej šķidro atkritumu tvertnē.
- 5) Nogulsnes, kas atlikušas stobriņā, šķīdina ar 800 µl šūnu suspensijas šķīdumu (ķīmisko sastāvu skat. 3. pielikumā), kad nogulsnes izšķīdušas, tās pārnes uz 2ml stobriņiem.
- 6) Stobriņus centrifūgē 10 min mikrocentrifūgā istabas temperatūrā ar 14 500 rpm
- 7) Pēc centrifugēšanas supernatantu nolej šķidro atkritumu tvertnē, bet nenolieto šķīdumu atsūc uzmanīgi ar pipeti, neaiztiekot nogulsnes.
- 8) Nogulsnes šķīdina ar 700 µl šūnu suspensijas šķīdumu.
- 9) Kad nogulsnes pilnībā izšķīdinātas, paraugam pievieno 80µl 10% nātrija duodecisulfāta (SDS) (ķīmisko sastāvu skat. 3. pielikumā) un 1µl proteināzi K (ThermoScientific Waltham, ASV).
- 10) Paraugu samaisa vorteksējot un nekavējoties ievieto termostatā pie +50°C uz 1h.

- 11) Inkubētajam paraugam pievieno 800 µl fenola, samaisa 3x invertējot (nedrīkst kratīt vai vorteksēt) un ievieto maisītājā uz vismaz 15 min (var atstāt arī uz nakti).
- 12) Pēc tam paraugu centrifugē 10 min mikrocentrifūgā istabas temperatūrā ar apgriezienu skaitu 14 500 rpm.
- 13) Supernatantu ar 200 µl pipeti pārnes jaunā 2ml stobriņā, cenšoties no starpslāņa paņemt pēc iespējas vairāk parauga, neaiztiekot fenola slāni. Stobriņu ar fenolu izmet ķīmisko atkritumu tvertnē.
- 14) Supernatantam pievieno 800 µl hloroforma, samaisa vorteksējot un ievieto maisītājā uz 5 minūtēm. Centrifugē 10 min mikrocentrifūgā istabas temperatūrā ar apgriezienu skaitu 14 500 rpm.
- 15) Iepriekš aprakstīto procedūru atkārto otrreiz.
- 16) Supernatantu ar 200 µl pipeti pārnes jaunā 1,5 ml stobriņā un pievieno 800 µl izopropanola, tad invertē 10-20x, līdz izveidojas nogulsnes (DNS).
- 17) Paraugu atkārtoti vorteksē 10 sekundes un centrifugē 10 min mikrocentrifūgā istabas temperatūrā ar apgriezienu skaitu 14 500 rpm.
- 18) Supernatantu nolej šķidro atkritumu tvertnē, bet nenolieto šķīdumu uzmanīgi atsūc, ar pipeti neaiztiekot nogulsnes (DNS).
- 19) Iegūtās DNS nogulsnes skalo, paraugam pievienojot 1,5 ml 70% metanola. Paraugu vorteksē 10 sekundes un centrifugē 10 minūtes mikrocentrifūgā istabas temperatūrā ar 14 500 rpm.
- 20) Paraugu žāvē 15min termostatā +50°C vai istabas temperatūrā atstājot uz nakti.
- 21) Izžuvušam paraugam pievieno 100 µl DNS šķīdināšanas šķīdumu (ķīmisko sastāvu skat. 3. pielikumā), samaisa vorteksējot, viegli nocentrifugē un atstāj šķīst ledusskapī pie +4°C 3 dienas.

Metode adaptēta MGZL pēc *John* un kolēģu aprakstītās DNS izdalīšanas metodes (*SW John et al.*, 1991).

3.2.3. Polimerāzes ķēdes reakcija

Veicot amplifikācijas reakciju, tika sagatavots standarta amplifikācijas reģentu maisījums (vienam paraugam – 13,4 µl destilēts ūdens, 2 µl 10 x PCR buferis (NH₄)₂SO₄–MgCl₂ ThermoScientific (*Waltham*, ASV), 2µl 25 mM MgCl₂ ThermoScientific (*Waltham*, ASV), 0,5µl 10mM dNTP mix (ThermoScientific *Waltham*, ASV), 0,5µl 10pmol F (forward) praimeris Sigma-Aldrich (ASV), 0,5µl 10 pmol R (*reverse*) praimeris Sigma-Aldrich (ASV), 0,1µl termostabilā polimerāze (rekombinanta 5U/µl) ThermoScientific (*Waltham*, ASV).

Pēc polimerāzes ķēdes maisījuma sagatavošanas tam pievieno 1 µl 50 ng/µl genomisko DNS.

Sintētisko oligonukleotīdu secības septiņiem alēliskiem variantiem (rs4132601, rs10821937, rs10821938, rs10994982, rs2239633, rs3731217 un rs1800566) un alēliskajam variantam gēnā *PAX5*, tika piemeklētas programmā Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) un septiņiem alēliskiem variantiem sintētisko oligonukleotīdu secības tika izvēlētas atbilstoši literatūrā aprakstītajām.

Amplifikācijas reakcijas tika veiktas pēc shēmas: iniciālā denaturācija 94°C 4', kam seko 30 atkārtoti cikli 94°C 30'' → praimeru piesaistes temperatūra 30 ''→72°C 30'', amplifikācijas reakcija tiek pabeigta 72°C 10' un noslēdzošais etaps 4°C 10'. Pēc amplifikācijas reakcijas veikšanas PCR produkts tika pārbaudīts 1,5% agarozes gelā (ķīmisko sastāvu un pagatavošanu skatīt 3. pielikumā)

3.2.4. Restrikcijas fragmenta garuma polimorfisma noteikšana

Lai noteiktu genotipus gēnu alēliskajiem variantiem, kuriem bija iespējams izveidot restrikcijas saitu, pēc polimerāzes ķēdes reakcijas veikšanas uz amplificētajiem fragmentiem iedarbojās ar restrikcijas endonukleāzēm. Pēc inkubācijas termostātā rezultāti tika analizēti 8% poliakrilamīda gelā (ķīmisko sastāvu un pagatavošanu skatīt 3. pielikumā).

Praimeru secības un to piesaistes temperatūras, kas izmantotas polimerāzes ķēdes reakcijas veikšanai, lai analizētu augstāk minētos gēna alēliskos variantus atainotas 3.1. tabulā.

3.1. tabula

Praimeru secības PCR reakcijām un to piesaistes temperatūras gēnu alēliskajiem variantiem, kuri analizēti ar restrikcijas endonukleāzēm

Gēna nosaukums	Gēna alēliskais variants	Praimeru secība	Piesaistes temp. °C
<i>IKZF1</i>	rs4132601	F 5' TCA TGG ATT TCT CTG CTC ACA 3'	59
		R 5' TTC TGG TTT GAG CTT TGT TTG A 3'	
<i>ARID5B</i>	rs10821937	F 5' AAA ACA TTG CCA GGA TCT GC 3'	60
		R 5' TAA ATA GCT GCT GCC CCA TC 3'	
<i>ARID5B</i>	rs10821938	F 5' TGG TGC TTT GGG GTA GTT TT 3'	59
		R 5' AAA AAT ACC CTG CCC CTT TG 3'	
<i>ARID5B</i>	rs10994982	F 5' CTC TTG AAC TCC TGG CCT CA 3'	60
		R 5' GCG TCA CCA AAC TCA GCT AA 3'	
<i>CEBPE</i>	rs2239633	F 5' GGG CTG GAA ACG CAC TAA TA 3'	47
		R 5' CCA CTC TGA GCA ACC TCC TC 3'	
<i>CDKN2A</i>	rs3731217	F 5' CAT GTA GAT GGT GCC CCT GA 3'	55
		R 5' CCC CTC TCA AAT ATG CTG TCC 3'	

3.1. tabulas turpinājums

Gēna nosaukums	Gēna alēliskais variants	Praimeru secība	Piesaistes temp. °C
<i>MTHFR</i>	rs1801131	F 5' CTT CTA CCT GAA GAG CAA GTC 3' R 5' CAT GTC CAC AGC ATG GAG 3'	60
<i>MTHFR</i>	rs1801133	F 5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3' R 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'	65
<i>MDR1</i>	rs1045642	F 5' TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG 3' R 5' AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC 3'	60
<i>MDR1</i>	rs2032582A	F 5' TCA GAA AAT AGA AGC ATG AGT TG 3' R 5' AGC AGT AGG GAG TAA CAA AAT AAC 3'	59
<i>MDR1</i>	rs2032582T	F 5' TTT GCA GGC TAT AGG TTC CAG 3' R 5' TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G 3'	58
<i>NQO1</i>	rs1800566	F 5' TGA GAA GCC CAG ACC AAC TT 3' R 5' TCT CCA GGC GTT TCT TCC AT 3'	60
<i>IL15</i>	rs10519612	F 5' CTC AAT GTC CTT AAC CCA TTA TTC GA 3' R 5' CCT CAC ATT CTT TGC ATC CAG A 3'	55
<i>IL15</i>	rs10519613	F 5' TAG ACA TAA CAA AAC ACT CGG CAT TT 3' R 5' CTC AAT GAC ATT TTT CTG CCT TCA 3'	60
<i>IL15</i>	rs17007695	F 5' TAG ACA TAA CAA AAC ACT CGG CAT TT 3' R 5' CTC AAT GAC ATT TTT CTG CCT TCA 3'	57
<i>PAX5</i>	NM_001280547 .1:c.547G>A NP_057953.1:p. Gly183Ser	F 5' GGC TCG GTC GTA CTC CAT CAG 3' R 5' CTC AGC CCT TTC CCG TGT T 3'	60

Gēna alēlisko variantu noteikšanai izmantotās restrikcijas endonukleāzes, kā arī restrikcijas fragmentu garumi bāzu pāros (bp) attēloti 3.2 tabulā.

3.2. tabula

Gēna alēlisko variantu noteikšanai izmantotās restrikcijas endonukleāzes un produktu garumi atkarībā no genotipa

Gēna nosaukums	Gēna alēliskais variants	PCR produkta garums (bp)	Restrikcijas endonukleāze	Fragmentu garumi (bp)	Atsauce
<i>IKZF1</i>	rs4132601	306	<i>MboI</i>	GG – 152, 97, 57 TT – 209, 97	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>ARID5B</i>	rs10821937	370	<i>Eco81I</i>	TT – 370 CC – 211, 59	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>ARID5B</i>	rs10821938	479	<i>BstXI</i>	AA – 479 CC – 305, 174	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>ARID5B</i>	rs10994982	311	<i>SatI</i>	AA – 311 GG – 196, 114	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>CEBPE</i>	rs2239633	382	<i>Bsh1236I</i>	TT – 382 CC – 291, 91	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>CDKN2A</i>	rs3731217	239	<i>MvaI</i>	TT – 239 GG – 152, 87	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>MTHFR</i>	rs1801131	256	<i>MboII</i>	CC – 205, 29, 23 AA – 177, 29, 27, 23	(Hanson et al., 2001)

Gēna nosaukums	Gēna alēliskais variants	PCR produkta garums (bp)	Restrikcijas endonukleāze	Fragmentu garumi (bp)	Atsauce
<i>MTHFR</i>	rs1801133	198	<i>HinfI</i>	CC – 198 TT – 176, 22	(Safarinejad et al., 2012)
<i>MDR1</i>	rs1045642	197	<i>MboI</i>	CC – 197 TT – 158, 39	(Kimura et al., 2005)
<i>MDR1</i>	rs2032582A	353	<i>BsrI</i>	KK – 353 AA – 270, 83	(Alpman et al., 2010; Kim et al., 2006)
<i>MDR1</i>	rs2032582T	226	<i>BanI</i>	TT – 226 RR – 200, 26	(Ayaz et al., 2013)
<i>NQO1</i>	rs1800566	207	<i>HinfI</i>	CC – 207 TT – 123, 84	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros
<i>IL15</i>	rs10519612	250	<i>Bsp119I</i>	CC – 250 AA – 227, 23	(D Lin et al., 2010)
<i>IL15</i>	rs10519613	122	<i>DraI</i>	CC – 122 AA – 96, 26	(D Lin et al., 2010)
<i>IL15</i>	rs17007695	126	<i>Bsp119I</i>	CC – 126 TT – 101, 25	(D Lin et al., 2010)
<i>PAX5</i>	NM_001280 547.1: c.547G>A	247	<i>TauI</i>	AA – 247 GG – 224, 23	Izstrādāts šī pētījuma ietvaros

Multipleksā polimerāzes ķēdes reakcija

Lai noteiktu *GSTT1* un *GSTM1* nulles genotipus homozigotiskā stāvoklī, tika izmantota multipleksā polimerāzes ķēdes reakcija, kad vienlaicīgi tiek noteikta delēcija abos gēnos, kā iekšējā kontrole tika izmantota dihidrofolāta reduktāzes (*DHFR*) gēna amplifikācija, lai novērstu iespējamību, ka amplifikācija nav notikusi produkta degradācijas dēļ. *PCR* maisījums tika sagatavots, kā iepriekš aprakstīts, taču, lai nemainītu reakcijas kopējo tilpumu, jo reakcijā tiek izmantoti trīs praimeru pāri, tika samazināts ūdens daudzums līdz 11,4 µl. Multipleksās polimerāzes ķēdes reakcijas veikšanai izmantoto praimeru secības un *PCR* produktu garumus skatīt 3.3. tabulā, reakcijai izmantotā praimeru piesaistes temperatūra ir 58°C. Tālāk paraugi tika analizēti 2% agarozes gelā. Metode adaptēta MĢZL pēc Kondo un kolēģu izstrādātās metodes (Kondo et al., 2009).

3.3. tabula

Praimeru secības multipleksai *PCR* reakcijai un *PCR* produktu garumi gēnu *GSTM1* un *GSTT1* delēciju noteikšanai

Gēns	Praimeru secība	PCR produktu garums (bp)
<i>GSTM1</i>	F 5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3'	480
	R 5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3'	
<i>GSTT1</i>	F 5'TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3'	215
	R 5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3'	
<i>DHFR</i>	F 5'CAC CGG CAA GAA CGG GGA CCT 3'	280
	R 5'ACC GAA GCC TCC ACC CAG TGG 3'	

3.2.5. Sekvenēšanas reakcijas veikšana

Iniciāli tiek veikta amplifikācijas reakcija, kā aprakstīts iepriekš, pēc amplifikācijas reakcijas produkts tika pārbaudīts 2% agarozes gelā. Tālāk veica produkta attīrīšanu, paraugam pievienojot 0,5 µl eksonukleāzi (ExoI) ThermoScientific (Waltham, ASV) un 1µl garneļu sārmains fosfatāzi (SAP) ThermoScientific (Waltham, ASV), paraugu inkubēja 15 minūtes temperatūrā 37°C un pēc tam 15 minūtes – 85°C, tad atdzesē līdz 4°C. Metode adaptēta MĢZL pēc Werle un kolēģu aprakstītā protokola (Werle *et al.*, 1994).

Pēc PCR produkta attīrīšanas veica sekvenēšanas PCR reakciju, kurai tika sagatavots amplifikācijas reaģentu maisījums, vienam paraugam – 5 µl destilēts ūdens, 1 µl 5x sekvenēšanas bufferis (Applied Biosystems Waltham, ASV), 1µl BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems Waltham, ASV), 1 µl sintētiskais oligonukleotīds, pievienojot 2 µl PCR produktu.

Sekvenēšanas PCR programma: ātra denaturācija 94°C 1'', kam seko 25 atkārtoti cikli: 96°C 10''→ praimeru piesaistes temperatūra 5''→ 60°C 4'; pēc tam seko reakcijas pabeigšana 4°C 7'. Metode pielāgota MĢZL saskaņā ar ražotāja rekomendēto protokolu.

Pēc sekvenēšanas reakcijas, pirms kapilāra elektroforēzes, tika veikta sekvenēšanas produkta attīrīšana no liekajiem oligonukleotīdiem. Sākotnēji veica etanola/ EDTA Sigma-Aldrich (ASV) precipitāciju, paraugam pievienojot 2,5 µl EDTA un 25 µl 96% etanola, 15 minūtes paraugu inkubē istabas temperatūrā.

Pēc tam paraugus centrifugē pie +4 °C ar 4 400 rpm 45 minūtes, supernatantu uzmanīgi atsūca ar pipeti, pievieno 30 µl auksta 70% etanola un invertē 5×, pēc tam atkal centrifugē pie +4°C ar 4 400 rpm 15 minūtes. Supernatantu atsūca uzmanīgi ar pipeti un žāvē termostātā pie +50°C, tad pievieno 12 µl formamīda un inkubē pie 95°C 5 minūtes, beigās ievieto paraugus sekvenatorā sekvenēšanas reakcijas veikšanai (metode aprakstīta ražotāja izdotajā rokasgrāmatā).

Sekvenēšanas elektroferogrammas analizētas, izmantojot programmu “*Chromas*” 2.4 versiju. Iegūtās sekvenses salīdzinātas ar “*BLAST*” (Altschul *et al.*, 1997) pieejamo references sekvenci.

Gēna *ARID5B* alēlisko variantu sekvenēšana, praimeru secības un piesaistes temperatūru skatīt 3.4. tabulā.

Praimeru secības un piesaistes temperatūras, kas izmantotas gēnā *ARID5B* alēlisko variantu sekvenēšanas reakcijā

Gēna <i>ARID5B</i> alēliskie varianti	Paimera secība	Piesaistes temperatūra
rs7908445 rs7923074 rs77918077 rs10821936 rs12246030	F 5'CAG TGA GAG CGA GAC TGC AC 3' R 5' TCC TGG CAA TGT TTT TCA CA 3'	60°C
rs7896246	F 5'GAG GCC ATT CTA GTG CGT TC 3'	60°C
	R 5' ACT ACC CCA AAG CAC CAT TG 3'	
rs7089424	F 5' GGC CAT GAA GTC TCA CCT GT 3'	60°C
	R 5' TTT CAA ACC CAA AAC CAA GG 3'	

- Gēna *IKZF1* pilna sekvenēšana.

Pilna gēna *IKZF1* sekvenēšana tika veikta visiem probandiem. Sestā un astotā eksona sekvenēšana tika veikta kontroles grupai (septiņdesmit septiņiem pēc vecuma un dzimuma atbilstošiem indivīdiem).

Gēna sekvenēšanai tika izmantoti divi praimeru pāri, kuri piemeklēti, izmantojot brīvpieejas programmu „Primer 3” (<http://primer3.ut.ee/>). Pirmajā amplifikācijas reakcijā tika izmantoti divi praimeru pāri – “ārējie”, kas veido garāko fragmentu, savukārt, sekvenēšanas reakcijai tika izmantots viens no “iekšējiem” praimeriem, kuri veido īsāko jeb iekšējo fragmentu, lai uzlabotu sekvenences kvalitāti. Astotais eksons sekvenēts ar diviem “iekšējiem” praimeriem, jo eksona garums ir 710 bp (praimeru secības skatīt 3.5. un 3.6. tabulās). Visām amplifikācijas reakcijām ar “ārējiem” praimeriem, to piesaistes temperatūra bija 60°C, sekvenēšanas reakcijām ar “iekšējiem” praimeriem, praimeru piesaistes temperatūra bija 58°C.

Ārējo praimeru secības gēnā *IKZF1* sekvenēšanai

Eksona Nr.	F praimeris	R praimeris
2.	5'GGTCCTCCTGTGCTTGTAAATG3'	5'TCTTGGAGGCTTTCTGTTCAG3'
3.	5'TGTGTGGGGAGAAGTGAAGTT3'	5'AACTTGGACATTTTGCAGGGG3'
4.	5'CTATGGATGGAGAGGGCTGG3'	5'AGGGTGGGAATTGGTACGTGT3'
5.	5'TAGCATCGTCCTCATGTCCC3'	5'GTGTGTGTATGTGCATGGGG3'
6.	5'GAGTCGCATGAGTTCTTGGT3'	5'CGATTGGAAGTGGGAAGGGT3'
7.	5'TAATCCCAGTCCAGCCTCTG3'	5'ATGTCCACAGGCAGATCACA3'
8.	5'TGTGTGTATGTGTGCAGGTG3'	5'GGGGATTCTAGGAAGCGACA3'

Iekšējo praimeru secības, kas izmantoti gēna *IKZF1* sekvenēšanai

Eksona Nr.	F praimeris	R praimeris
2.	5'AAGGATCAAGGTCTGTGCCA3'	5'TGAAGGAAACACTCAGGCAA3'
3.	5'CCCAGGCACCTTGACCAT3'	5'AGGTTTCACAGGCACAGAGG3'
4.	5'GCTGCTCTCCCCTTGGTATT3'	5'CTCCTTCAAACCCCATGCAC3'
5.	5'TCTCACCAGCTCTCCTCTCT3'	5'GTGTGTTATGTGCATGGGG3'
6.	5'CATTCCCCTTACACAGAAGGC3'	5'ACGTGCTTCTGGTGAAACTG3'
7.	5'GACGCGACTGAACCCTTTAA3'	5'TCCCTTTCTTCCACCCTCAA3'
8.	5'CCCTCCCCGGTTGTAGATTT3' 5'TGCTCTTCTCTGGATCACGTC3'	5'GTCCTTGTGCTTTTCCTGG3'

Par references sekvenci tika izmantota pirmais transkripta variants (NM_006060.4), kas sastāv no 8 eksoniem. Kopējais eksonu garums pēc splaisinga ir 6189 nukleotīdi. Proteīna izoforma 1 (NP_006051.1) sastāv no 7 kodējošiem eksoniem. Proteīns veidots no 519 aminoskābēm.

3.2.6. Kaulu smadzeņu imūnhistoķīmiskā analīze

Pēc trepānbiopsijas veikšanas kaulu smadzeņu paraugu fiksēja 10% formalīna šķīdumā apmēram 24 stundas. Pēc fiksācijas paraugus skaloja ar krāna ūdeni trīs reizes pa vienai stundai. Nākamajā solī dekalcinēja trepāna biopsiju – paraugu ievietoja rūpnieciski sagatavotā dekalcinizācijas šķīdumā – „*Osteodec – bone marrow biopsy decalcifying solution*” (Bio – Optica, Itālija) uz četrām stundām. Pēc tam preparātu skaloja ar TRIS (ķīmisko sastāvu skatīt 3. pielikumā) buferi trīs reizes, katru reizi divdesmit minūtes. Pēdējais solis preparātu sagatavošanā ir atūdeņošana un attaukošana, kad preparātus iegremdēja 70% spirtā uz 24 stundām, visbeidzot sekoja apstrāde ar ksilolu, lai preparātam varētu uzliet parafīnu, kuram sacietējot izveidotos parafīna bloks. Lai trepāna biopsiju analizētu ar imūnhistoķīmiskām metodēm, nepieciešams apmēram 3–4 mm biezs parauga gabaliņš. Histoloģisko griezumus veica ar rotācijas mikrotomu, pēc tam griezumus lika uz priekšmetstikliņiem un žāvēja apmēram divas stundas. (Parafīna bloki un histoloģiskie griezumi tika sagatavoti Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas patoloģijas biroja histoloģijas laboratorijā.)

Imūnhistoķīmiskā reakcija tika veikta pēc zemāk aprakstītās shēmas. Vispirms veica preparāta deparfinizāciju. Lai atmazgātu parafīnu, preparātu divas reizes pa piecām minūtēm apstrādāja ar ksilolu, savukārt, lai attīrītu preparātu no ksilola, preparātu mazgāja ar etilspirtu trīs reizes, katru reizi trīs minūtes. Otrajā solī paraugu apstrādāja ar modificētu citrāta buferi – „*Target Retrieval Solution*” (Dako, ASV) 20 minūtes 180 W mikroviļņu krāsnī, pēc tam preparātu atdzesēja līdz 65°C.

Tālākā parauga apstrāde notika speciālā – noslēgtā kamerā (ražotājs – Bio-Optica, Itālija), kas tiek izmantota, lai paraugs atrastos adekvātā mitrumā un būtu fiksēts, vienlaicīgi nesaskaroties ar citām virsmām. Trešais solis bija divkārtīga parauga skalošana ar TRIS buferi, katru reizi piecas minūtes, kam sekoja apstrāde ar 3% ūdeņraža peroksīdu – desmit minūtes.

Visbeidzot paraugs tika marķēts ar poliklonālām truša primārām antivielām anti – Ikaros (Abcam, Lielbritānija) atšķaidījumā 1:500. Antivielu atšķaidīja ar komerciāli pieejamu antivielu atšķaidītāju – „*Dako Antibody diluent*” (Dako, ASV), kurš sastāv no TRIS- HCl, stabilizējošā proteīna un 0,015 mol/l nātrija azīda. Piecdesmit mikrolitru atšķaidītās primārās antivielas uznesa uz parauga un atstāja iedarboties uz trīsdesmit minūtēm. Pēc iedarbības ar primāro antivielu, paraugu atkal skaloja ar TRIS buferi, divas reizes, katru reizi piecas minūtes. Sestajā solī uz paraugu iedarbojās ar sekundāru antivielu piecdesmit mikrolitru apjomā uz trīsdesmit minūtēm, kura jau komerciāli ir pieejama atšķaidījumā (Dako, ASV).

Septītajā solī preparātus atkārtoti skaloja ar TRIS buferi vienu reizi piecas minūtes, kam sekoja DAB – diamīna benzoāta reakcija, maisījumu sagatavoja no 1 ml DAB bufera un diviem pilieniem DAB hromogēna (Dako, ASV), reakcijas ilgums bija piecas minūtes.

Lai varētu preparātā izšķirt šūnu kodolus, nepieciešams to nokrāsot ar hematoksilīnu, uz trīs minūtēm paraugam uznesa vienu pilienus hemtoksilīnu (Bio – optica, Itālija). Lai pabeigtu imūnhistoķīmijas reakciju paraugu attūdeņoja, iedarbojoties divas reizes pa trīs minūtēm ar spirtu, un tam sekojošu iedarbību ar ksilolu – divas reizes pa piecām minūtēm, tad uz parauga uznesa līmi (Bio – Optica, Itālija), liek segstikliņu, ļaujot preparātam izžūt.

Preparātu analizēj nākamajā dienā gaismas mikroskopā, izmantojot četrdesmit kārtīgu palielinājumu, analizējot desmit redzes laukus, pa simts leukocītiem katrā. Metode adaptēta BKUS pēc ražotāja (Dako, ASV) protokola.

3.2.7. Asins paraugu imūnhistoķīmiskā analīze

Pirmajā solī sagatavoja asins parauga iztriepi, uz priekšmetstikliņa uznesot pusotru mikrolitru venozo asiņu parauga, kas paņemtas pacientam pilnas remisijas laikā. Paraugu žāvēja istabas temperatūrā vienu diennakti. Preparātu fiksēja ar acetonu, iegremdējot traukā ar acetonu uz trīsdesmit sekundēm. Tālākā reakcija ir analoga kaula smadzeņu preparātu imūnhistoķīmiskai analīzei.

Paraugus atmazgāja ar TRIS buferi desmit minūtes, atmazgāšanu atkārtoja četras reizes. Tālākā reakcija tiek veikta noslēgtā kamerā. Paraugu 10 minūtes inkubēja ar 3% ūdeņraža peroksīdu, uznesot uz priekšmetstikliņa 75 mikrolitrus. Pēc tam paraugus atkārtoti atmazgāja ar TRIS buferi, inkubējot pa desmit minūtēm četras reizes.

Atmazgāšanai sekoja inkubācija ar primāru antivielu – poliklonālām truša primārām antivielām anti – Ikaros (Abcam, Lielbritānija) atšķaidījumā 1:500. Tālāk veica otrreizēju atmazgāšanu ar TRIS buferi, četras reizes pa desmit minūtēm. Pēc atmazgāšanas paraugu trīsdesmit minūtes inkubēja ar sekundāro antivielu „*Dako Envision*”, kas jau komerciāli pieejama atšķaidījumā (Dako, ASV). Preparātu atmazgāja no antivielas ar TRIS buferi, četras reizes, katru reizi pa desmit minūtēm. Antigēna vizualizācijai izmantoja DAB sistēmu (Dako, ASV), inkubācija ilgst piecas minūtes. Preparātu atmazgāja ar ūdeni.

Pēc tam trīsdesmit sekundes krāsoja ar hematoksilīnu, lai varētu vizualizēt kodolus. Hematoksilīnu atmazgāja ar ūdeni piecas minūtes. Pēdējā solī pielieto uz ūdens bāzes veidotu līmi un pārklāja ar segstikliņu.

Paraugus analizēja gaismas mikroskopā (četrdesmitkārtīgā palielinājumā); kopumā analizējot 100 šūnas un procentuāli izsakot, cik no tām ir pozitīvas, respektīvi, kurām vizualizē brūno krāsojumu.

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

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

3.2.9. Datu statistiskā apstrāde

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

Gadījuma – kontroles analīzei izmantotās metodes

Statistiskā analīze gadījuma – kontroles grupā, lai analizētu gēnu alēlisko variantu iespējamo saistību ar akūtu limfoblastu leikozi, tika veikta, izmantojot programmatūru PLINK 1.07 (Purcell *et al.*, 2007). Visiem analizētajiem alēliskajiem variantiem tika noteikts, vai ir novirze no Hārdija Veinberga līdzsvara. Lai salīdzinātu alēļu biežumu gadījuma un kontroles grupā, izredžu attiecība ar ticamības intervālu 95% tika noteikta, izmantojot Hī kvadrāta (χ^2) testu, par statistiski ticama asociāciju tika uzskatīta p vērtība $< 0,05$. Genotipu analīze tika veikta, izmantojot *Cochran-Armitage* tendences testu un dominanti/recesīvo pārmantošanas modeļa testu ar ticamības intervālu 95%, par statistiski ticama asociāciju tika uzskatīta p vērtība $< 0,05$.

Haplotipu analīze tika veikta, veidojot “logus”, iekļaujot trīs līdz astoņus alēliskos variantus, analizējot gēna *ARID5B* 3.intronā lokalizētos alēliskos vēliskos variantus un veidojot “logus”, iekļaujot divus līdz trīs alēliskos variantus, analizējot variantus, kas lokalizēti gēnos *MTHFR*, *MDR1* un *IL15*. Visiem alēliskajiem variantiem atsevišķi tika noteikta asociācija, izmantojot standarta Hī kvadrāta (χ^2) testu, kā α nomināls tika pieņemts 0,05.

Lineārās regresijas analīzei kā kovariātus izmantoja ALL pacientu dzimumu un hromosomu skaitu leukemoīdās šūnās (tikai gēna *ARID5B* analīzei), vecumu, piederību riska grupai un recidīvu (visiem pārējiem pētījumā analizētajiem alēliskajiem variantiem).

Nemot vērā, ka GSTT1 un GSTM1 genotipēšanas metode neļauj identificēt genotipu heterozigotiskā stāvoklī, Hī kvadrāta testa veikšanai tika izmantota brīvpieejas programma JavaStat (Rosner, 2006).

Ģimeņu pētījuma analīze

Ģimeņu pētījuma modelī statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot programmatūru PLINK 1.07 (Purcell et al., 2007), analizējot riska alēles pārmantojamību, tika izmantots nelīdzsvarotas pārmantojamības tests (*transmission disequilibrium test* – TDT), kur izredžu attiecībai (*odds ratio* – OR) tika izmantots 95% ticamības intervāls. Haplotipu analīze tikai veikta, izmantojot haplotipos balstītu TDT testu. Par statistiski ticamu rezultātu tika uzskatīts, ja p vērtība bija mazāka par 0,05.

Gadījuma – kontroles un ģimeņu pētījuma modeļu statistisko rezultātu apkopošanai un rezultātu statistiskās uzticamības palielināšanai tika izmantota hibrīdanalīze, kur analīze veikta, izmantojot programmatūru R, spraudni *Haplin*, kas balstās uz log-lineāro modeli un nepieciešamības gadījumā izmanto sagaidāmo maksimizējamo – *expectation-maximization* EM algoritmu haplotipu rekonstrukcijai (Jugessur et al., 2009).

Papildus ar šo programmatūru veikta gēnā *MDR* lokalizētā alēliskā varianta rs2032582 analīze ar pielāgotu log-lineāro modeļa palīdzību, jo alēliskais variants ir triālēlisks.

Ikaros ekspresijas analīze

Analizējot pacientu saslimstības vecumu, izmantota aprakstošā statistika, vidējais aritmētiskais, standartnovirze. Analizējot proteīna ekspresiju kaulu smadzenēs un to saistību ar genotipiem un slimības gaitu, vispirms tika noteikta datu atbilstība normālajam sadalījumam, izmantojot Kolmogorova–Smirnova testu. Parametriskiem datiem kvantitatīvo atšķirību analīzei starp divām grupām tika izmantots Stjudenta t-tests. Neparametriskajiem datiem tika izmantots Manna–Vitnija tests (*Mann-Whitney test*) un Wilkoksona tests (*Wilcoxon test*). Datu statistiskai apstrādei tika izmantota programmatūra SPSS 20 (IBM

Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Atrasto ģenētisko variāciju pārbaude

Lai analizētu identificēto alēlisko variantu gēnā *IKZF1* iespējamo ietekmi uz splaisingu, procesēšanas iespējamie rajoni tika analizēti programmā *Human splicing finder* – HSF 3.0, kas ir bioinformātikas instruments, kura datu bāzē ir visas pieejamās matricas papildus sekvenču noteikšanai, kā arī jaunas matricas piesaistes vietu noteikšanai tiek izmantota informācija no serīna – arginīna bagātajiem proteīniem – splaisinga *enhancera* proteīna 9G8; splaisinga regulatora – Tra2-β un splaisinga *silencera* faktora – hnRNP A1 ribonukloproteīna, kas tiek izmantoti, lai automātiski kalkuletu potenciālo splaisa saitu *consensus* vērtības (CV), kā arī meklēti iespējamie zarojuma punkti, papildus rezultātu izvērtēšanai tiek demonstrēti iegūtie rezultāti no citiem bioinformātikas instrumentos izmantotajiem algoritmiem (*Desmet et al.*, 2009). Splaisa saiti, kuriem CV ir lielāks par 80, ir stipri splaisa saiti, mazāk stipri ir splaisa saiti ar CV no 70 līdz 80, savukārt, ja CV ir 65 līdz 70, šie splaisa saiti uzskatāmi par vājiem, un tikai daļa no tiem ir aktīvi, tādejādi parasti tos uzskata par nefunkcionāliem. Lai izvērtētu ģenētiskās variācijas nozīmīgumu, būtiski arī izvērtēt CV starpību starp references secību un secību ar ģenētisko variāciju, ja samazināšanās ir vismaz par 10% jebkurā pozīcijā vai 7% +4 pozīcijā, tad ģenētiskā variācija visticamāk ietekmē splaisingu (*Skjorringe et al.*, 2011).

Nelīdzsvarotās saistības noteikšana

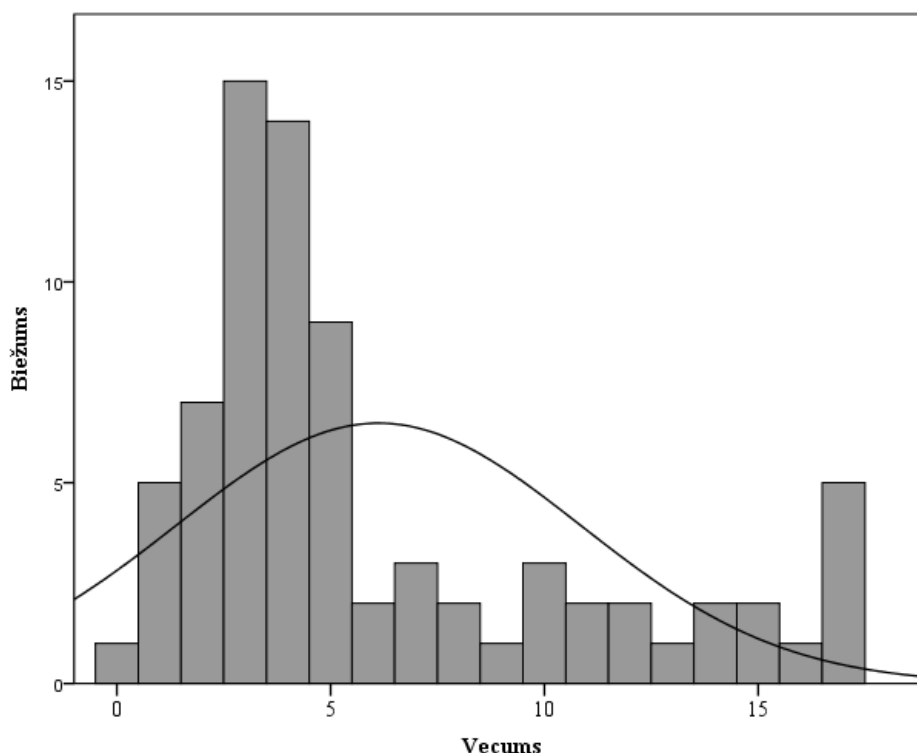
Lai analizētu alēlisko variantu savstarpējo nelīdzsvaroto saistību (*linkage disequilibrium* – LD), tika izmantota programmatūra *haploview*. Ja korelācijas koeficients (r^2) = 0, tad aplūkotie alēliskie varianti ir pilnā līdzsvarotā saistībā un pārmantojas neatkarīgi viens no otra, ja korelācijas koeficients = 1, aplūkotie alēliskie varianti atrodas pilnā nelīdzsvarotā saistībā un tiek pārmantoti kopā.

4. REZULTĀTI

4.1. Pētījumā iekļauto akūtas limfoblastu leikozes pacientu raksturojums

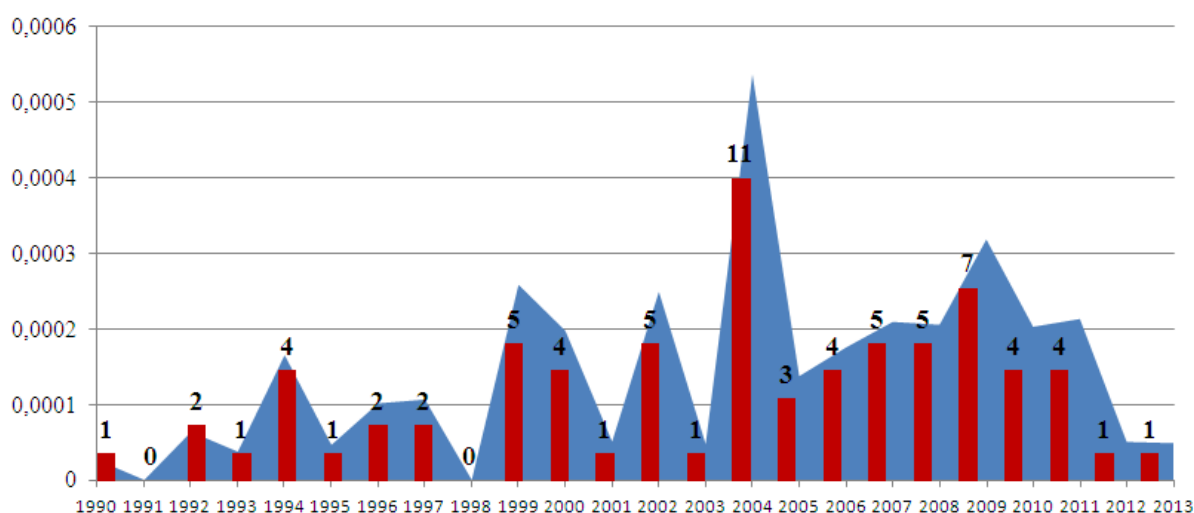
Pētījumā tika iekļautas trīsdesmit sešas meitenes un četrdesmit viens zēns ar akūtu limfoblastu leikozi, zēnu un meiteņu attiecība bija 1,14 : 1.

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 4.1. attēlā.



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

Vislielākais akūtas limfoblastu leikozes sastopamības biežums bija starp 2004. gadā dzimušajiem bērniem. Kopumā 14,3% no pētījumā iekļautajiem pacientiem bija dzimuši 2004. gadā. Pacientu skaitu atkarībā no dzimšanas gada un dzīvi dzimušo bērnu skaita attiecīgajā gadā skatīt 4.2. attēlā.



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

Sadalot pacientus riska grupās, kurās apvienoti BFM 95 un COG augsta riska kritēriji (MRD 33. dienā, Filadelfijas hromosomas klātbūtne (Ph⁺), bērnu vecums diagnozes brīdī lielāks vai vienāds ar desmit gadiem, leikozes manifestācijas brīdī leukocītu skaits > 50 000), četrdesmit astoņi pacienti atbilda standarta riska grupai, bet divdesmit septiņi – augsta riska grupai. Četrpadsmit indivīdi no divdesmit septiņiem tika iekļauti augsta riska grupā, jo diagnozes brīdī viņu vecums bija lielāks vai vienāds ar desmit gadiem un nebija citi riska faktori, vēl diviem pacientiem vecums bija lielāks vai vienāds ar desmit gadiem, trīsdesmit trešajā slimības dienā minimālā reziduālā slimība bija > 5%, un vēl vienam indivīdam, papildus augsta riska vecumam un minimālai reziduālai slimībai, citogēnētiski bija konstatēta Filadelfijas hromosoma. Astoņi pacienti augsta riska grupā tika iekļauti, jo diagnozes brīdī leukocītu skaits bija lielāks par 50 000 mm³. Divi pacienti augsta riska grupā tika iekļauti, jo tiem bija viens kritērijs – minimālā reziduālā slimība > 5% 33. slimības dienā. Augsta riska grupas pacientu sadalījumu pēc risk faktoriem skatīt 4.1. tabulā.

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.

4.1. tabula

Akūtas limfoblastu leikozes augsta riska grupas pacientu iedalījums pēc riska faktoriem

Vecums ≥ 10 gadiem	Leukocītu skaits ≥ 50 000	MRD	Ph ⁺	Vecums ≥ 10 gadiem + MRD	Vecums ≥ 10 gadiem + MRD + Ph ⁺
14	8	2	0	2	1

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

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

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

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

Papildus tika veikta analīze diviem alēliskiem variantiem, kas atradās sekvenētajā reģionā, rs77918077 un rs12246030, kuri neatbilda pētījuma iekļaušanas kritērijiem. Varianta rs77918077 A alēle tika identificēta sešiem probandiem. Visiem sešiem indivīdiem šis alēliskais variants bija heterozigotiskā stāvoklī, homozigotiskā stāvoklī šis alēliskais variants probandiem netika identificēts. A alēles biežums probandiem bija 4,17%. Arī kontroles grupā A alēle heterozigotiskā stāvoklī identificēta 6 indivīdiem. A alēles biežums kontroles populācijā bija 2,46 %. Alēles sastopamības biežums statistiski ticami neatšķīrās pētījuma un kontroles grupā ($p = 0,374$ OR = 1,73 95% CI 0,48 – 6, 17).

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

Veicot alēļu asociāciju analīzi visu alēlisko variantu genotipu sadalījums atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram (rs10994982 $p = 0,42$, rs7908445 $p = 0,55$, rs7923074 $p = 0,61$, rs10821936 $p = 0,37$, rs10821937 $p = 0,55$, rs7896246 $p = 0,2$, rs10821938 $p = 0,12$, rs7089424 $p = 0,55$).

Sešiem no astoņiem analizētajiem alēliskajiem 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 4.2. tabulā.

4.2. tabula

Gēnā *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 koriģēta 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

4.2. tabulas turpinājums

	MAF	Biežums pacientu grupā	Biežums kontroles grupā	OR CI 95%	p vērtība	OR CI 95%	p vērtība koriģēta pēc dzimuma
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
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 alēliskajam variantam atsevišķi, septiņiem alēliskajiem 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 alēliskajiem variantiem. Rezultāti attēloti 4.3. tabulā. Genotipu relatīvais sastopamības biežums attēlots 4. pielikumā.

4.3. tabula

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

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

Izvērtējot gēna alēlisko variantu saistību ar ALL attīstības risku ģimeņu pētījumā, visi astoņi analizētie alēliskie varianti statistiski ticami nozīmīgi bija saistīti ar ALL. Rezultāti parādīti 4.4. tabulā.

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

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

Lai pastiprinātu rezultātu statistisko ticamību, abi pētījuma modeļi: gadījuma – kontroles un pacienta – vecāku trio pētījums tika apvienoti, izmantojot hibrīdmetodi (*Jugessur et al.*, 2009). Izmantojot hibrīdmetodi, visi astoņi analizētie alēliskie varianti homozigotiskā stāvoklī bija statistiski ticami saistīti ar ALL attīstības risku bērnu vecuma. Rezultāti parādīti 4.5. tabulā.

Gēna ARID5B 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu asociāciju hibrīdanalīze

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)	$0,4 \times 10^{-3}$
rs10821937	1,35 (0,76-2,35)	0,312	5,29 (2,32-11,9)	$0,2 \times 10^{-3}$
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)	$0,2 \times 10^{-3}$
rs10994982	1,3 (0,71-2,33)	0,384	2,43 (1,14-5,13)	0,024

RR – relatīvais risks; CI – ticamības intervāls

Iespējamie riska haplotipi tika analizēti abos pētījuma modeļos – gan gadījuma – kontroles, gan ģimeņu pētījumā. Haplotipi tika veidoti, sākot no trīs alēliskajiem variantiem haplotipā līdz pat visiem analizētajiem astoņiem vienlaicīgi. Analizējot haplotipus gadījuma – kontroles pētījuma modelī, nozīmīgākais rezultāts ar maksimāli lielāko iekļauto variantu skaitu bija haplotips – rs10821937/rs7896246/rs10821938/rs7089424 – CAAG (p vērtība = 0,02). Iekļaujot haplotipā astoņus alēliskos variantus, abos pētījuma dizainos statistiski ticami ar ALL attīstības risku bija saistīts haplotips: rs10994982/rs7908445/rs7923074/rs10821936/rs10821937/ rs7896246/rs10821938/rs7089424. Statistiski ticamie haplotipu analīzes rezultāti attēloti gadījuma – kontroles pētījumā 4.6.tabulā.

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

Iekļautie alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Biežums ALL pacientiem	Biežums kontroles grupā	H _i kvadrāts	p vērtība
Trīs varianti haplotipā					
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
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
Četri varianti haplotipā					
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
Pieci varianti haplotipā					
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
Seši varianti haplotipā					
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
Septiņi varianti haplotipā					
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
Astoņi varianti haplotipā					
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

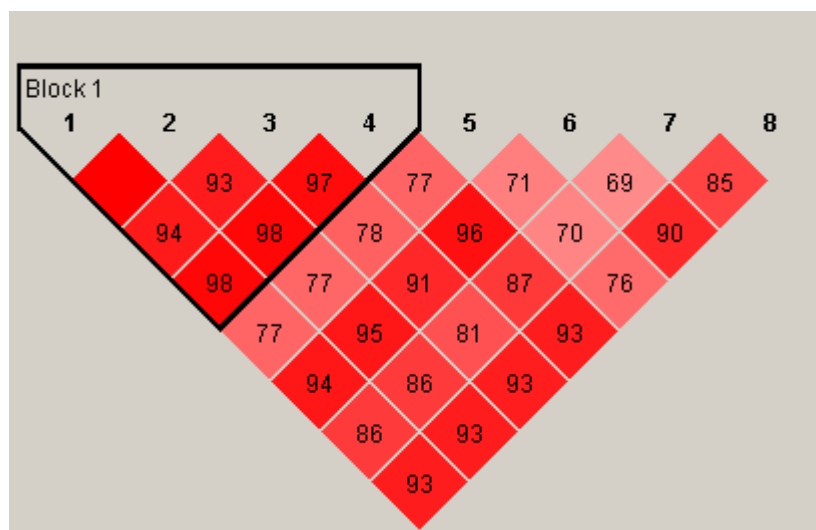
Savukārt, ģimeņu pētījuma modelī statistiski nozīmīgākais bija haplotips no septiņiem alēliskiem variantiem: rs7908445/rs7923074/ rs10821936/ rs10821937/rs7896246/rs10821938/ rs7089424 – TACCAAG (p vērtība = 0,0008). Ģimeņu pētījuma modeļa haplotipu analīze atainota 4.7. tabulā.

Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu haplotipu analīze ģimeņu pētījumā

Iekļautie alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Nodotā alēle	Nenodotā alēle	Hī kvadrāts	p vērtība
Trīs varianti haplotipā					
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	$0,7 \times 10^{-3}$
2/3/4	CCT	13	37	11,52	$0,7 \times 10^{-3}$
3/4/5	ACC	32,92	10	12,24	$0,5 \times 10^{-3}$
3/4/5	CTT	12	35	11,26	$0,8 \times 10^{-3}$
4/5/6	CCA	32,88	9,99	12,23	$0,5 \times 10^{-3}$
4/5/6	TTG	12,12	30,08	7,65	0,006
5/6/7	CAA	35,88	10	14,6	$0,1 \times 10^{-3}$
6/7/8	AAG	33,95	10	13,05	$0,3 \times 10^{-3}$
Četri varianti haplotipā					
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	$0,5 \times 10^{-3}$
2/3/4/ 5	CCTT	12	34	10,52	0,001
3/4/5/ 6	ACCA	30,88	9	12,01	$0,5 \times 10^{-3}$
3/4/5/ 6	CTTG	12,03	31,04	8,38	0,004
4/5/6/ 7	CCAA	32,88	10	12,21	$0,5 \times 10^{-3}$
5/6/7/ 8	CAAG	34,94	10	13,84	$0,2 \times 10^{-3}$
Pieci varianti haplotipā					
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	$0,5 \times 10^{-3}$
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	$0,5 \times 10^{-3}$
4/5/6/ 7/ 8	CCAAG	31,94	10	11,48	$0,7 \times 10^{-3}$
Seši varianti haplotipā					
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	$0,5 \times 10^{-3}$
3/4/5/ 6/7/ 8	ACCAAG	29,94	9	11,26	$0,8 \times 10^{-3}$
Septiņi varianti haplotipā					
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	$0,8 \times 10^{-3}$
Astoņi varianti haplotipā					
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

Izvērtējot gēna *ARID5B* trešajā intronā lokalizēto alēlisko variantu nelīdzsvaroto saistību (*linkage disequilibrium* – LD) un veicot LD analīzi, tika iegūti šādi rezultāti, skatīt 4.3. attēlā.



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

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

Alēliskie varianti rs7908445 un rs7923074 atrodas pilnīgā saistībā jeb tiek pārmantoti kopā, tāpēc, lai aprēķinātu iespējamo riska haplogrupu ar hibrīdmetodi, matemātiskajos aprēķinos tiks iekļauts tikai viens no tiem. Alēlisko variantu pāri bija ar augstu korelāciju savā starpā, tikai starp alēliskie variantiem rs7896246 un rs10821938, rs7896246 un rs10994982, rs10821938 un rs10994982 bija novērojama vidēja korelācija, r^2 bija 0,71, 0,7 un 0,69, respektīvi.

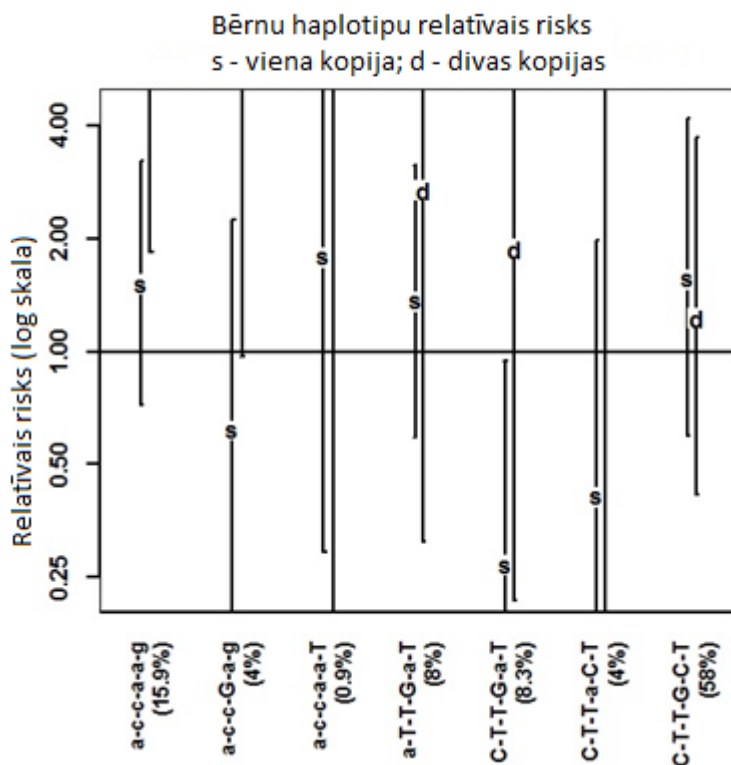
Apvienojot abus pētījuma modeļus vienā, statistiski nozīmīgi haplotipi bija tie, kur alēlisko variantu retāk sastopamā alēle bija homozigotiskā stāvoklī. Statistiski ticamie rezultāti atainoti 4.8. tabulā.

ARID5B 3. intronā lokalizēto alēlisko variantu riska haplotipi, apvienojot abus pētījuma modeļus

Viena nukleotīda alēliskie varianti	Haplotips	Relatīvais risks (95% ticamības intervāls)	p vērtība
Trīs alēliskie varianti haplotipā			
3/4/5	aacccc	3,08 (1,05 – 8,9)	0,04
3/ 4/6	aaccaa	6,04 (2,14 – 16,9)	0,8 x 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 x 10 ⁻³
5/ 6/ 7	ccaaaa	7,31 (2,64 – 19,6)	0,2 x 10 ⁻³
5/ 6/ 8	ccaagg	8,67 (2,43 – 30,2)	0,001
5/ 6/1	ccaaaa	7,71 (2,84 – 20,2)	0,2 x 10 ⁻³
6/ 7/ 8	aaaagg	7,36 (2,72 – 19,4)	0,2 x 10 ⁻³
3/ 6/ 7	aaaaaa	6,94 (2,61 – 18,6)	< 0,1 x 10 ⁻³
4/ 6/ 7	ccaaaa	7,03 (2,64 – 18,5)	< 0,1 x 10 ⁻³
5/ 6/ 7	ccaaaa	7,32 (2,68 – 20)	0,2 x 10 ⁻³
7/ 8/1	aaggaa	5,77 (2,31 – 14,5)	0,6 x 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 x 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 x 10 ⁻³
3/6/6	aaaagg	6,05 (2,17 – 16,7)	0,001
3/5/6	aaccgg	3,52 (1,23 – 10,1)	0,02
Četri alēliskie varianti haplotipā			
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	aacaaaa	6,8 (2,45 – 18,6)	0,4 x 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	cccccaagg	7,04 (1,88 – 25,5)	0,006
4/ 5/ 7/ 8	cccccaagg	4,22 (1,55 – 11,8)	0,004
4/ 5/ 8/1	cccccgaa	3,92 (1,37 – 11,1)	0,011
5/ 6/ 7/ 8	ccaaaagg	5,81 (1,95 – 16,6)	0,002
Pieci alēliskie varianti haplotipā			
3/ 4/ 5/ 6/ 7	aaccccaaaa	5,81 (2,05 -17,1)	0,6 x 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	aacaaaaagg	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 – AACCCCAAAGG RR 5,43 (95%CI 1,84 – 16,3 p vērtība = 0,002). Grafisko attēlojumu skatīt 4.4. attēlā



4.4. 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 4.9. tabulā, tabulā attēloti tikai statistiski ticamie rezultāti.

Haplotipu analīze pacientiem ar hiperdiploīdiju, salīdzinājumā ar pērējiem pacientiem

Iekļautie alēliskie varianti haplotipā	Haplotips	Biežums pacientiem ar hiperdiploīdiju	Biežums pacientiem bez hiperdiploīdijas	Hī kvadrāts	p vērtība
3 varianti haplotipā					
3/4/5	ATT	0,02	0,13	4,84	0,03
6/7/8	GAT	0,06	0,18	4,06	0,04
4 varianti haplotipā					
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
5 varianti haplotipā					
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
6 varianti haplotipā					
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
7 varianti haplotipā					
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
8 varianti haplotipā					
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

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

Katrā no augstāk minētajiem gēniem tika analizēts pa vienam alēliskam variantam katrā, kuri jau iepriekš bija aprakstīti genoma plašos asociāciju pētījumos un dati replicēti dažādās populācijās. Gēnā *CEBPE* tika analizēts alēliskais variants rs2239633, gēnā *IKZF1* – rs4132601 un gēnā *CDKN2A* – rs3731217, visi trīs analizētie alēliskie varianti atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram (rs2239633 p vērtība = 0,45; rs4132601 p = 0,61 un rs3731217 p = 0,25). Statistiski ticama saistība ar paaugstinātu akūtas limfoblastu leikozes risku nevienam no alēliskajiem variantiem šajā pētījumā netika identificēta. Rezultātu tabulas skatīt 5. pielikumā. Kā arī netika atrasta statistiski ticama saistība ar hiperdiploīdiju.

Analizējot mātes genotipa ietekmi uz leikozes attīstības risku, tika identificēts, ka, ja mātei 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 (šie alēliskie varianti iepriekš literatūrā aprakstīti un identificēti genoma plašos asociāciju pētījumos kā akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku palielinoši), tika identificētas iespējamās ALL risku palielinošo genotipu

kombinācijas: TTCCTTCCAA, RR 9,38 (95%CI 1,56 – 58,7), p vērtība = 0,014 un TTTT'TTTTAA, RR 40,8 (95%CI 2,18 – 827), p vērtība = 0,011.

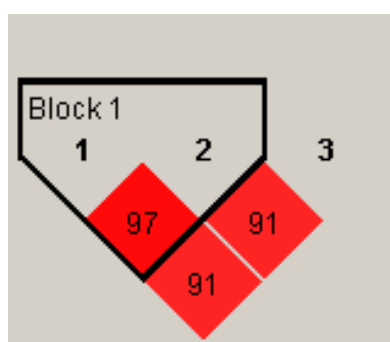
4.4. Gēnā *PAX5* lokalizētās ģenētiskās variācijas noteikšana

Veicot variācijas NM_001280547.1:c.547G>A; NP_057953.1:p.Gly183Ser analīzi septiņdesmit septiņiem pētījumā iekļautajiem indivīdiem, nevienam tā netika konstatēta.

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

Analizētajā populācijā alēliskie varianti rs10519612, rs10519613 un rs17007695 atbilst Hārdija Veinberga līdzsvaram, p vērtības bija 0,75, 0,79 un 0,89, respektīvi. Analizējot katra alēliskā variantā iespējamo saistību ar akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku, statistiski nozīmīgi rezultāti netika atrasti.

Pirms haplotipu analīzes tika noteikta nelīdzsvarotā saistība (LD) starp analizētajiem alēliskajiem variantiem. Kā redzams 4.5. attēlā, starp alēliskajiem variantiem rs10519612 un rs10519613 ir gandrīz pilna nelīdzsvarota saistība, jo $r^2 = 0,97$.



4.5. att. Nelīdzsvarotās saistības analīze starp analizētajiem alēliskajiem variantiem, kas lokalizēti gēnā *IL15*

Alēliskie varianti attēloti šādā secībā: 1- rs10519612, 2 – rs10519613, 3 – rs17007695

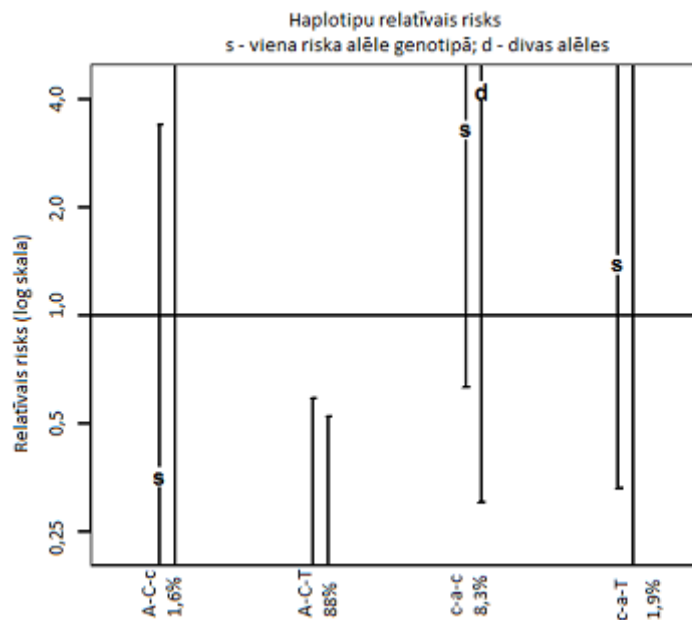
Haplotipu analīzes veikšanai tika apvienoti gadījuma – kontroles un ģimeņu pētījuma modeļi. Ar ALL attīstības risku statistiski ticami saistītie haplotipi attēloti 4.10. tabulā.

4.10. tabula

Gēnā *IL15* lokalizēto alēlisko variantu haplotipu analīze

Haplotipā iekļautie alēliskie varianti	Haplotips	RR 95% CI	P vērtība	Iespējamā nozīme
rs10519613/rs17007695	AC	5,28 (1,06 – 26)	0,04	potenciāli riska haplotips
rs10519613/rs17007695	CT	0,21 (0,06 – 0,8)	0,02	potenciāli protektīvs haplotips
rs10519613/rs17007695	CCTT	0,22 (0,06 – 0,88)	0,03	potenciāli protektīvs haplotips
rs10519612/rs17007695	AT	0,17 (0,05 – 0,65)	0,009	potenciāli protektīvs haplotips
rs10519612/rs17007695	AATT	0,17 (0,04 – 0,65)	0,009	potenciāli protektīvs haplotips

Haplotipu analīzē apvienojot visus trīs analizētos alēliskos variantus rs10519612/rs105196123/rs17007695, tika identificēti potenciālie protektīvi haplotipi: haplotips ACT, RR 0,15 (95% CI 0,04 – 0,58), p vērtība = 0,006 un haplotips AATTCC homozigotiskā stāvoklī, RR 0,13 (95%CI 0,03 – 0,52), p vērtība = 0,005. Haplotipu analīzes grafisko attēlojumu skatīt 4.6. attēlā.



4.6. att. Gēnā *IL 15* analizēto alēlisko variantu haplogrupu grafiskais attēlojums

Alēliskie varianti attēloti šādā secībā: 1 – rs10519612, 2 – rs10519613, 3 – rs17007695

4.6. Alēlisko variantu analīzes rezultāti, kas lokalizēti gēnos, kuri saistīti ar ksenobiotiķu metabolismu

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

Alēliskie varianti rs1045642 ($p = 0,84$) un rs2032582 ($p = 0,46$) atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram. Analizējot 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 līdz desmit gadu vecumam, ka saistās ar labāku prognozi (RR 0,13; 95%CI 0,02 – 0,18; p vērtība = 0,03).

Nevienam indivīdam, kuri tika iekļauti pētījumā, rs2032582 A alēle netika identificēta homozigotiskā formā. 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 haplotipu, rs2032582 protektīva nozīme bija T alēlei homozigotiskā stāvoklī, RR 0,05; 95%CI 0,003 – 0,77; $p = 0,03$.

Statistiski ticami saistība starp alēliskā variantā rs1045642 genotipu un akūtu ALL attīstības risku probandiem netika atrasta. Bet, analizējot mātes genotipu, 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.

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

Abi analizētie alēliskie varianti atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram; rs1801133 p vērtība = 0,81, rs1801131 p vērtība = 0,3.

Analizējot gēnā *MTHFR* lokalizētos alēliskos variantus, ne gadījuma – kontroles, ne ģimeņu pētījumā statistiski ticami rezultāti netika iegūti, gan analizējot variantus atsevišķi, gan analizējot iespējamajos haplotipus, p vērtība $> 0,05$. Kā arī alēliskie varianti nebija statistiski ticami saistīti ar augstāka riska leikozes attīstības risku, visos aprēķinos p vērtība $> 0,05$.

Mātes haplotipam rs1801131/rs1801133 AACC ir protektīva loma bērna leikozes attīstībā, RR 0,13 95%CI (0,03-0,6) p vērtība = $0,9 \times 10^{-3}$.

4.6.3. Gēnā *NQO1* lokalizētā alēliska variantā rs1800566 analīze

Analizētais alēliskais variants rs1800566 atbilda Hārdija Veinberga līdzsvaram, $p = 0,86$.

Gēnā *NQO1* lokalizētais alēliskais variants rs1800566 nebija statistiski ticami saistīts ar leikozes attīstības risku, analizējot atsevišķi gadījuma – kontroles un ģimeņu pētījuma modeli, kā arī veicot analīzi ar hibrīdmetodi. Alēliskais variants nebija statistiski ticami saistīts ar augsta riska leikozes attīstību.

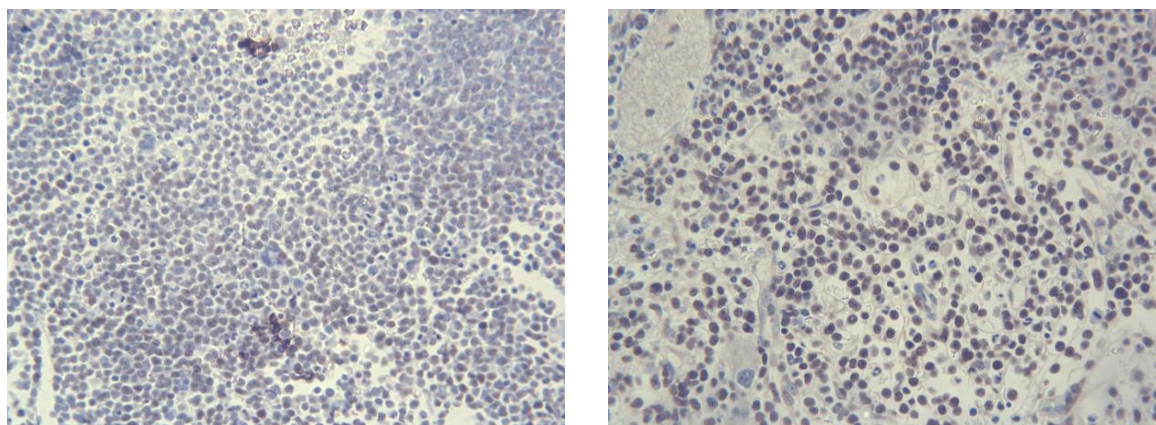
4.6.4. Delēcijas gēnos *GSTT1* un *GSTM1*

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 $> 0,05$. Ņemot vērā, ka ar izmantoto metodi nav iespējams diferencēt delēciju heterozigotiskā formā, ģimeņu pētījuma modeli analīze netika izmantota, jo tā balstīta uz heterozigotiskiem indivīdiem.

4.7. IKZF1 gēna secības un Ikaros proteīna ekspresijas analīze

Analizējot Ikaros proteīna ekspresijas līmeni kaulu smadzeņu biopsijas preparātos, imūnhistoķīmiskai analīzei bija pieejami sešdesmit astoņi paraugi. Šūnās, kurās proteīns ekspresējas, bija vērojams brūns kodola krāsojums, bet Ikaros negatīvās šūnās kodola krāsojums bija zils. Kaulu smadzeņu biopsijas paraugu analīzes piemēru skatīt 4.7.attēlā.

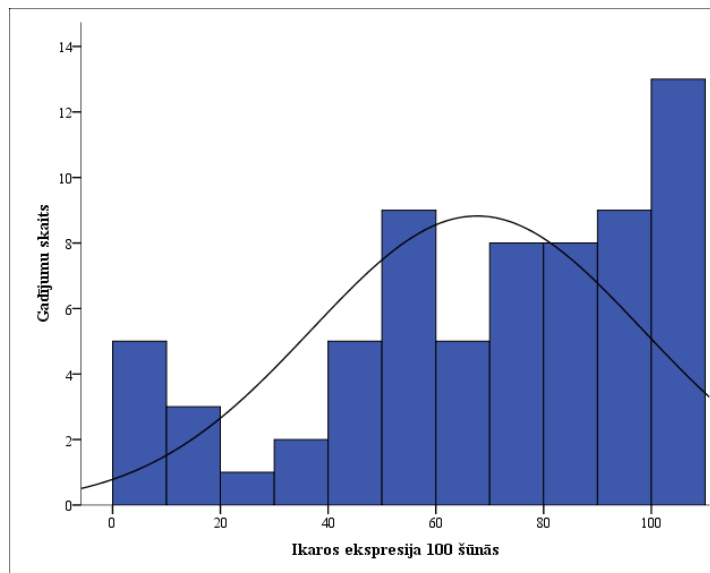


4.7. att. Ikaros proteīna ekspresijas analīzes piemērs kaulu smadzenēs

Gaismas mikroskopas 40 x palielinājums

Četriem no sešdesmit astoņiem paraugiem (5,88%) proteīns neekspresējās jeb ekspresijas līmenis bija nulle. Proteīna ekspresija, kas mazāka par piecdesmit procentiem (intervālā no nulles līdz četrdesmit deviņiem procentiem), bija vērojama piecpadsmit indivīdiem, jeb 22% procentiem. Vidējais proteīna ekspresijas līmenis šūnās bija 67,65% (standarta deviācija 30,7). Ekspresijas līmeņa sadalījumu skatīt 4.8. attēlā.

Analizējot Ikaros ekspresijas līmeni atkarībā no probanda vecuma, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības.



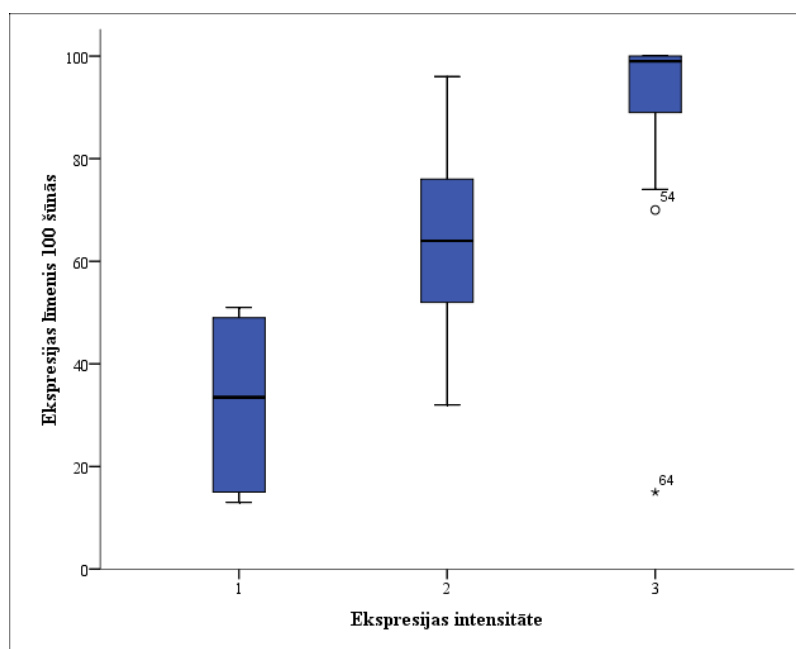
4.8. att. Ikaros proteīna līmeņa ekspresija kaula smadzeņu šūnās

Savstarpēji izvērtējot proteīna ekspresijas līmeni kaulu smadzeņu šūnās un akūtas leikozes recidīva vai *exitus letalis* risku pētījumā iekļautajiem pacientiem, netika atrasta statistiski ticama saistība, tomēr, jāatzīmē, ka daļa pacientu pētījumā tika iekļauti retrospektīvi. Respektīvi, asins paraugi tika atlasīti, sākot ar 2009. gadu, līdz ar to daļa pacientu, kam akūta limfoblastu leikoze bija diagnosticēta laika posmā no 2005. gada līdz 2009. gadam, bija miruši, tādēļ, ētisku apsvērumu dēļ, viņu kaulu smadzeņu paraugi netika analizēti, jo viņi vispār netika iekļauti pētījumā.

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 4.9. attēlā.



4.9. 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.

Salīdzinot Ikaros proteīna ekspresijas līmeni kaulu smadzenēs un alēliskā varianta rs4132601 genotipus pacientiem ar ALL, netika atrasta statistiski ticama atšķirība.

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 divsimti 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, ģenētiskās variācijas eksonos netika identificētas. Analizējot tuvāk esošos introna nukleotīdus, tika identificēti astoņi dažādi alēliskie varianti, kuru pamatā ir viena nukleotīda punktveida nomaiņa: 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), kas secības izmaiņas nozīmīgumā un interpretēšanā izmanto vairākus algoritmus, lai noteiktu, kurā tieši procesa ceļa daļā alēliskajam variantam varētu būt nozīme. 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: 1) intronu identitātes elementi, 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 – jauns donoru saits (Desmet et al., 2009; Eng et al., 2004).

Analizējot rs199614380 un rs7789106, retāk sastopamās alēles biežums bija mazāks par pieciem procentiem, un, saskaņā ar literatūras datiem, reti sastopamiem gēna alēliskajiem variantiem statistiskais spēks (nozīmīgums) nav pietiekams, īpaši ja paraugu skaits ir ierobežots (Gorlov et al., 2008). Tāpēc ņemot vērā, ka alēliskajiem variantiem, kuriem potenciāli varētu būt loma splaisinga ietekmēšanā, sastopamības biežums pētījuma grupā bija mazāks par pieciem procentiem, to analīze kontroles grupā un līdz ar to iespējamā klīniskā nozīmība netika izvērtēta.

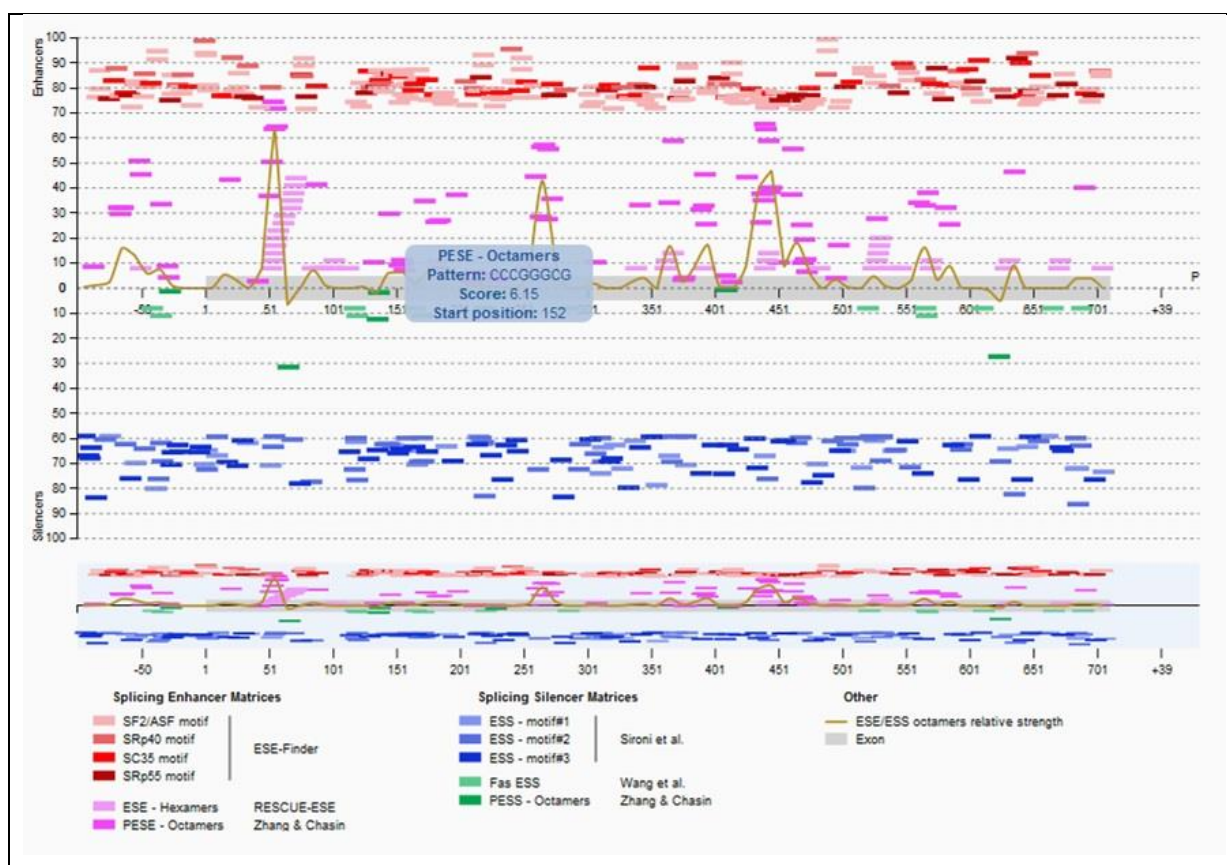
Timīna insercija deviņdesmit trīs nukleotīdus pirms sestā eksona sākuma datu bāzē *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) atrodama ar references numuru rs72334180, kurai nav zināms sastopamības biežums. Starptautiskajā brīvpieejas datu bāzē informācija par gēna alēlisko variantu ar references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

Pētījuma grupā šī insercija konstatēta 24,68% jeb 19 indivīdiem no 77. Ņemot vērā, ka saskaņā ar tiešsaistē piejamo potenciālo splaisa saita identificētāju programmas *Human Splicing finder* (Desmet et al., 2009) *consensus* varbūtība, ka šajā vietā iespējams procesēšanas saita zarošanās (*branch*) punkts ir 52,82%, insercijas biežums tika pārbaudīts kontroles grupā, kur tā 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 (sešiem indivīdiem homozigotiskā stāvoklī, deviņpadsmit indivīdiem heterozigotiskā stāvoklī), 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 (diviem indivīdiem homozigotiskā stāvoklī un trīspadsmit indivīdiem heterozigotiskā stāvoklī), sastopamības biežums – 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 (HX 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. Splaisa saita grafiskā analīze attēlota 4.10. attēlā.

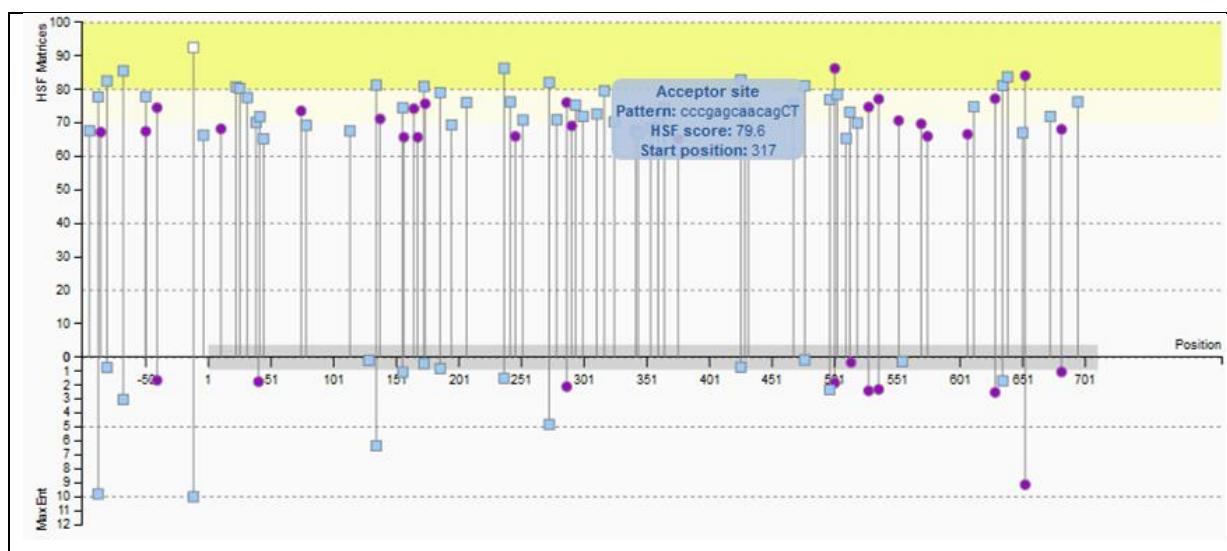


4.10. att. ESE saitu analīze atkarībā no DNS secību izmaiņām

Sinonīmajam variantam rs61731355 nebija statistiski ticamas saistības ne ar proteīna ekspresijas līmeni kaulu smadzenēs, ne ar slimības recidīvu un mirstību.

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%), visos gadījumos – heterozigotiskā formā. Kontroles grupā, kurā tika analizēti septiņdesmit septiņi pēc vecuma un dzimuma atbilstoši indivīdi, variants identificēts deviņās alēlēs (vienam indivīdam homozigotiskā formā, septiņiem indivīdiem heterozigotiskā formā). T alēles sastopamības biežums pētījuma un kontroles grupā nebija statistiski ticami atšķirīgs, p vērtība $> 0,05$.

Analizējot sinonīmā varianta iespējamo ietekmi uz procesēšanu, tika konstatēts, ka, ja citozīns tiek nomainīts ar timīnu, izmainās potenciālais akceptora saits – CCGGAGCAACAGCT ar CV 79,6 uz ccgagcaatagCT ar CV 71,92 Δ CV 9,65%, ja jaunais akceptoru saits ir aktīvs, tādā gadījumā eksonā var iztrūkt 328 nukleotīdi. Splaisa saita analīzes grafisko attēlu skatīt 4.11. attēlā.



4.11. att. Iespējamā gēna alēliskā varianta rs61731356 ietekme uz akceptora saitu

Ņemot vērā Ikaros proteīna lielo nozīmi limfocītu diferenciācijā, gēna *IKZF1* eksonu delēciju analīze tika veikta vienam pacientam – vienīgajam pētījumā iekļautajam pacientam, kuram akūta B limfoblastu priekšteču šūnu leikozē attīstījās pirms viena gada vecuma sasniegšanas. Veicot eksonu delēciju diagnostiku ar MLPA metodi, delēcijas eksonos netika konstatētas.

5. 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 genoma plašos asociāciju pētījumos, 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 arī analizēta 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.

5.1. 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. Genoma plašos asociāciju pētījumos 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 ģenētiskais variants (*Trevino et al.*, 2009). Vēlāk rezultāti replicēti dažādās populācijās tajā skaitā arī mūsu pētījumā Latvijas bērnu populācijā. Kopumā šajā pētījumā pierādīta akūtas limfoblastu leikozes attīstības risks 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 variantā ietekme.

Visplašāk ir analizēti gēna alēliskie varianti rs10821936, rs10994982 un rs7089424, kas identificēti genoma plašos asociāciju pētījumos (*Papaemmanuil et al.*, 2009; *Trevino et al.*, 2009). Literatūrā atrodami arī dati par variantu 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 variantu rs10821937 un rs7908445 saistība ar akūtas leikozes attīstības risku.

Šajā pētījumā papildus astoņiem gēna alēliskajiem variantiem, kuri lokalizēti “karstajā punktā” analizēti divi alēliskie varianti, kuru retāk sastopamās alēles biežums < 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 variantā retāk sastopamā alēle ir G, kuru sastop 3% gadījumu (*Abecasis et al.*, 2012). Jādoma šī ir kā pētījuma blakus atradne, kas liecina, ka būtu interesanti, ja Latvijas iedzīvotāju ģenētiskā informācija tika 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. Dīvos pētījumos tika konstatēts, ka gēna alēliskā variantā 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 visticamākais 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 leikozes attīstības risku, tas ir pēc desmit gadu vecuma, bet statistiski ticama saistība netika atrasta.

Literatūrā apraksta variantā 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 leukemoidās šūnās, analizē 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 lielāka 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 simtu 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.

5.2. 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 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 variantā relatīvi vājā ietekme uz ALL attīstības risku kā arī ģeogrāfiskās atšķirības. Ģeogrāfiski vistuvākā populācija, kura tika analizēta šī alēliskā variantā 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 trīsdesmit deviņdesmit astoņu pacientu genotipus, tomēr arī viņu pētījumā ALL risks nebija statistiski ticams ar variantu rs2239633 (*Pan et al.*, 2014; *Pastorczyk et al.*, 2011).

Interesanti rezultāti tika iegūti analizējot gēnā *IKZF1* lokalizēto alēlisko variantu rs4132601, lai G alēles, kura ir riska alēle biežums ir 29,4%, kas ir saskaņā ar literatūras datiem, balstoties uz 1000 genomu projekta pirmajā fāzē iegūtajiem datiem Eiropas populācijā MAF = 31% (*Abecasis et al.*, 2012). Tomēr, lai gan genoma plašos asociāciju pētījumos 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, kur iekļauto pacientu skaits bija septiņdesmit deviņi, statistiski ticama saistība netika atrasta (*CY Lin et al.*, 2014). Ar vislielāko varbūtību jādomā, ka mazā pētījuma grupa ir iemesls rezultātu nesakrītībai. Tomēr pastāv neliela varbūtība, ka arī šī alēliskā variantā saistībā ar ALL vērojama etniskā atšķirība.

Mūsu pētījumā identificēta alēliskā variantā 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 variantā 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 variantā rs3731217 saistībai ar akūtas leikozes 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 šos datus saistību ar ALL risku neizdevās pierādīt (*Pastorcak 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.

5.3. 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 akūtu limfoblastu leikozi ir atrasta mutācija p.Gly183Ser gēnā *PAX5*, kura pārmantojas autosomāli domināti ar nepilnīgu penetranci, lai attīstītos akūta leikoze nepieciešams heterozigotitātes zudums. Pārsvārā šiem indivīdiem 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, citoģenētikas izmeklējumi nebija tik detalizēti un, galvenokārt, tika noteikta Filadelfijas hromosomas klātbūtne. Pacientiem, kuriem veikta detalizēti citoģenētiski izmeklējumi tikai vienam pacientam konstatēta devītās hromosomas īsā pleca delēcija, bet diemžēl šī pacienta vecāki atteicās piedalīties pētījumā.

Neskatoties uz to un ņemot vērā gēna izpausmes nepilnīgo penetranci, tikai pieņemts pārbaudīt p.Gly183Ser klātbūtni visiem probandiem. Jo pacientu vecāku un pētnieku galvenā interese ir vērsta tieši uz iespējamo monogēno ALL pārmantošanas risu, 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 un 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 sibiem.

5.4. 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, viens no jaunākajiem publicētajiem pētījumiem ir veikts Ēģiptē, kur analizējot šīs ģenētiskās variācijas, tika pierādīta statistiski ticama saistība ar visiem trim alēliskajiem variantiem, bet B šūnu leikozē tieši ar gēna alēlisko variantu rs17007695 genotipiem CT un CC (Aly *et al.*, 2015).

Bērnu populācijā *IL15* ir pētīts saistībā ar MRD, kurā identificēta saistība ar alēlisko variantu rs10519612, rs10519613 un rs17007695 genotipu un minimālo reziduālo slimību. 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 ģenētiskajām variācijām, 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.

5.5. Alēliskie varianti gēnos, kas iesaistīti ksenobiotiķu metabolismā

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

Neskatoties uz genoma plašajos pētījumos 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 ģenētiskās variācijas 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 eropeīdās rases pārstāvjiem (Yue *et al.*, 2015). Šie rezultāti,

savukārt, varētu būt saistība ar alēļu sastopamības biežumu 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 akūtas limfoblastu leikozes 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 variantam 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, ka 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 ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto proteīnu aktivitātei var ietekmēt leikozes attīstības pirmos posmus jau intrauterīni.

5.5.2. 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 leikozī 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 variantā 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, kurā ir 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.

5.5.3. Gēnu *GSTT1* un *GSTM1* delēcijas

Šajā pētījumā netika atrasta statistiski ticama saistība ar akūtas limfoblastu leikozes attīstības risku un delēcijām glutathiona 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, jādedomā, ka tas varēja ietekmēt kopējos rezultātus attiecībā uz *GSTT1* un *GSTM1* delēciju nozīmi ALL attīstībā.

Analizējot literatūras datus meta-analīzes pētījumi attiecībā uz abiem šiem gēniem norāda uz etniskām atšķirībām, ka delēcijas kā nozīmīgākas vērtējamas aziātu starpā nekā baltās rases pārstāvju vidū (*Moulik et al.*, 2014; *ZH Tang et al.*, 2014; *LY Xu & Cao*, 2014).

5.5.4. Gēnā *NQO1* lokalizētais alēliskais variants rs1800566

Interesanti ir rezultāti analizējot alēlisko variantu rs1800566, kurš lokalizēts gēnā *NQO1*, šis ir ne-sinonīms variants, kad TT genotipa gadījumā aminoskābe prolīns tiek nomainīta ar serīnu un saskaņā ar literatūras datiem 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 – Itālija un Lielbritānija, 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.

5.6. Gēna *IKZF1* secība un proteīna ekspresijas līmenis

Ikaros proteīnam ir viena no galvenajām lomām leukocītu diferenciācijā, praktiski visos leukocītu 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 nomaiņa, kas rezultējās aminoskābes nomaiņā, 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* mutāciju gēna secības izmaiņu 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 tika agrīna un smaga, ka bērni mirst līdz leikozes attīstīšanās brīdim vai arī pārmantotas *IKZF1* mutācijas varētu būt bērniem, kuriem

leikoze attīstā 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 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.

6. 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, leikocītu 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, patogēnas mutācijas nav atrastas, 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.

7. PUBLIKĀCIJAS

7.1. Publikācijas starptautiska mēroga recenzējamās izdevumos

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

7.2. Publikācija vietēja mēroga recenzējamās izdevumos

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

7.3. Ziņojumi kongresos un konferencēs

Cebura E., **Kreile M.**, Piekuse L., Rots D., Grūtupa M., kovalova Z. Polymorphisms in gene ARID5B and risk of childhood ALL in Latvia. 9th Baltic conference of Hematology, Abstract book pp 40-41.

Kreile M., Piekuse L., Rots D., Zarina A., Cebura E., Kovalova Z. Germline variants of ARID5B as possible risk factors for childhood acute lymphoblastic leukemia in Latvia. *European Journal of Human Genetics*, 2014, 22 (suppl.1): 503

Kreile M, Piekuse L, Zarina A, Kovalova Z, Medne G, Cebura E. Association between SNP rs 4132601 in gene IKZF1 region and childhood acute lymphoblastic leukemia *European J Hum Gen*, 2013, 21 Supp2. 1: p536

Kreile M, Piekuse L, Lace B, Kovalova Z, Medne G, Cebura E, Grūtupa M, Krumina A, SNP rs4132601 as a possible risk allele of acute lymphoblastic leukaemia development in children ESHG 2012 Nurnberg, Germany, *European Journal of Human Genetics*, vol. 20., Suppl.1., 2012, pp.157-158

Kreile M., Piekuse L., Rots D., Zariņa A., Cebura E, Višņevska- Preciniece Z., Kovaļova Ž. Viena nukleotīda polimorfismu, kas lokalizēti genos IKZF1, ARID5B, MDR1 un CEBPE saistība ar akūtu limfoblastu leikozi bērnu vecumā. RSU Zinātniskā konference, Tēzes, Rīga, 2014, lpp. 248

Grasmane A., **Kreile M.** Rots D. he association of the ARID5B gene single nucleotide polymorphism rs10821938 with the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. 25th European student's conference abstract book p. 230

Rots D., **Kreile M.** Association of single nucleotide polymorphism s7073873 with the childhood acute lymphoblastic leukemia. 25th European student's conference abstract book p. 241

8. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību sava promocijas darba vadītājai Dr. med. *Baibai Lācei* par atbalstu promocijas darba tapšanā.

Pateicos profesorei *Astrīdai Krūmiņai* par to, ka bija mana pirmā ģenētikas skolotāja.

Liels paldies profesorei *Dacei Gardovskai*, profesorei *Jutai Kroičai* un profesoram *Edvīnam Miklaševičam*, ka nenogurstoši atbalsta manas profesionālās gaitas, vienmēr ir atsaucīgi un nekad neliedz padomu.

Īpašs paldies dakterei *Darjai Isajevai* un laborantei *Jeļenai Fjodorovai* par palīdzību imūnhistoķīmisko analīžu veikšanā.

Liels paldies Molekulārās ģenētikas laboratorijas vadītājai un draudzenei Dr. med. *Lindai Piekusei* par visa veida palīdzību mana promocijas darba tapšanā. Pateicos arī pārējam laboratorijas kolektīvam par atbalstu.

Paldies onkohematoloģijas nodaļas pacientiem un viņu vecākiem, ārstiem un māsiņām, bez viņu palīdzības šis darbs nebūtu iespējams.

Vislielākais paldies ģimenei par viņu mīlestību un pacietību.

9. 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. 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.
4. Alves S., Amorim A., Ferreira F., et al. The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal // *Leukemia*, 2002; 16: 1565-7.
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. Antas V. I., Al-Drees M. A., Prudence A. J., et al. Hemogenic endothelium: a vessel for blood production // *Int J Biochem Cell Biol*, 2013; 45: 692-5.
7. Arceci R., Hann I. M., Smith O. P. *Pediatric hematology* // 3rd ed. Published: Blackwell Pub., 2006.
8. Asai D., Imamura T., Suenobu S., et al. IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan // *Cancer Med*, 2013; 2: 412-9.
9. Barneda-Zahonero B., Roman-Gonzalez L., Collazo O., et al. Epigenetic regulation of B lymphocyte differentiation, transdifferentiation, and reprogramming // *Comp Funct Genomics*, 2012; 2012: 564381.
10. Belson M., Kingsley B., Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review // *Environ Health Perspect*, 2007; 115: 138-45.
11. Bernt K. M., Hunger S. P. Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia // *Front Oncol*, 2014; 4: 54.
12. Bhojwani D., Howard S. C., Pui C. H. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia // *Clin Lymphoma Myeloma*, 2009; 9 Suppl 3: S222-30.
13. Brown K. E., Guest S. S., Smale S. T., et al. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin // *Cell*, 1997; 91: 845-54.
14. Buitenkamp T. D., Izraeli S., Zimmermann M., et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group // *Blood*, 2014; 123: 70-7.
15. Burger B., Zimmermann M., Mann G., et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture // *J Clin Oncol*, 2003; 21: 184-8.
16. Cadieux B., Ching T. T., VandenBerg S. R., Costello J. F. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation // *Cancer Res*, 2006; 66: 8469-76.
17. Capece D., Zazzeroni F., Mancarelli M. M., et al. A novel, non-canonical splice variant of the Ikaros gene is aberrantly expressed in B-cell lymphoproliferative disorders // *PLoS One*, 2013; 8: e68080.
18. Cario G., Zimmermann M., Romey R., et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol // *Blood*, 2010; 115: 5393-7.
19. Celkan T., Karaman S., Ozkan A., et al. Outcome after Relapse in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia - Results of a Single Center for a Period of 15 Years // *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2005; 106: 4582-.
20. Chauhan P. S., Ihsan R., Mishra A. K., et al. High order interactions of xenobiotic metabolizing genes and P53 codon 72 polymorphisms in acute leukemia // *Environ Mol Mutagen*, 2012; 53: 619-30.

21. 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.
22. Cortes J. E., Kantarjian H. M. Acute lymphoblastic leukemia. A comprehensive review with emphasis on biology and therapy // *Cancer*, 1995; 76: 2393-417.
23. Dai Y. E., Tang L., Healy J., Sinnett D. Contribution of Polymorphisms in IKZF1 Gene to Childhood Acute Leukemia: A Meta-Analysis of 33 Case-Control Studies // *PLoS One*, 2014; 9: e113748.
24. Dastugue N., Suci S., Plat G., et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results // *Blood*, 2013; 121: 2415-23.
25. Davis A. S., Viera A. J., Mead M. D. Leukemia: an overview for primary care // *Am Fam Physician*, 2014; 89: 731-8.
26. Davis K. L. Ikaros: master of hematopoiesis, agent of leukemia // *Ther Adv Hematol*, 2011; 2: 359-68.
27. De G., Yip W. K., Ionita-Laza I., Laird N. Rare variant analysis for family-based design // *PLoS One*, 2013; 8: e48495.
28. Deng J., Xue Y., Wang Y., et al. 10p12.31-12.2 variants and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population // *Leuk Lymphoma*, 2015; 56: 175-8.
29. 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.
30. Du X. L., Chen Q. Recent advancements of bortezomib in acute lymphocytic leukemia treatment // *Acta Haematol*, 2013; 129: 207-14.
31. 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.
32. 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.
33. El Ansary M. M., Mohammed L. A., Hassan T. H., et al. Human leukocyte antigen-DRB1 polymorphism in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Mol Clin Oncol*, 2015; 3: 425-29.
34. Enciso-Mora V., Hosking F. J., Sheridan E., et al. Common genetic variation contributes significantly to the risk of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*, 2012; 26: 2212-5.
35. 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.
36. 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.
37. Fehniger T. A., Caligiuri M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease // *Blood*, 2001; 97: 14-32.
38. Felice M. S., Gallego M. S., Alonso C. N., et al. Prognostic impact of t(1;19)/TCF3-PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Munster-based protocols // *Leuk Lymphoma*, 2011; 52: 1215-21.
39. 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.
40. 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.
41. Ford C. E. The chromosomes of normal human somatic and leukaemic cells // *Proc R Soc Med*, 1960; 53: 491-3.
42. Francis O. L., Payne J. L., Su R. J., Payne K. J. Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros // *World J Biol Chem*, 2011; 2: 119-25.
43. Ganesan P., Thulker S., Gupta R., Bakhshi S. Childhood aleukemic leukemia with hypercalcemia and bone lesions mimicking metabolic bone disease // *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2009; 22: 463-7.
44. Georgopoulos K. Acute lymphoblastic leukemia--on the wings of IKAROS // *N Engl J Med*, 2009; 360: 524-6.

45. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros // *Nat Rev Immunol*, 2002; 2: 162-74.
46. 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.
47. 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.
48. Goncalves M., Terreri M. T., Barbosa C. M., et al. Diagnosis of malignancies in children with musculoskeletal complaints // *Sao Paulo Med J*, 2005; 123: 21-3.
49. Goraya J. S., Virdi V. S., Marwaha N., et al. Acute lymphoblastic leukemia presenting as cyclic neutropenia // *Pediatr Hematol Oncol*, 2002; 19: 279-82.
50. 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.
51. 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.
52. 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;
53. Greaves M. Childhood leukaemia // *BMJ*, 2002; 324: 283-7.
54. Greaves M. F., Maia A. T., Wiemels J. L., Ford A. M. Leukemia in twins: lessons in natural history // *Blood*, 2003; 102: 2321-33.
55. Guo L. M., Xi J. S., Ma Y., et al. ARID5B gene rs10821936 polymorphism is associated with childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis based on 39,116 subjects // *Tumour Biol*, 2014; 35: 709-13.
56. 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.
57. Harrison C. J., Haas O., Harbott J., et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group // *Br J Haematol*, 2010; 151: 132-42.
58. Harrison C. J., Moorman A. V., Broadfield Z. J., et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia // *Br J Haematol*, 2004; 125: 552-9.
59. Harrison C. J., Moorman A. V., Schwab C., et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome // *Leukemia*, 2014; 28: 1015-21.
60. Healy J., Belanger H., Beaulieu P., et al. Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia // *Blood*, 2007; 109: 683-92.
61. 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.
62. 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.
63. Holmes M. L., Pridans C., Nutt S. L. The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5 // *Immunol Cell Biol*, 2008; 86: 47-53.
64. 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.
65. Inaba H., Greaves M., Mullighan C. G. Acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet*, 2013; 381: 1943-55.
66. 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.
67. Jabbour E. J., Faderl S., Kantarjian H. M. Adult acute lymphoblastic leukemia // *Mayo Clin Proc*, 2005; 80: 1517-27.
68. 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.

69. Jeha S., Pei D., Raimondi S. C., et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1 // *Leukemia*, 2009; 23: 1406-9.
70. Jia M., Wang Z. J., Li J. Y., et al. The impact of IKZF1 deletion on the prognosis of acute lymphoblastic leukemia: an updated meta-analysis // *Cancer Biomark*, 2014; 14: 493-503.
71. 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.
72. John L. B., Ward A. C. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity // *Mol Immunol*, 2011; 48: 1272-8.
73. John L. B., Yoong S., Ward A. C. Evolution of the Ikaros gene family: implications for the origins of adaptive immunity // *J Immunol*, 2009; 182: 4792-9.
74. John S. W., Weitzner G., Rozen R., Sriver C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes // *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 408.
75. 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.
76. Kadan-Lottick N. S., Ness K. K., Bhatia S., Gurney J. G. Survival variability by race and ethnicity in childhood acute lymphoblastic leukemia // *JAMA*, 2003; 290: 2008-14.
77. Kager L., Lion T., Attarbaschi A., et al. Incidence and outcome of TCF3-PBX1-positive acute lymphoblastic leukemia in Austrian children // *Haematologica*, 2007; 92: 1561-4.
78. Kalia V., Sarkar S., Gourley T. S., et al. Differentiation of memory B and T cells // *Curr Opin Immunol*, 2006; 18: 255-64.
79. Kantner H. P., Warsch W., Delogu A., et al. ETV6/RUNX1 induces reactive oxygen species and drives the accumulation of DNA damage in B cells // *Neoplasia*, 2013; 15: 1292-300.
80. 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.
81. Kimchi-Sarfaty C., Oh J. M., Kim I. W., et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity // *Science*, 2007; 315: 525-8.
82. Kliegman R., Nelson W. E. Nelson textbook of pediatrics // 18th ed. Published: Saunders, 2007. -
83. Knezevic K., Bee T., Wilson N. K., et al. A Runx1-Smad6 rheostat controls Runx1 activity during embryonic hematopoiesis // *Mol Cell Biol*, 2011; 31: 2817-26.
84. Koffeman E. C., Wulffraat N. M., Bruin M., et al. Periodic fever as a presenting sign of childhood acute lymphoblastic leukaemia // *Rheumatology (Oxford)*, 2005; 44: 1583-4.
85. Koipally J., Georgopoulos K. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity // *J Biol Chem*, 2000; 275: 19594-602.
86. 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.
87. Kong S. G., Seo J. H., Jun S. E., et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis at presentation // *Blood Res*, 2014; 49: 29-35.
88. Kulkarni K. P., Marwaha R. K., Trehan A., Bansal D. Testicular relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: the challenges and lessons // *Indian J Cancer*, 2010; 47: 134-8.
89. Kwon K., Hutter C., Sun Q., et al. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development // *Immunity*, 2008; 28: 751-62.
90. Lahoud M. H., Risteovski S., Venter D. J., et al. Gene targeting of Desrt, a novel ARID class DNA-binding protein, causes growth retardation and abnormal development of reproductive organs // *Genome Res*, 2001; 11: 1327-34.
91. Lanzkowsky P. Manual of pediatric hematology and oncology // 2nd ed. Published: Churchill Livingstone, 1995. -
92. 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.
93. Lausten-Thomsen U., Madsen H. O., Vestergaard T. R., et al. Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates // *Blood*, 2011; 117: 186-9.
94. Lauten M., Moricke A., Beier R., et al. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia // *Haematologica*, 2012; 97: 1048-56.

95. 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.
96. 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.
97. LeBien T. W., Tedder T. F. B lymphocytes: how they develop and function // *Blood*, 2008; 112: 1570-80.
98. 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.
99. 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.
100. Li Z., Perez-Casellas L. A., Savic A., et al. Ikaros isoforms: The saga continues // *World J Biol Chem*, 2011; 2: 140-5.
101. Li Z., Song C., Ouyang H., et al. Cell cycle-specific function of Ikaros in human leukemia // *Pediatr Blood Cancer*, 2012; 59: 69-76.
102. Lightfoot T. J., Johnston W. T., Painter D., et al. Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia // *Blood*, 2010; 115: 3923-9.
103. Lim W. F., Inoue-Yokoo T., Tan K. S., et al. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res Ther*, 2013; 4: 71.
104. 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.
105. Lin D., Liu C., Xue M., et al. The role of interleukin-15 polymorphisms in adult acute lymphoblastic leukemia // *PLoS One*, 2010; 5: e13626.
106. Liu D., Liu Y., Ran L., et al. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and prostate cancer risk in Asians: a systematic review and meta-analysis // *Tumour Biol*, 2013; 34: 2539-44.
107. 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.
108. 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.
109. Lopes B. A., Emerenciano M., Goncalves B. A., et al. Polymorphisms in CYP1B1, CYP3A5, GSTT1, and SULT1A1 Are Associated with Early Age Acute Leukemia // *PLoS One*, 2015; 10: e0127308.
110. 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.
111. Ma S. K., Chan G. C., Ha S. Y., et al. Clinical presentation, hematologic features and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia: a review of 73 cases in Hong Kong // *Hematol Oncol*, 1997; 15: 141-9.
112. Mann G., Cazzaniga G., van der Velden V. H., et al. Acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) in children 1 year and older: The 'big sister' of the infant disease? // *Leukemia*, 2007; 21: 642-6.
113. Mansson R., Welinder E., Ahsberg J., et al. Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109: 21028-33.
114. Martineau M., Jalali G. R., Barber K. E., et al. ETV6/RUNX1 fusion at diagnosis and relapse: some prognostic indications // *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 43: 54-71.
115. Martinelli G., Iacobucci I., Storlazzi C. T., et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report // *J Clin Oncol*, 2009; 27: 5202-7.

116. 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.
117. 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.
118. Merckenschlager M. Ikaros in immune receptor signaling, lymphocyte differentiation, and function // *FEBS Lett*, 2010; 584: 4910-4.
119. Migliorini G., Fiege B., Hosking F. J., et al. Variation at 10p12.2 and 10p14 influences risk of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia and phenotype // *Blood*, 2013; 122: 3298-307.
120. 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.
121. 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.
122. Molnar A., Wu P., Largespada D. A., et al. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse // *J Immunol*, 1996; 156: 585-92.
123. Moorman A. V., Richards S. M., Robinson H. M., et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) // *Blood*, 2007; 109: 2327-30.
124. Morak M., Meyer C., Marschalek R., et al. Clone-specific secondary aberrations are not detected in neonatal blood spots of children with ETV6-RUNX1-positive leukemia // *Haematologica*, 2013; 98: e108-10.
125. Morales-Sanchez A., Pompa-Mera E. N., Fajardo-Gutierrez A., et al. EBV, HCMV, HHV6, and HHV7 Screening in Bone Marrow Samples from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia // *Biomed Res Int*, 2014; 2014: 548097.
126. Moricke A., Reiter A., Zimmermann M., et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95 // *Blood*, 2008; 111: 4477-89.
127. 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.
128. Mullighan C. G. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Semin Hematol*, 2013; 50: 314-24.
129. Mullighan C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012; 2012: 389-96.
130. Mullighan C. G., Goorha S., Radtke I., et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia // *Nature*, 2007; 446: 758-64.
131. Mullighan C. G., Su X., Zhang J., et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia // *N Engl J Med*, 2009; 360: 470-80.
132. Mullighan C. G., Willman C. L. Advances in the Biology of Acute Lymphoblastic Leukemia-From Genomics to the Clinic // *J Adolesc Young Adult Oncol*, 2011; 1: 77-86.
133. Mullighan C. G., Zhang J., Kasper L. H., et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia // *Nature*, 2011; 471: 235-9.
134. Murakami J., Shimizu Y. Hepatic manifestations in hematological disorders // *Int J Hepatol*, 2013; 2013: 484903.
135. Nachman J. B., Heerema N. A., Sather H., et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia // *Blood*, 2007; 110: 1112-5.
136. Nera K. P., Alinikula J., Terho P., et al. Ikaros has a crucial role in regulation of B cell receptor signaling // *Eur J Immunol*, 2006; 36: 516-25.
137. Nousome 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.
138. Orkin S. H. Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood // Eighth edition. ed. Published- 2014.

139. Ouerhani S., Cherif N., Bahri I., et al. Genetic polymorphisms of NQO1, CYP1A1 and TPMT and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in a Tunisian population // *Mol Biol Rep*, 2013; 40: 1307-14.
140. 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.
141. 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.
142. Parasole R., Petruzzello F., De Matteo A., et al. Hypereosinophilia in childhood acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis: report of 2 cases and review of the literature // *Ital J Pediatr*, 2014; 40: 36.
143. 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.
144. Payne K. J., Dovat S. Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia // *Crit Rev Oncog*, 2011; 16: 3-12.
145. Pietila I., Vainio S. The embryonic aorta-gonad-mesonephros region as a generator of haematopoietic stem cells // *APMIS*, 2005; 113: 804-12.
146. Pizzo P. A., Poplack D. G. Principles and practice of pediatric oncology // 5th ed. Published: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. -
147. Propp S., Lizzi F. A. Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia // *Blood*, 1970; 36: 353-60.
148. Pui C.-H. Childhood leukemias // 3rd ed. Published: Cambridge University Press, 2012. -
149. Pui C. H., Boyett J. M., Relling M. V., et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia // *J Clin Oncol*, 1999; 17: 818-24.
150. Pui C. H., Evans W. E. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia // *Semin Hematol*, 2013; 50: 185-96.
151. Pui C. H., Relling M. V., Downing J. R. Acute lymphoblastic leukemia // *N Engl J Med*, 2004; 350: 1535-48.
152. Pui C. H., Robison L. L., Look A. T. Acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet*, 2008; 371: 1030-43.
153. 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.
154. Rajendran A., Bansal D., Marwaha R. K., Singhi S. C. Tumor lysis syndrome // *Indian J Pediatr*, 2013; 80: 50-4.
155. Ramirez J., Lukin K., Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment // *Curr Opin Immunol*, 2010; 22: 177-84.
156. Rebollo A., Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies // *Immunol Cell Biol*, 2003; 81: 171-5.
157. 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.
158. Reddy S. C., Menon B. S. A prospective study of ocular manifestations in childhood acute leukaemia // *Acta Ophthalmol Scand*, 1998; 76: 700-3.
159. Ren Y. Q., Han J. Q., Cao J. B., et al. Association of MDR1 gene polymorphisms with susceptibility to hepatocellular carcinoma in the Chinese population // *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012; 13: 5451-4.
160. Reynaud D., Demarco I. A., Reddy K. L., et al. Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros // *Nat Immunol*, 2008; 9: 927-36.
161. Robazzi T. C., Silva L. R., Mendonca N., Barreto J. H. Gastrointestinal manifestations as initial presentation of acute leukemias in children and adolescents // *Acta Gastroenterol Latinoam*, 2008; 38: 126-32.
162. Roberts K. G., Li Y., Payne-Turner D., et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia // *N Engl J Med*, 2014; 371: 1005-15.
163. Rosner B. Fundamentals of biostatistics // 6th ed. Published: Thomson-Brooks/Cole, 2006. -

164. Runge M. S., Patterson C. Principles of molecular medicine // 2nd ed. Published: Humana Press, 2006. -
165. Ryoo H., Kong M., Kim Y., Lee C. Identification of functional nucleotide and haplotype variants in the promoter of the CEBPE gene // J Hum Genet, 2013; 58: 600-3.
166. Schinkel A. H., Smit J. J., van Tellingen O., et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs // Cell, 1994; 77: 491-502.
167. Schwab C. J., Chilton L., Morrison H., et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features // Haematologica, 2013; 98: 1081-8.
168. Secker-Walker L. M., Lawler S. D., Hardisty R. M. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis // Br Med J, 1978; 2: 1529-30.
169. 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.
170. Seif A. E. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis // Cancer Genet, 2011; 204: 227-44.
171. Sellars M., Kastner P., Chan S. Ikaros in B cell development and function // World J Biol Chem, 2011; 2: 132-9.
172. 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.
173. 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.
174. 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.
175. Shukla V., Lu R. IRF4 and IRF8: Governing the virtues of B Lymphocytes // Front Biol (Beijing), 2014; 9: 269-82.
176. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics, 2014 // CA Cancer J Clin, 2014; 64: 9-29.
177. Skjorringe T., Tumer Z., Moller L. B. Splice site mutations in the ATP7A gene // PLoS One, 2011; 6: e18599.
178. Song C., Li Z., Erbe A. K., et al. Regulation of Ikaros function by casein kinase 2 and protein phosphatase 1 // World J Biol Chem, 2011; 2: 126-31.
179. 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.
180. Sulong S., Moorman A. V., Irving J. A., et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups // Blood, 2009; 113: 100-7.
181. 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.
182. 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.
183. 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.
184. Trentin L., Cerutti A., Zambello R., et al. Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders // Blood, 1996; 87: 3327-35.
185. Trevino L. R., Yang W., French D., et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia // Nat Genet, 2009; 41: 1001-5.
186. Trinh D. L., Scott D. W., Morin R. D., et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma // Blood, 2013; 121: 3666-74.
187. Urayama K. Y., Buffler P. A., Gallagher E. R., et al. A meta-analysis of the association between day-care attendance and childhood acute lymphoblastic leukaemia // Int J Epidemiol, 2010; 39: 718-32.

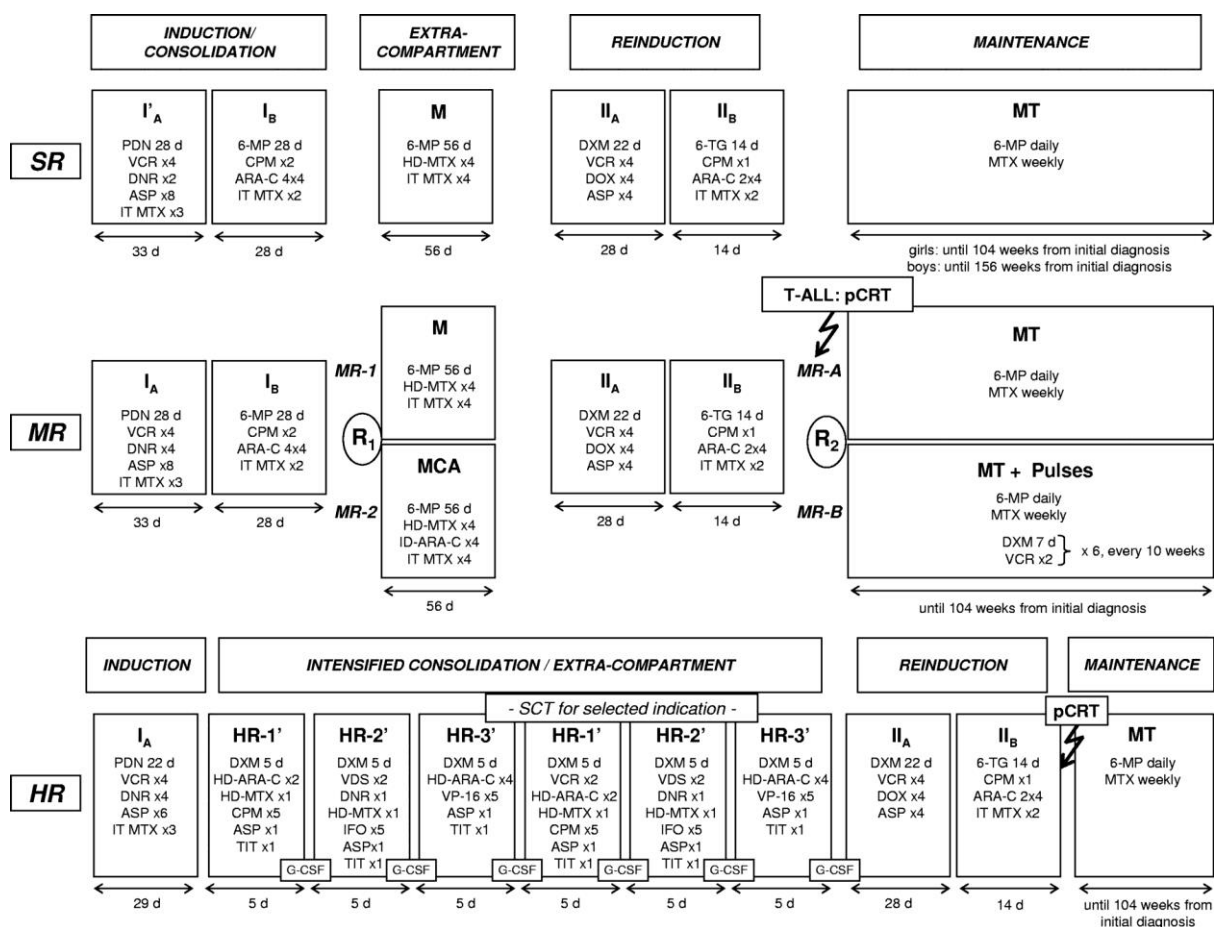
188. Urayama K. Y., Chokkalingam A. P., Metayer C., et al. SNP association mapping across the extended major histocompatibility complex and risk of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children // *PLoS One*, 2013; 8: e72557.
189. Urayama K. Y., Wiencke J. K., Buffler P. A., et al. MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007; 16: 1172-7.
190. Uren A. G., Kool J., Matentzoglou K., et al. Large-scale mutagenesis in p19(ARF)- and p53-deficient mice identifies cancer genes and their collaborative networks // *Cell*, 2008; 133: 727-41.
191. van der Veer A., Zaliouva M., Mottadelli F., et al. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL // *Blood*, 2014; 123: 1691-8.
192. 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.
193. Vitanza N. A., Zaky W., Blum R., et al. Ikaros deletions in BCR-ABL-negative childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with a distinct gene expression signature but do not result in intrinsic chemoresistance // *Pediatr Blood Cancer*, 2014; 61: 1779-85.
194. Volejnikova J., Mejstrikova E., Dorge P., et al. Ikaros (IKZF1) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR/ABL-negative acute lymphoblastic leukemia // *Pediatr Blood Cancer*, 2013; 60: 420-7.
195. Voûte P. A. *Cancer in children : clinical management* // 5th ed. Published: Oxford University Press, 2005. -
196. Walsh K. M., de Smith A. J., Welch T. C., et al. Genomic ancestry and somatic alterations correlate with age at diagnosis in Hispanic children with B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Am J Hematol*, 2014; 89: 721-5.
197. Walsh K. M., de Smith A. J., Xiao J., et al. A Novel Functional Polymorphism in the CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP), Epsilon (CEBPE) Gene Promoter Influences Acute Lymphoblastic Leukemia Risk Via Interaction with IKZF1 // Vol. 124. Place; Published 2014. -
198. Wang C., Chen J., Sun H., et al. CEBPE polymorphism confers an increased risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of 11 case-control studies with 5,639 cases and 10,036 controls // *Ann Hematol*, 2015; 94: 181-5
199. 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.
200. Wang L. D., Wagers A. J. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells // *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011; 12: 643-55.
201. Wang L. H., Song Y. B., Zheng W. L., et al. The association between polymorphisms in the MDR1 gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis of 52 case-control studies // *Cancer Cell Int*, 2013; 13: 46.
202. 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.
203. Werle E., Schneider C., Renner M., et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res*, 1994; 22: 4354-5.
204. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia // *Chem Biol Interact*, 2012; 196: 59-67.
205. 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.
206. 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.
207. Woo J. S., Alberti M. O., Tirado C. A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update // *Exp Hematol Oncol*, 2014; 3: 16.
208. Wu S., Fischer L., Gokbuget N., et al. Expression of interleukin 15 in primary adult acute lymphoblastic leukemia // *Cancer*, 2010; 116: 387-92.

209. 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.
210. 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.
211. Yamanaka R., Barlow C., Lekstrom-Himes J., et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94: 13187-92.
212. 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.
213. 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.
214. Yang J. J., Bhojwani D., Yang W., et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood*, 2008; 112: 4178-83.
215. Yang J. J., Cheng C., Devidas M., et al. Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia // *Blood*, 2012; 120: 4197-204.
216. Yang J. J., Cheng C., Yang W., et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia // *JAMA*, 2009; 301: 393-403.
217. 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.
218. Yasmeen N., Ashraf S. Childhood acute lymphoblastic leukaemia; epidemiology and clinicopathological features // *J Pak Med Assoc*, 2009; 59: 150-3.
219. Yavuz H., Cakir M. Transverse myelopathy: an initial presentation of acute leukemia // *Pediatr Neurol*, 2001; 24: 382-4.
220. Yoshida T., Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation // *Int J Hematol*, 2014; 100: 220-9.
221. 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.
222. 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.
223. Zaliouva M., Zimmermannova O., Dorge P., et al. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*, 2014; 28: 182-5.
224. Zandi S., Mansson R., Tsapogas P., et al. EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of a transcription factor network in common lymphoid progenitors // *J Immunol*, 2008; 181: 3364-72.
225. Zappacosta B., Graziano M., Persichilli S., et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults // *Cell Biochem Funct*, 2014; 32: 1-4.
226. Zarogoulidis P., Lampaki S., Yarmus L., et al. Interleukin-7 and interleukin-15 for cancer // *J Cancer*, 2014; 5: 765-73.
227. Zeng H., Wang X. B., Cui N. H., et al. Associations between AT-rich interactive domain 5B gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis // *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15: 6211-7.
228. 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.
229. Zheng B., Wang Z., Chai R. NQO1 C609T polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis // *Arch Med Sci*, 2014; 10: 651-60.

230. Zhu J., Emerson S. G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment // *Oncogene*, 2002; 21: 3295-313.
231. Zintzaras E., Doxani C., Rodopoulou P., et al. Variants of the MTHFR gene and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children: a synthesis of genetic association studies // *Cancer Epidemiol*, 2012; 36: 169-76.
232. Zombori L., Kovacs G., Csoka M., Derfalvi B. Rheumatic symptoms in childhood leukaemia and lymphoma-a ten-year retrospective study // *Pediatr Rheumatol Online J*, 2013; 11: 20.
233. Zuna J., Madzo J., Krejci O., et al. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia // *Blood*, 2011; 117: 368-9; author reply 70-1.

10. PIELIKUMI

ALL terapijas protokols BFM-95



Apzīmējumi: SR - standarta risks, MR – vidējs risks, HR- augsts risks, PDN – prednizolons, VCR – vinkristīns, DNR – daunorubicīns, ASP – E.coli L-asparģināze, 6-MP – 6-merkaptopurīns, ARA-C – citarabīns, CPM –ciklofomāds, DXM – deksametazons, DOX – doksorubicīns, 6-TG – 6-tioguanīns, HD – augsta deva, ID – vidēja deva, IT – intratekāli, TIT – trīskārša intratekāla terapija, MT (maintenance) – uzturošā terapija, pCRT – presimptomātiska staru terapija.

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

09.03.2011. Nr.01-29.1/2

Rīgas Stradiņa universitātes
Molekulārās ģenētikas zinātniskajai
laboratorijai

*Atzinums Nr.01-29.1/2 par pieteikuma
projektu „Akūtas limfoblastu leikozes
attīstību un gaitu ietekmējošie ģenētiskie
faktori bērnu vecumā”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2011.gada 9.martā izskatīja Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas iesniegto pieteikuma projektu „Akūtas limfoblastu leikozes attīstību un gaitu ietekmējošie ģenētiskie faktori bērnu vecumā”.

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2011. gada 9.marta sēdes protokola Nr.1 punktu 2, tiek izsniegts atzinums, ka Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas iesniegtais pieteikuma projekts „Akūtas limfoblastu leikozes attīstību un gaitu ietekmējošie ģenētiskie faktori bērnu vecumā” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētājs



J.Bundulis

Reaģentu ķīmiskais sastāvs

1. Sarkano asins šūnu līzes A1 šķīduma ķīmiskās sastāvdaļas:

Saharoze	109.5 g
1M Tris – HCl pH 7.6	10 ml
1M MgCl ₂	5 ml
ddH ₂ O	Līdz 100 ml

2. Šūnu suspensijas šķīduma ķīmiskās sastāvdaļas:

0.5M EDTA	50 ml
5M NaCl	40 ml
ddH ₂ O	Līdz 1000 ml

3. SDS ķīmiskās sastāvdaļas:

SDS (nātrija duodecilsulfāts)	50 g
ddH ₂ O	Līdz 500 ml

4. DNS šķīdināšanas šķīduma ķīmiskās sastāvdaļas:

1M Tris – HCl pH 7.6	5 ml
0.5M EDTA	1 ml
ddH ₂ O	Līdz 500 ml

5. 1,5% Agarozes gela pagatavošana

Agarozes pulveris	1,5 g
TBE buferis	100 ml
Etīdija bromīds	5 µl

6. 8% Poliakrilamīda gela sastāvdaļas

ddH ₂ O	4 ml
10x TBE buferis	600 µl
30% PAA	1,6 ml
3% APS	120 µl
TEMED	6 µl

7. 1M TRIS HCl bufera sastāvdaļas

TRIS	121,14 g
ddH ₂ O	līdz 600 ml
HCl – pH līdz 7,6	~ 40 ml
ddH ₂ O	līdz 1000 ml

Gēnā *ARID5B* lokalizēto alēlisko variantu relatīvais biežums

Alēliskais variants	Genotips	Biežums ALL pacientiem	Biežums kontroles grupā	OR CI 95%	p vērtība
rs10994982	AA	0,27	0,18	1,68 (0,8-3,54)	0,156
	AA+AG	0,75	0,64	1,69 (0,85-3,39)	0,115
rs7908445	TT	0,22	0,11	2,38 (1,01-5,61)	0,041
	TT+CT	0,64	0,52	1,59 (0,85-2,97)	0,142
rs7923074	AA	0,22	0,11	2,38 (1,01-5,61)	0,041
	AA+AC	0,65	0,52	1,68 (0,9-3,16)	0,105
rs10821936	CC	0,18	0,07	2,8 (1,06-7,47)	0,024
	CC+CT	0,51	0,41	1,48 (0,8-2,74)	0,19
rs10821937	CC	0,17	0,07	2,9 (1,05-8,13)	0,031
	CC+CT	0,51	0,39	1,59 (0,85-2,93)	0,14
rs7896246	AA	0,17	0,07	2,55 (0,95-6,91)	0,061
	AA+AG	0,51	0,39	1,64 (0,88-3,04)	0,107
rs10821938	AA	0,25	0,11	2,53 (1,11-5,79)	0,019
	AA+AC	0,69	0,64	1,25 (0,65-2,4)	0,54
rs7089424	GG	0,17	0,07	2,9 (1,05-8,13)	0,031
	GG+GT	0,51	0,39	1,59 (0,85-2,93)	0,14

Ģimeņu modeļa saistības pētījums alēliskie variantiem rs4132601, rs3731217 un rs2239633

Gēna nosaukums	Alēliskais variants	Retāk sastopamā alēle	Alēle nodota	Alēle nenodota	OR 95% CI	p vērtība
<i>IKZF1</i>	rs4132601	G	22	27	0,69 (0,46 – 1,08)	0,475
<i>CDKN2A</i>	rs3731217	G	8	9	0,89 (0,34 – 2,3)	0,8
<i>CEBPE</i>	rs2239633	T	20	31	0,65 (0,37 – 1,13)	0,12

Gadījuma – kontroles analīze alēliskie variantiem rs4132601, rs3731217 un rs2239633

Gēna nosaukums	Alēliskais variants	Retāk sastopamā alēle	Retāk sastopamās alēles biežums ALL grupā	Retāk sastopamās alēles biežums kontroles grupā	OR 95% CI	p vērtība
<i>IKZF1</i>	rs4132601	G	0,25	0,32	0,81 (0,44 – 1,08)	0,1
<i>CDKN2A</i>	rs3731217	G	0,11	0,08	1,4 (0,7 – 2,8)	0,33
<i>CEBPE</i>	rs2239633	T	0,45	0,43	1,09 (0,73 – 1,64)	0,67

Gēna alēlisko variantu rs4132601, rs3731217 un rs2239633 nozīmīguma analīze ar hibrīdmetodi, apvienojot abus pētījuma modeļus

Gēna nosaukums	Alēliskais variants	Retāk sastopamās alēles biežums	RR heterozig. stāvoklī 95% CI	p vērtība heterozig. stāvoklī	RR homozig. stāvoklī 95% CI	p vērtība homozig. stāvoklī
<i>IKZF1</i>	rs4132601	0,29	1,22 (0,71 – 2,06)	0,47	1,36 (0,55 – 3,32)	0,51
<i>CDKN2A</i>	rs3731217	0,1	0,83 (0,42 – 1,69)	0,99	-	0,99
<i>CEBPE</i>	rs2239633	0,47	1,05 (0,6 – 1,86)	0,87	0,85 (0,38 – 1,88)	0,7