

Rīgas Stradiņa Universitāte

Iveta Dzīvīte-Krišāne

21-HIDROKSILĀZES DEFICĪTA
MOLEKULĀRIE MEHĀNISMI,
IMŪNGENĒTISKAIS RAKSTUROJUMS,
TO KLĪNISKĀS UN TERAPEITISKĀS
KONSEKVENCES BĒRNIEM LATVIJĀ

(Specialitāte – pediatrija)

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Rīga, 2010

Promocijas darbs veikts:

- Doktorantūras programmas klīniskā daļa izstrādāta Bērnu klīniskā universitātes slimnīcā;
- Rīgas Stradiņa Universitātes Pediatrijas katedrā;
- Eksperimentālā daļa veikta Karolinskas institūta Bērnu endokrinoloģijas centrā un Endokrinoloģijas zinātniskā laboratorijā Zviedrijā, Stokholmā.

Zinātniskā darba vadītāja:

Dr.habil.med., profesore Dace Gardovska

Darba zinātniskais konsultants:

Dr.biol., profesors Edvīns Miklaševičs

Recenzenti:

Dr.habil.med., profesors Aivars Lejnieks (RSU)

Dr.habil.med., profesors Valdis Pīrāgs (LU)

Dr.habil.med., profesore Danute Lašiene (Kauņas Medicīnas universitāte)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2011.gada 15.martā plkst. 15.00

Rīgas Stradiņa universitātes Internās medicīnas promocijas padomes atklātajā sēdē

RSU Hipokrāta auditorijā, Rīgā, Dzirciema ielā 16.

Ar promocijas darbu var iepazīties Rīgas Stradiņa universitātes bibliotēkā.

Promocijas padomes sekretāre:

Profesore, Dr.habil.med. Maija Eglīte

Darbā lietotie saīsinājumi

Skaitļi

11beta-HSD - 11-beta hidroksisteroīd-dehidrogenāze

17-HSD - 17-hidroksisteroīd-dehidrogenāze

17-OH-P - 17-hidroksi-progesterons

21-H - 21-hidroksilāze

21-HD - 21-hidroksilāzes deficīts

3-beta-HSD - 3-beta hidroksisteroīd-dehidrogenāze

A

AKTH - adrenokortikotropais hormons

B

BKUS - Bērnu Klīniskā Universitātes Slimnīca

C

cAMF - cikliskais adenozin-monofosfāts

CRH - corticotropin-releasing hormone

D

ddNTF - 2,3-di-dezoksinukleozīda trifosfāts

DHEA - dehidro-epi-androsterons

DHEA-S - dehidro-epi-androsterona sulfāts

DNS - dezoksinukleīnskābe

DOK – dezoksikortikosterons

E

EKG - elektrokardiogramma

ESPE - European Society of Pediatric Endocrinology

G

GK - glikokortikoīdi

GnRH - gonadotropin-releasing hormone

I

IGF - insulin-like growth factor

IVGH - iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija

P

P - progesterons

PCR - polymerase chain reaction

PRA - plazmas renīna aktivitāte

S

StAR - steroīdu genēzes akūtais regulējošais proteīns

SZ - iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas sālszaudes forma

T

TNF - tumoru nekrozes faktors

V

VV - iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas vienkārši virilizējošā forma

1. Ievads

Iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija (IVGH) jeb iedzimts adrenogenitālais sindroms (AGS) ir viens no visbiežāk sastopamākajiem iedzimtiem metaboliem defektiem, kā pamatā ir autosomāli-recesīvs, monogēni noteikts viena vai vairāku steroīdu biosintēzes enzīmu deficīts. Katra šī enzīma deficīts IVGH slimniekam izraisa savas, tipiskas metabolas un klīniskas izpausmes, bet to kopēja raksturīga pazīme ir šādam slimniekam attīstījusies glikokortikoīdu nepietiekamība ar sekojošu kompensatoru, adrenokortikotropā hormona (AKTH) hiperstimulētu, virsnieru garozas hiperplāziju.

1.1. Darba aktualitāte

Klīnicisti un medicīniskajā izpētē strādājošie zinātnieki aizvien lielāku uzmanību pievērš hormonālajām norisēm kritiski slimiem slimniekiem, mēģinot noskaidrot faktorus, kuru izmaiņas šādās situācijās nosaka slimības iznākumu. Virsnieru garozas hormoni starp šiem faktoriem, nenoliedzami, ir vieni no būtiskākajiem, tādēļ cilvēki, kuriem ir iedzimts šo hormonu sekrēcijas deficīts, izraisa īpašu klīnisku un teorētisku interesi, jo kompensēta virsnieru garozas nepietiekamība stresa situācijās var pāriet dekompensētā, izraisot dzīvību apdraudošu akūtu virsnieru garozas krīzes klīniku. Tā kā IVGH vieglāko formu izplatība atsevišķās populācijās mēdz būt pat 1:100 [1, 5-7], tad šīs problēmas aktualitāti nedrīkst novērtēt par zemu.

Latvijā līdz šim nav veikts neviens IVGH pētījums ne klīniskā, ne zinātniskā virzienā.

HLA III klases gēnu pētījumi konkrētā populācijā aktuāli arī tapēc, ka slimības marķeri dažādās etniskās grupās atšķiras.

Promocijas darbs varētu dot jaunas IVGH diagnostikas iespējas izstrādni un pareizas ārstēšanas taktikas izvēli, ieskaitot prenatālo diagnostiku un ārstēšanu.

Galvenie savlaicīgas IVGH diagnostikas un ārstēšanas mērķi ir:

- neonatālās mirstības samazināšana no nediagnosticētas akūtas virsnieru nepietiekamības krīzes IVGH sālszaudes formas gadījumā,
- pareiza jaundzimušā dzimuma noteikšana IV - V virilizācijas pakāpes (pēc *Prader*) gadījumā un izvairīšanās no tālākās dzimuma maiņas (atbilstoši ģenētiskajam dzimumam) radītajām medicīniskajām, psiholoģiskajām un sociālajām problēmām,
- neaугlības problēmas samazināšana.

Promocijas darbs ir pirmais IVGH pētījums bērniem Latvijā.

1.2. Problēmas nostādne

Tā kā IVGH ir iedzimts metabols defekts, kurš sāls zaudes formas gadījumā var novest pie jaundzimušā vai zīdaiņa mirstības, kuras tiešais iemesls ir akūta virsnieru garozas mazspēja, tad aizvien noteiktāk tiek uzskatīts par pamatotu prenatāls skrīnings šīs patoloģijas atklāšanai un prenatālas terapijas uzsākšanai. Mūsdienās šāda skrīninga diagnostika balstās, galvenokārt, uz molekulāri ģenētiskiem izmeklējumiem un daudzās valstīs tā arvien plašāk tiek ieviesta kā klīniskas rutīnas metode. Kā liecina līdz šim uzkrātā klīniskā pieredze, tad steroīdu 21-hidroksilāzes deficītu spēj izraisīt daudzas tās gēna (*CYP21* gēna) mutācijas, pie kam atsevišķās populācijās dominē kādas no tām [17,19,20,24,28,84].

Pastāv vairākas neatrisinātas problēmas, kuru noskaidrošana ļautu uzlabot 21-hidroksilāzes deficīta diagnostiku un noteikt slimības riska un prognozes faktorus:

- slimības epidemioloģisko rādītāju dinamikas izvērtēšana IVGH vietas precizēšanai bērnu hroniskās patoloģijas struktūrā, slimības sākuma variantu attīstības izpēte,
- HLA III klases gēnu un specifisko gēnu allēļu mutāciju un IVGH saistības noskaidrošana, lai identificētu slimības un tās klīnisko formu imūnģenētiskos marķerus,
- riska faktoru (imūnģenētisko, klīnisko) noskaidrošana slimībai kopumā un tās klīniskajām formām,
- prediktīvo pazīmju noskaidrošana pacientiem ar vienkārši virilizējošo formu, lai izstrādātu savlaicīgas šīs formas diagnostikas algoritmus.

1.3. Darba mērķis

Promocijas darba mērķis ir izpētīt 21-hidroksilāzes deficīta molekulāros mehānismus, imūnģenētisko raksturojumu, to klīniskās un terapeitiskās konsekvences bērniem Latvijā.

1.4. Darba uzdevumi

- Noskaidrot iespējamo saistību starp Latvijā vairāk izplatītiem ar IVGH saistītiem HLA haplotipiem un IVGH klīniskajām formām, IVGH attīstības HLA haplotipu Latvijā atšķirības no tādiem Eiropā,
- Noteikt Latvijā dominējošās *CYP21* gēna mutācijas,
- Noskaidrot *CYP21* gēna dominējošo mutāciju spektra atšķirības no Eiropas valstīs konstatētajiem,
- Analizēt pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitu piecu gadu periodā dinamikā.

1.5. Aizstāvēšanai izvirzītās idejas

- *CYP21* gēna dominējošo mutāciju spektrs Latvijā līdzinās ar Eiropas valstīs konstatēto,
- IVGH izplatība Latvijā būtiski neatšķiras no Baltijas un Ziemeļvalstu reģionā sastopamās,
- jaundzimušo IVGH skrīnings ir objektīva nepieciešamība, lai sekmētu zīdaiņu mirstības samazināšanos no savlaicīgi nediagnosticētas akūtas virsnieru garozas mazspējas, noteiktu pareizu jaundzimušā dzimumu meitenes virilizācijas gadījumā, samazinātu neauglības problēmas IVGH pacientiem fertīlajā vecumā.

1.6. Darba hipotēzes

- *CYP21* gēna dominējošo mutāciju spektrs IVGH pacientiem Latvijā neatšķiras no Eiropas valstīs konstatētajām,
- HLA III klases haplotipi IVGH pacientiem Latvijā neatšķiras no Eiropas valstīs konstatētajiem.

2. Rezultātu novitāte

1. Pirmo reizi apkopoti un dinamiskā izvērtēti IVGH epidemioloģiskie dati Latvijā. Tā kā darbā pielietotā datu vākšanas un analīzes metodika izvēlēta atbilstoši starptautiskiem standartiem, tad iegūtie rezultāti ir salīdzināmi ar citās pasaules valstīs iegūtajiem. Tas, savukārt, ir ļāvis noskaidrot, ka IVGH saslimstība Latvijā ir zemāka nekā Ziemeļeiropas valstīs konstatētā.
2. Noskaidrots, ka IVGH attīstības riska faktori Latvijā būtiski neatšķiras no tādiem Ziemeļeiropas reģionā un tie saistās ar HLA-B14;DR1 haplotipu un HLA-A3;Bw47;DR7 haplotipu.
3. Noskaidrots, ka IVGH sāls zaudes formas slimniekiem Latvijā dominē *CYP21* gēna lielās delēcijas un konversijas, kā arī punktveida mutācijas (A / C par G) intronā 2.
4. Noskaidrots, ka IVGH vienkārši virilizējošās formas slimniekiem Latvijā dominē Ile-172 par Asn mutācijas.
5. Noskaidrots, ka IVGH neklasiskās formas slimniekiem Latvijā biežāk sastopamas ir Val281Leu un Pro30Leu mutācijas.

3. Promocijas darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tas sastāv no Titullapas un 10 nodaļām. Darba būtība ir izklāstīta 4 nodaļās, bet pārējās 6 nodaļas ir attiecīgi - ievadam, secinājumiem, rezultātu novitātei, darba anotācijai, literatūras atsaucēm un pielikumiem. Darbs izklāstīts uz 136 lappusēm mašīnrakstā. Tas ilustrēts ar 22 tabulām un 52 attēliem. Darbam pievienoti 27 pielikumi.

4. Materiāls un metodes

4.1. Slimnieku raksturojums un atlase

Pētījumā izmantotie dati par 53 21-hidroksilāzes deficīta slimniekiem apkopoti VAS Bērnu Klīniskās Universitātes Slimnīcas (BKUS) Bērnu un pusaudžu endokrinoloģijas centra iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas pacientu reģistrā. Minētās slimības pacientu reģistrs uzsākts 1989.gadā uz bērnu endokrinoloģijas nodaļas bāzes, pateicoties ārstu entuziasmam.

Pacientu vecums 0 - 18 gadi.

Pētījumā veikta prospektīva un retrospektīva datu analīze laika periodā no 1989. - 1992.gadam. Retrospektīvajā pētījumā tika iekļauti visi pacienti ar IVGH klasisko formu.

Pacienti tika atlasīti pēc SSK-10 diagnozes koda E25.0.

Primārais datu avots - BKUS endokrinoloģijas centra pacientu stacionāra slimības vēstures un ambulatorās kartes.

Sekundārais avots – ģimenes ārstu izraksti no ambulatorajām kartēm.

Izvērtēti 53 21-hidroksilāzes deficīta (sālszaudes un vienkārši virilizējošās formas) slimības gadījumi bērniem Latvijā.

Katram slimniekam izveidota anketa “Sākotnējā informācija par IVGH slimnieku.” un “Aktuāla informācija par IVGH slimnieku.”, kuru dati analizēti.

Asins paraugi imūnģenētiskai un molekulāri ģenētiskai izmeklēšanai iegūti laikā no 2000. - 2004.gadam no visiem 53 slimniekiem, rakstiski saņemot atļauju no bērna vecāka vai likumīgā aizbildņa (atļaujas un informācijas formas par pētījumu “Piekrišana molekulāri ģenētiskam pētījumam.” un “Informācija izmeklējamās personas vecākiem.”).

Pirms iesaistīšanas pētījumā visiem pacientiem IVGH diagnoze pierādīta, pamatojoties uz ESPE (*European Society of Pediatric Endocrinology*) izstrādātajiem diagnostiskiem kritērijiem.

Izveidotas 2 kontroles grupas: imunoģenētiskai kontrolei – 20 veseli neradniecīgi bērni, molekulāri ģenētiskai kontrolei - 10 veseli neradniecīgi bērni.

Venozo asiņu paraugi iegūti gadījumos, kas nav saistīti ar autoimūnu, infekciozu vai endokrīnu patoloģiju. Kontroles grupas bērni atbilstoši slimniekiem pēc vecuma un dzimuma.

Piecu gadu laikā (līdz 2009.gadam) veikta visu 53 pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitas dinamiskās novērošanas analīze, izvērtējot:

- klīniskos parametrus – augumu, augumu pieaugušā vecumā (fināla augumu), pubertātes sākuma vecumu, *menarche* vecumu,
- bioķīmiskos rādītājus – $17\alpha\text{OHPg}$, Na un K līmeni asinīs diagnostikas brīdī un $17\alpha\text{OHPg}$ līmeni novērošanas laikā,
- terapijas shēmas analīzi,
- komplikācijas.

Noteiktais novērošanas biežums līdz 3 gadu vecumam - reizi 3 mēnešos, vēlāk - atkarībā no klīnikas - vidēji reizi 6 mēnešos.

Bērni ar IVGH atradās BKUS bērnu un pusaudžu endokrinoloģijas centra aprūpē, tādēļ šajā izpētē iegūtie dati zināmā mērā ļauj spriest gan par šo problēmu Latvijā kopumā, gan atsevišķos tās reģionos, kā arī salīdzināt IVGH izplatību pie mums ar kaimiņvalstu un pasaules datiem.

Epidemioloģisko rādītāju aprēķināšanai izmantoti Latvijas Republikas Centrālās Statistikas Pārvaldes dati par ikgadējo dzimstību un bērnu skaitu Latvijā.

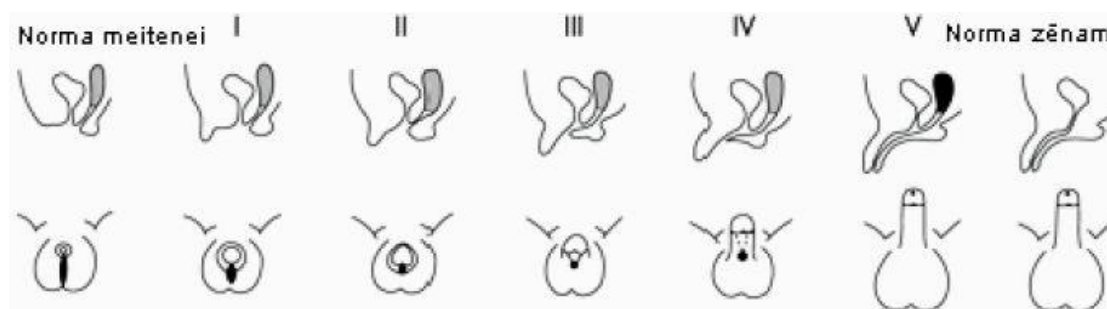
4.2. Pētījuma subjekti

Izpētē iegūti un analizēti 53 bērnu vecuma IVGH slimnieku dati un klīniskais materiāls. 30 slimnieku bija zēni, bet 23 - meitenes; 4 no pētījumā iekļautajiem zēniem ģenētiski bija meitenes ar IVGH izraisītu izteiktu virilizāciju. 29 slimniekiem konstatēta IVGH sāls zaudes klīniskā forma, bet 24 - vienkārši virilizējošā forma.

Ārējo dzimumorgānu izveide tika izvērtēta pēc *Prader* virilizācijas skalas.

Attēls 1.

Prader virilizācijas skala [235].



Prader 0: Normāli sievišķie ārējie dzimumorgāni.

Prader I: Sievišķie ārējie dzimumorgāni ar palielinātu klitoru - klitoromegālija.

Prader II: Klitoromegālija ar daļēju kaunuma lūpu saplūšanu, kuras tādējādi veido piltuvveida urogenitālo sīnusu; maksts un uretra atveras uz šo piltuvveidīgo veidojumu.

Prader III: Klitoromegālija sasniedz phallus apmērus; pilna kaunuma lūpu saplūšana, veidojot urogenitālo sīnusu uz kuru atveras maksts un uretra; urogenitālajam sīnusam ir viena ārējā atvere.

Prader IV: Ārējos dzimumorgānus veido phallus un pilnīgi saaugušas kaunuma lūpas, veidojot scrotum līdzīgu veidojumu; maksts un uretra atveras uz kopēju atveri phallus pamatnē.

Prader V: Ārējie dzimumorgāni pēc izskata atgādina normālus vīrišķos ārējos dzimumorgānus; maksts un uretra atveras ar kopēju atveri phallus galā.

Pacienta ģenētiskais dzimums tika noteikts ar rutīnas kariotipa analīzi Valsts Ģenētikas centrā.

Augšanas dinamika pacientiem tika izvērtēta pēc standartdeviāciju (SDS) augšanas līknēm.

Pubertāte tika izvērtēta pēc Tannera kritērijiem, par pubertātes sākumu zēniem uzskatot *testis* tilpuma palielināšanos 4 ml, bet meitenēm – krūšu dziedzeru palielināšanos [237].

17αOHPg līmenis asinīs tika analizēts pēc laboratorijas references rādītājiem.

4.3. Ieslēgšanas kritēriji

Pētījumā tika iekļauti pacienti ar klīniski skaidri pierādītu klasisko IVGH formu pēc ESPE izstrādātajiem diagnostiskajiem kritērijiem [215] atbilstoši SSK-10 diagnozes kodam E25.0.

Kontroles grupā tika iekļauti BKUS pacienti ar akūtas respiratoras sasilšanas diagnozi bez klīniskām un laboratorām norādēm uz jebkādu citu veselības traucējumu.

4.4. Izslēgšanas kritēriji

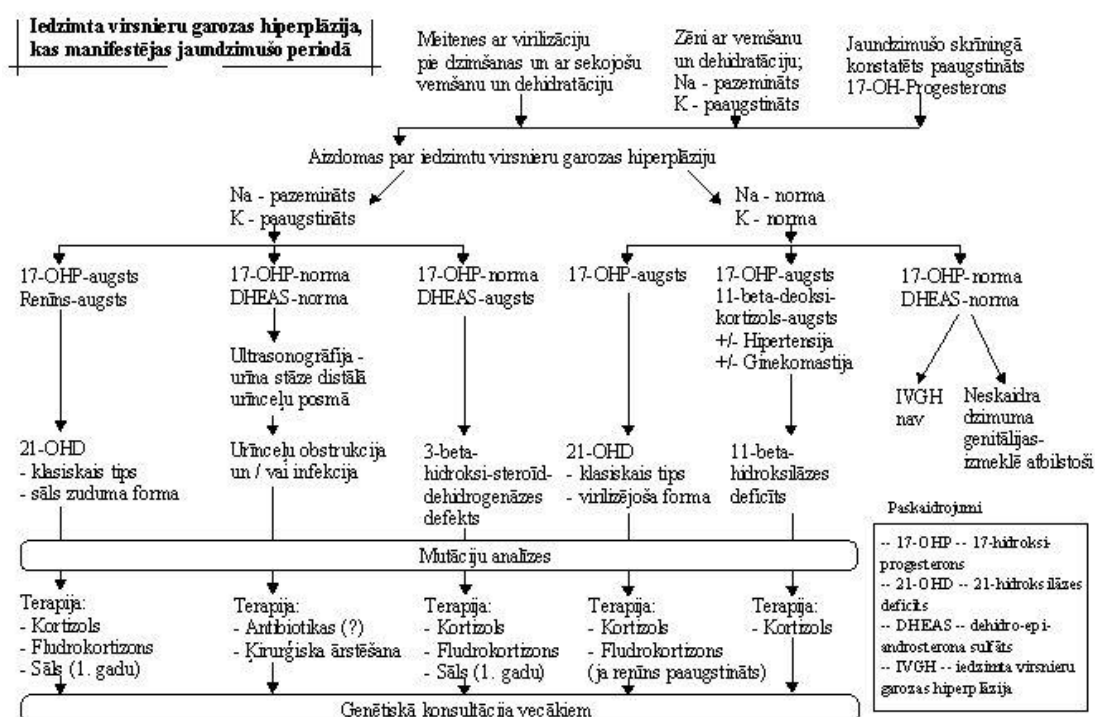
Pacienti, kuru vecāki vai juridiskie aizbildņi atteikušies no anketēšanas vai līdzdalības pētījumā. Netika saņemts neviens atteikums par piedalīšanos pētījumā.

4.5. Diagnostika un klasifikācija

IVGH diagnosticē pēc klīniskiem, hormonāliem un molekulāri ģenētiskiem kritērijiem, kas pamatojas uz ESPE un *Lawson Wilkins Endokrīnās Biedrības* 2002. gadā kopēji izstrādātiem IVGH diagnostikas standartiem [3,4,31,209,210,213,215, 218].

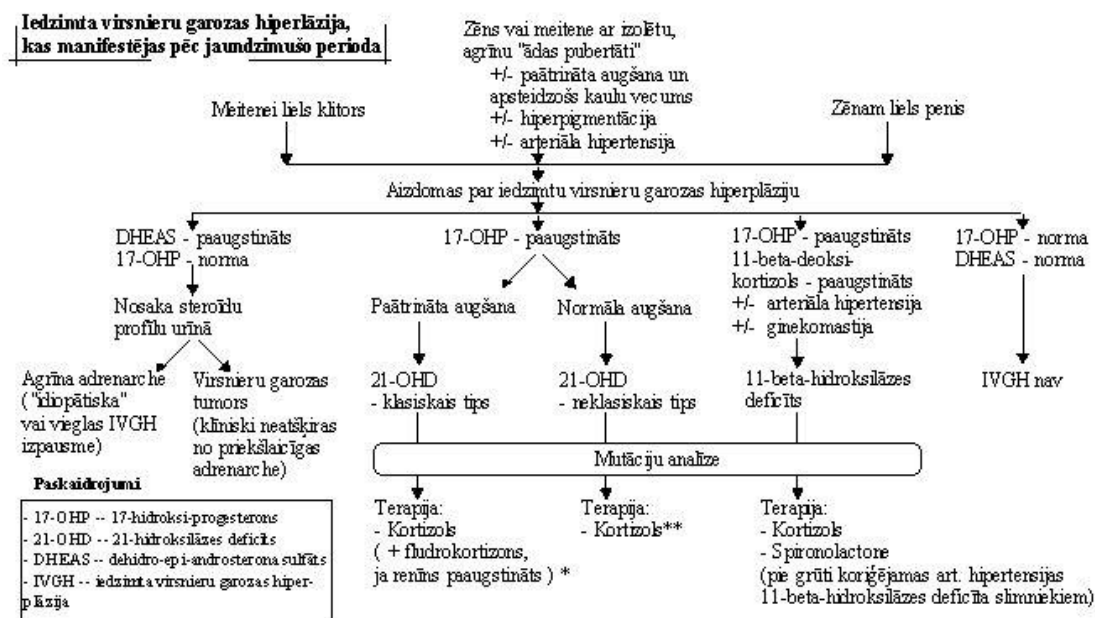
Attēls 2.

IVGH diagnostikas algoritms jaundzimušajiem [222].



Attēls 3.

IVGH diagnostikas algoritms bērniem pēc jaundzimušo vecuma [223].



* Pie vidēji smagas 21-OHD formas sāls zudums var norīkāt bez redzamām klīniskām pazīmēm. Paaugstinātais renīna līmenis norāda uz paaugstinātām minerokortikoidu sintēzes iespējām. Fludrokortizons 0.05-0.1 mg/m²/dienā kompensē minerokortikoidu deficītu un ļauj samazināt glikokortikoidu devu.

** Pie viegla 21-OHD jeb 21-OHD neklasiskā tipa (piemēram, kad tas izpaužas vienīgi kā agrāka pubertāte un īsāks augums), kortizolu ikdienā var nenozīmēt, bet ieteikt to lietot tikai stresa situāciju gadījumos.

4.6. Lietotās metodes

4.6.1. CYP21/CYP21P molekulārai analīzei izmantotie praimeri

CYP21 / CYP21P molekulārai analīzei tika izmantoti *Metabion International AG* (Vācija) ražotie praimeri.

4.6.2. DNS izdalīšana no asinīm

Hromosomālās DNS (hrDNS) izdalīšanai izmanto 2 - 3 ml asiņu. Asinis vāc vakutainera stobriņos, kas satur EDTA vai citrāta buferi, tā novēršot asiņu sarecēšanu.

Asinis uzglabā pie - 20 C - 70 C. Nav vēlams asinis vairākkārtīgi atsaldēt.

hrDNS tiek izdalīta no leukocītiem, izmantojot komerciālo *Qiagen* komplektu DNS izdalīšanai no asinīm (*QIAamp® DNA Blood Mini Kit*), atbilstoši ražotāja apstiprinātai metodikai.

4.6.3. CYP21 gēna mutāciju noteikšana ar PCR

Polimerāzes ķēdes reakciju (*Polymerase chain reaction - PCR*) ļoti plaši izmanto visdažādākajās bioloģijas un medicīnas nozarēs, diagnostikā, DNS fragmentu pavairošanai, mutaģenēzē un sekvenēšanai.

Metodes būtībā ir DNS amplifikācija, ko veic termostabila polimerāze (*Taq* polimerāze). *PCR* balstās uz 20 - 40 reižu atkārtotiem DNS sintēzes cikliem. Katru sintēzes ciklu veido trīs reakcijas posmi: DNS denaturācija, praimeru hibridizācija un DNS sintēze.

Pārbaudāmo materiālu 10 µL suspendēja 200 µL fizioloģiskā šķīduma un 2 µL izmantoja kā matricu amplifikācijai ar specifiskiem praimeriem (skat. Tabulu 1). Viena parauga *PCR* amplifikācijas reakcijas pagatavošanai tika izmantots 10 mM dNTP maisījums - 0,1 mM, atbilstoši praimeri 200 mM, MgCl₂ - 1,5 mM, *Taq* polimerāze - 1 V, pievienots destilēts ūdens līdz 12,5 ml.

PCR amplifikācijas produktu attīrīja ar kitiem saskaņā ar ražotāja norādījumiem. *PCR* amplifikācijas produktu sadalīja 2% agarozes gēlā izmantošanai DNS sekvenēšanai un vizualizēja ar etīdija bromīdu.

4.6.4. DNS sekvenēšana

DNS sekvenēšanā izmantoja *Big Dye* kitu (*Biosystems, UK*). Reakciju veica saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Reakciju analizēja izmantojot tos pašus praimerus, ko *PCR* reakcijā (skat. Tabulu 1).

4.6.5. HLA gēnu haplotipēšana

1. HLA A,B,C gēnu amplifikācija

Genoma DNS iegūtas no slimnieku un kontroles grupas perifēro asiņu leukocītiem. Amplifikācijai tika pakļauts HLA gēnu 2.polimorfais eksons. Amplifikācija *PCR* notika programmētajā terminālajā ciklērā (*Perkin Elmer, Cetus, Connecticut, USA*). HLA B amplifikācija veikta 30 ciklos: denaturācija 95° C temperatūrā 1 minūti, hibridizācija - 55° C temperatūrā 1 minūti, sintēze - 72° C 2 minūtes. HLA A amplificēti 35 cikli: denaturācija 94° C temperatūrā 1 minūti, hibridizācija - 62° C 1

minūti un sintēze - 72° C temperatūrā 2 minūtes. HLA otrā eksona amplifikācijai tika lietoti praimeru no *Erlich, Bugawan*.

2. HLA B gēnu tipēšana

HLA B gēnu tipēšana veikta ar zemas izšķiršanas polimerāzes ķēdes reakciju (*low resolution PCR-SSP*), lietojot sekvenču specifiskus praimerus atbilstoši ražotāja noteiktajai metodikai (*BA Gene; BAG Lich*, Vācija). Identificēti galvenie HLA B alēļu tipi.

4.7. Iegūto rezultātu statistiskā apstrāde

Datu apstrādei izmantota SPSS programma, datu salīdzināšanai T-tests, bet datu analīzei - aprakstošās un secinošās statistikas metodes.

Atbilstoši izvirzītajiem uzdevumiem un datu veidiem tika izmantotas parametriskās un neparametriskās statistikas metodes.

Iegūto rezultātu statistiskai apstrādei lietotas sekojošas metodes:

- centrālās tendences rādītāji ar vidējā aritmētiskā aprēķināšanu,
- izkliede datiem raksturota ar standartnovirzi,
- Chi - square tests (c2 tests),
- CI analīze - (*Wilson metode*) vienas izlases datu intervāla aprēķināšana,
- *Newcombe metode* - proporcijas un to differences,
- lineārās regresijas metode.

Par statistiski ticamu tika pieņemts būtiskuma līmenis $p < 0,05$.

Hipotēžu pārbaudēs raksturlielumu atšķirības vērtētas ar ticamību 95%, kas atbilst būtiskuma līmenim $p=0,05$.

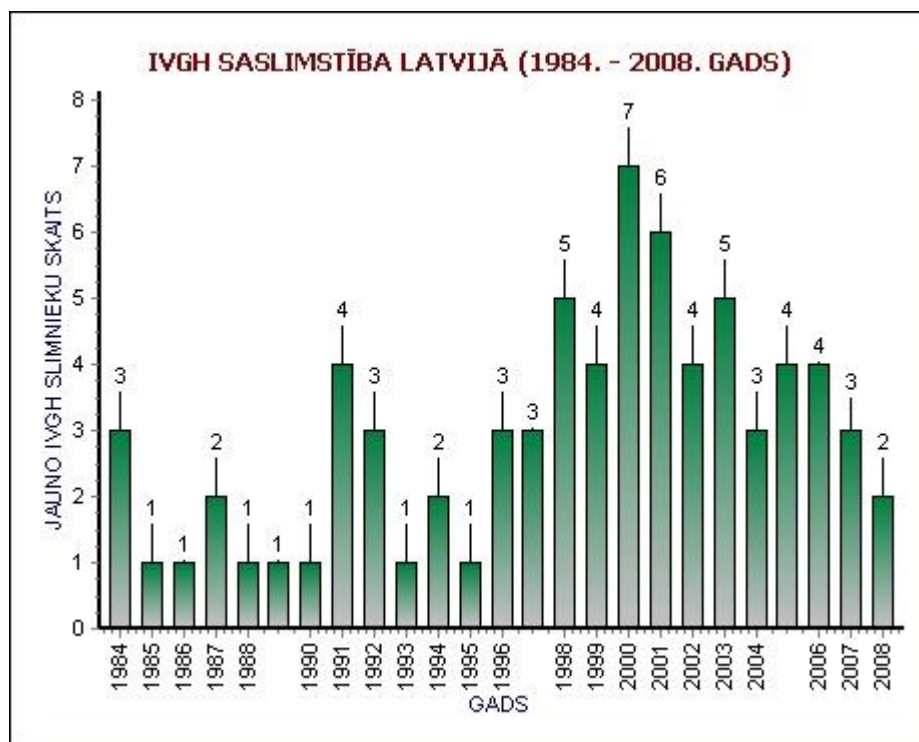
5. Rezultāti

5.1. Epidemioloģiskās izpētes atradne

Vērojama tendence jauno IVGH slimnieku skaitam pēdējos gados palielināties. Proti - ja izpētē iekļautos pirmajos 5 gados (no 1984.-1988.) jauno IVGH slimnieku skaits vidēji ir 1.6 gadā, nākamajos 5 gados (1989.-1993.) - 2 gadā, laikā no 1994. līdz 1998. gadam - 2.8 gadā, tad izpētes laika pēdējos gados (resp. 1999.-2008.) ir atklāti vidēji 5 jauni IVGH slimnieki gadā (skat. Attēlu 4).

Attēls 4.

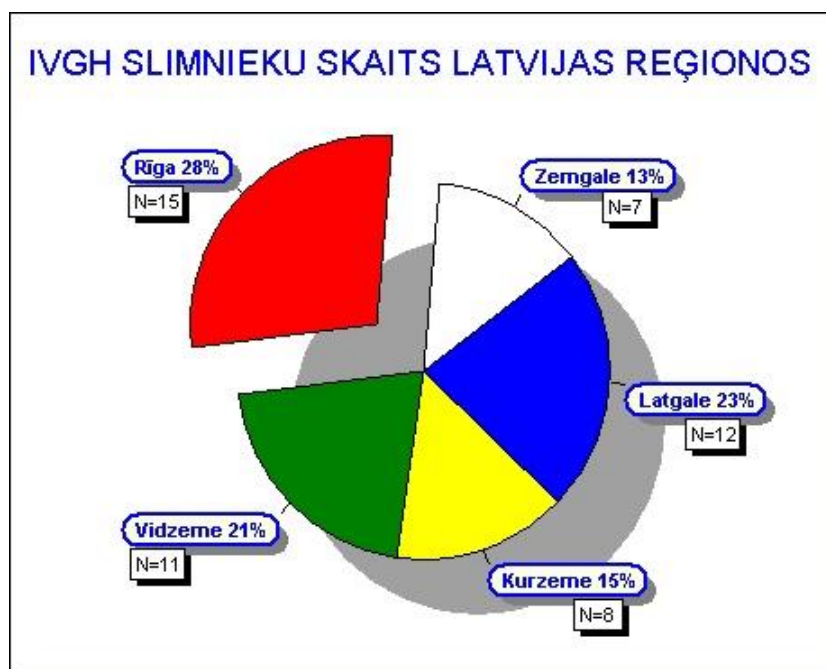
Saslimstība ar IVGH Latvijā (1984. - 2002.)



Gandrīz trešdaļa pētījumā iekļauto IVGH slimnieku dzīvo Rīgā. Tā kā šeit uzskaitīts absolūtais slimnieku skaits, nevis ņemta slimnieku skaita attiecība uz iedzīvotāju skaitu, tad rezultāts ir skaidrojams ar to, ka Rīgā dzīvo gandrīz puse Latvijas iedzīvotāju.

Savukārt, Latvijas austrumu daļā (Vidzeme un Latgale) dzīvojošo IVGH slimnieku skaits ievērojami pārsniedz Latvijas dienvidu (Zemgale) un rietumu daļā (Kurzeme) dzīvojošo skaitu.

IVGH slimnieku skaits Latvijas reģionos.



Redzams, ka no Latvijas administratīvām vienībām vairāk IVGH slimnieku dzīvo lielajās pilsētās - Rīgā, Daugavpilī, Liepājā, Jūrmalā, Valmierā un Jelgavā, bet mazāk - Latvijas dienvidu un rietumu rajonos (skat. Attēlu 5).

Tendence jauno IVGH slimnieku skaitam pēdējā laikā pieaugt attiecināma arī uz jaunajiem IVGH klasiskā tipa sālszaudes formas slimniekiem. Respektīvi - ja novērojumu perioda sākumā šo slimnieku skaits bija vidēji 1 gadā, tad pēdējos gados tas ir aptuveni 3 gadā.

5.2. Klīniskā materiāla izvērtējums

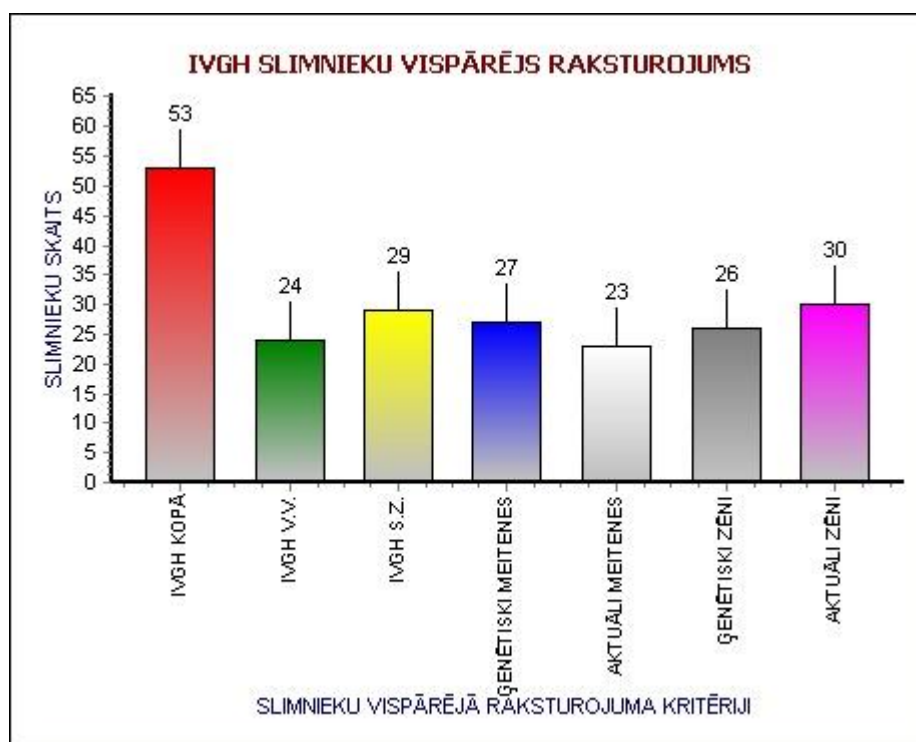
5.2.1. Slimnieku kontingenta struktūra

Slimnieku kontingenta struktūra rāda, ka slimnieku grupas pēc ģenētiskā dzimuma ir gandrīz vienādā skaitā un ka sālszaudes formas slimnieku ir vairāk nekā vienkārši virilizējošās formas slimnieku.

Attēls 6 demonstrē vienu IVGH galvenajām problēmām - izteiktu meitenes virilizāciju, kuras dēļ dzimšanas laikā tiek kļūdaini noteikts dzimums. Respektīvi - 4 no izpētē iekļautajiem zēniem patiesībā izrādījās izteikti virilizētas meitenes ar nepareizi noteiktu dzimumu dzemdību laikā.

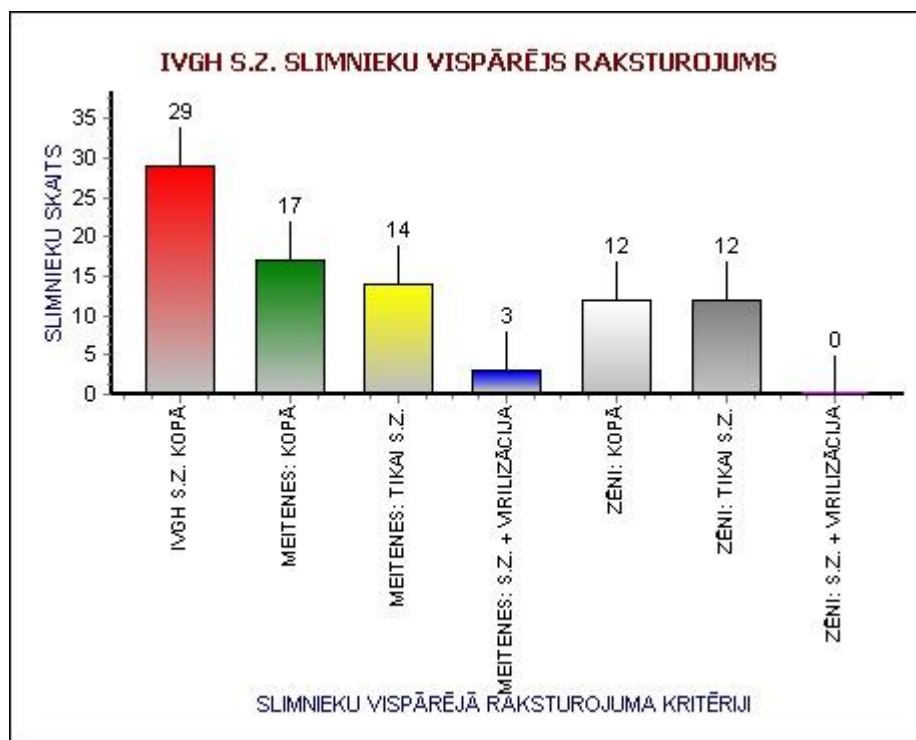
Attēls 6.

IVGH slimnieku vispārējs raksturojums.



Attēls 7.

IVGH sālszaudes formas slimnieku raksturojums.



Starp izpētē iekļautajiem IVGH sālszaudes slimniekiem vairāk ir meitenes. Iegūtie rezultāti, kā redzams Attēlā 7, liecina, ka izteikta virilizācija nav šīs formas vadošais simptoms.

Savukārt, IVGH vienkārši virilizējošās formas slimnieku grupā prevalē zēni (ko ir grūti izskaidrot, jo virilizāciju zēniem konstatēt var vienīgi tās ļoti izteiktos gadījumos).

4 ģenētiska dzimuma meitenes, kurām izteiktas virilizācijas dēļ piedzimstot tika noteikts nepareizs dzimums, slimo ar IVGH vienkārši virilizējošo formu.

Attēls 8 demonstrē, ka virilizācija ir IVGH vienkārši virilizējošās formas vadošais simptoms.

Virilizācijas pakāpes pēc *Prader* III - V rada problēmas ar meitenes pareiza dzimuma noteikšanu dzemdību nodaļā. Biežāk šāda kļūda rodas tādēļ, ka nepalpējot ārējos dzimumorgānus un nekonstatējot testis iztrūkumu, tiek noteikts fenotipiskais dzimums - zēns, kas neatbilst ģenētiskajam dzimumam - meitene.

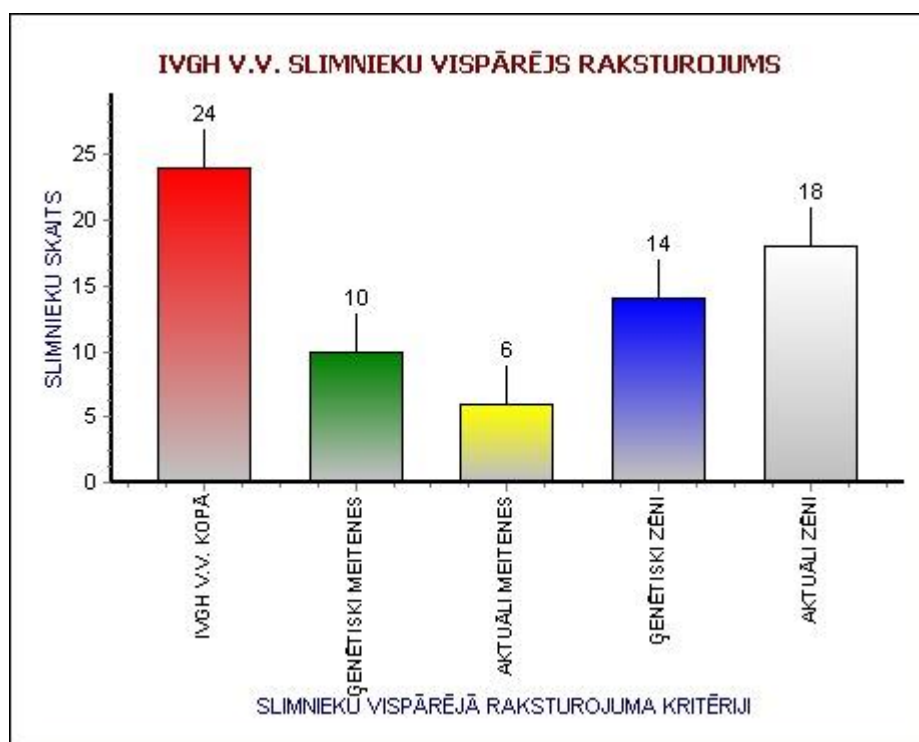
5.2.2. Pacientu raksturojums pēc dzimšanas parametriem, saistībā ar IVGH diagnosticēšanas vecumu

IVGH sālszaudes forma 20% slimnieku tiek diagnosticēta dzīves pirmajās 2 nedēļās, ap 40% slimnieku - 1. mēneša laikā, vēl ap 30% - 2. mēnesī, bet, sasniedzot 3 mēnešu vecumu, diagnoze ir tikusi uzstādīta visiem šīs grupas slimniekiem (skat. Attēlu 9).

Savukārt, IVGH vienkārši virilizējošā forma slimniekiem straujāk ir tikusi diagnosticēta dzīves pirmo 6 mēnešu un pirmo 2 gadu laikā (skat. Attēlu 10). To nosaka pamanīta virilizācija. Otrs aktīvākas diagnostikas pacēlums ir bijis ap pubertātes sākuma laiku. To, savukārt, nosaka bieži pāragra pubertātes sākšanās zēniem vai tās aizkavēšanās meitenēm.

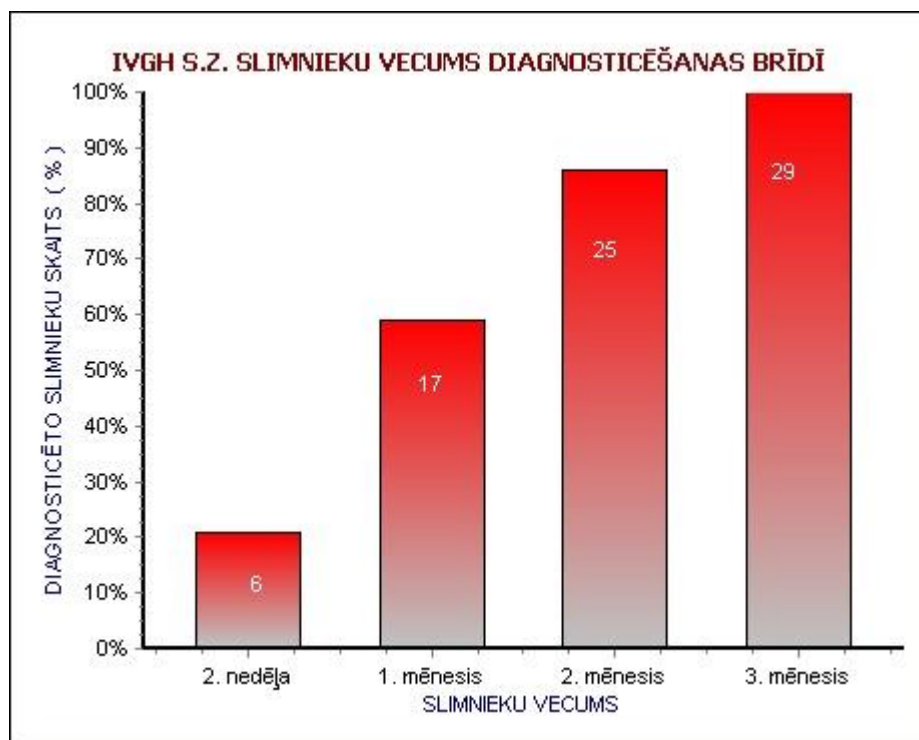
Attēls 8.

IVGH vienkāršās virilizējošās formas slimnieku raksturojums.



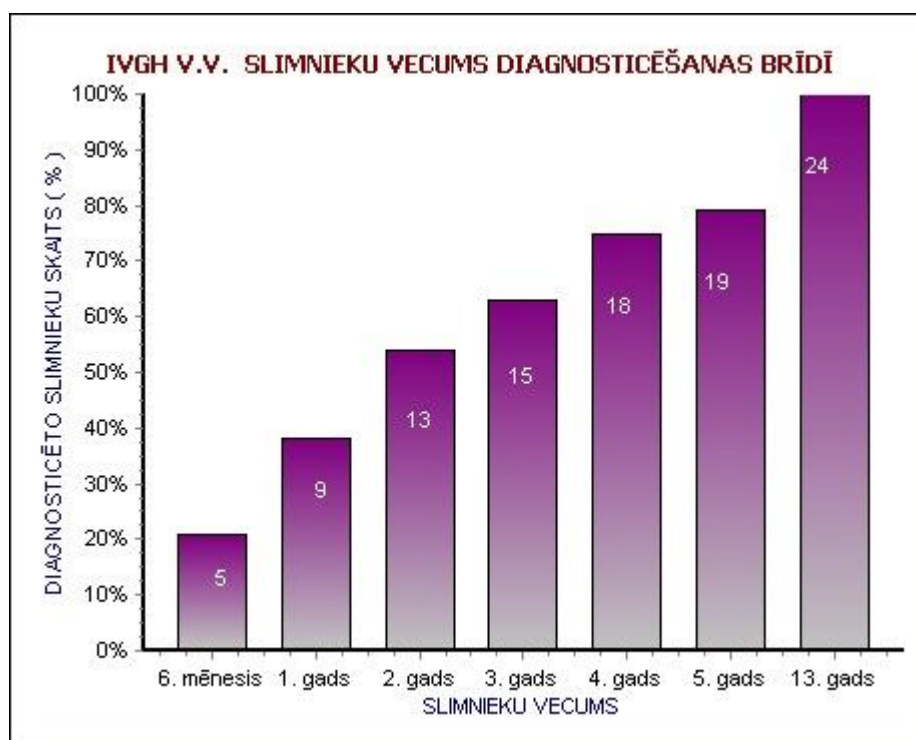
Attēls 9.

IVGH diagnosticēšanas vecums sālszaudes formas slimniekiem.



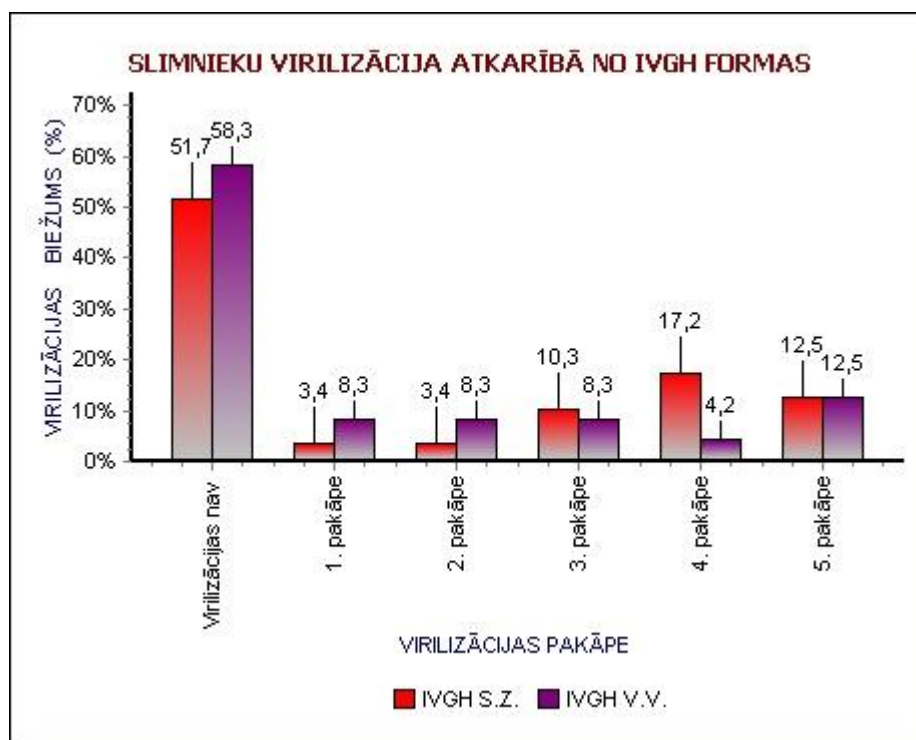
Attēls 10.

IVGH diagnosticēšanas vecums vienkāršās virilizējošās formas slimniekiem.



Attēls 11.

IVGH slimnieku virilizācijas pakāpe atkarībā no slimības formas.



5.2.3. Pacientu raksturojums pēc virilizācijas pakāpes

No visiem 53 pētījumā iekļautajiem IVGH slimniekiem, virilizāciju novēroja 24, t.i., 45,3%. Trešdaļai pētījumā iekļauto IVGH slimnieku ir tikusi konstatēta izteikta virilizācija (III pakāpe pēc *Prader* un augstāk). Tajā pat laikā, vairāk kā pusei slimnieku virilizācija nav konstatēta. Pirmkārtām tas attiecas uz zēniem, kam virilizāciju var pamanīt tikai ļoti izteiktos gadījumos. Papildus tam, kā redzams Attēlā 10, nesamērīgi zems šķiet vieglas virilizācijas biežums. Iespējams, ka viegla virilizācija šiem slimniekiem ir tikusi uzskatīta par normu. Tātad - lielāko IVGH slimnieku daļu bez virilizācijas veido zēni un virilizācijas hipodiagnostika.

IVGH vienkārši virilizējošās formas slimniekiem līdzīgi sastopamas visas virilizācijas pakāpes, kamēr sālszaudes formas slimniekiem vieglas pakāpes virilizācija sastopama retāk, bet izteiktākas pakāpes virilizācija - biežāk.

IVGH sālszaudes formas gadījumā konstatētā smagā virilizācija jāsaista ar 21-hidroksilāzes pilnīgu deficītu, kas izraisa augstu hiperandrogēniju jau intrauterīnā periodā un nosaka dzimumdiferenciācijas traucējumu rašanos, kuru novēršanai var būt nepieciešama ķirurģiska terapija.

Kopumā veiktas 35 genitāliju plastiskās operācijas. 11 pacientiem veiktas genitāliju divetapu ķirurģiskās korekcijas. 4 gadījumos fenotipiskais dzimums netbilst ģenētiskajam.

Visbiežāk ir bijis nepieciešams veikt klitora korekciju tā palielinājuma dēļ.

Vaginas plastika bijusi nepieciešama, galvenokārt, uroģenitālā sīnusa likvidēšanai.

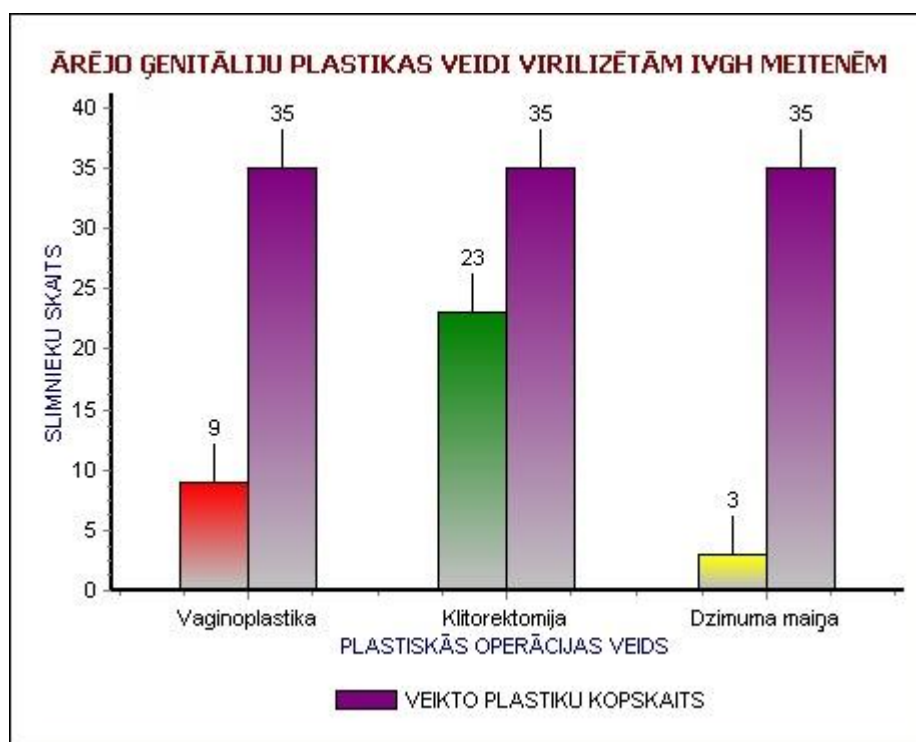
3 gadījumos veikti kompleksi pasākumi dzimuma maiņai.

Ģenētiskā dzimuma maiņa (grūta medicīniska, juridiska un psihosociāla problēma) notikusi 3 gadījumos, t.i. 10% no kopējo operāciju skaita (95% CI 3.5 - 25.6%)

Vaginas plastika IVGH slimniecēm izteiktas virilizācijas dēļ veikta dzīves pirmo divu gadu laikā, klitora korekcija - līdz 4 gadu vecumam, bet dzimuma maiņa izdarīta 8 - 10 gadu vecumā (skat. Attēlu 12 un Attēlu 13).

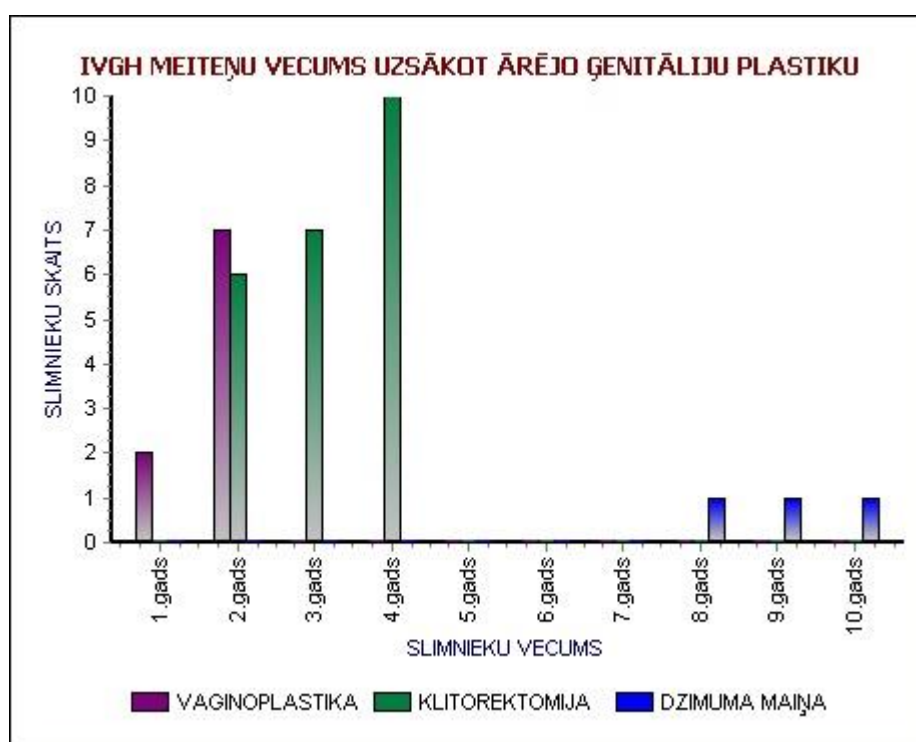
Attēls 12.

Ķirurģiskās plastikas veidi virilizētām IVGH meitenēm.



Attēls 13.

Ķirurģiskās plastikas veikšanas vecums.



5.3. Klīniskā materiāla molekulāri ģenētiskā analīze

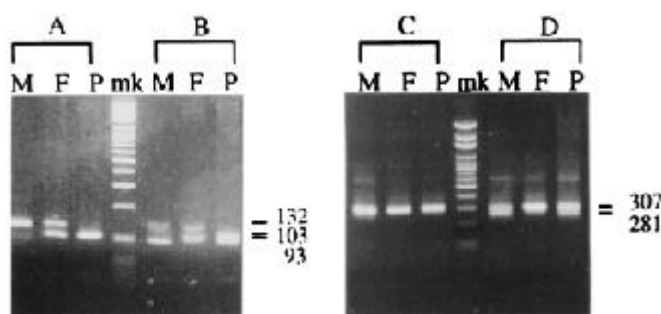
5.3.1. CYP21A2 gēna amplifikācija ar PCR metodi

Darba gaitā no pacientu asinīm tika izdalīta hromosomālā DNS, tad tika veikta *CYP21A2* gēna amplifikācija ar *PCR* metodi, sekvenēts *CYP21A2* gēns un analizēti sekvenēšanas rezultāti.

Attēlā 14 atainots izpētē veiktās *CYP21P/CYP21* gēna analīzes piemērs. A,B - *CYP21P/CYP21* molekulas analīze pēc sekundārā *PCR* produkta (132-bp) - amplifikācija, izmantojot *SacI* restrikcijas enzīmu. C,D - “izmēru - atšķirīgā” *PCR* produktu analīze, amplificējot ar miksētiem praimeriem B1/2HP/IN3R. Praimeri B1/IN3R un 2HP/IN3R sekundārā *PCR* amplifikācijā aktivē 307- un 281-bp fragmentus. Primārā *PCR* amplifikācija ar praimeriem BF1/21BR analizēta A un B. Primārā *PCR* amplifikācija ar miksētiem praimeriem BF1/AF1/21BR analizēta C un D. Kolonna “mk” - 100-bp molekulārais marķieris.

Attēls 14.

CYP 21P/CYP21 gēnu analīze pēc sekundārā *PCR* produkta (ar viena veida praimeriem).



5.3.2. CYP21A2 gēna sekvenēšana un iegūtie rezultāti

Mutāciju atklāšanai, kuras nevar noteikt ar *PCR* metodiku, izmantota sekvenēšana.

Tika sekvenēti visi 10 gēna *CYP21A2* eksoni, jo tas nav garš (tikai 3336bp). Rezultāti 1, 2, 3 eksonā bija pārlicinoši, jo izdevās precīzi nosekvenēt 847bp (P1+P48) *PCR* fragmentu, tomēr kvalitāte sekvencēm, kas iegūtas sekvenējot 2508bp (P55+P4) *PCR* fragmentu diemžēl bija neapmierinoša.

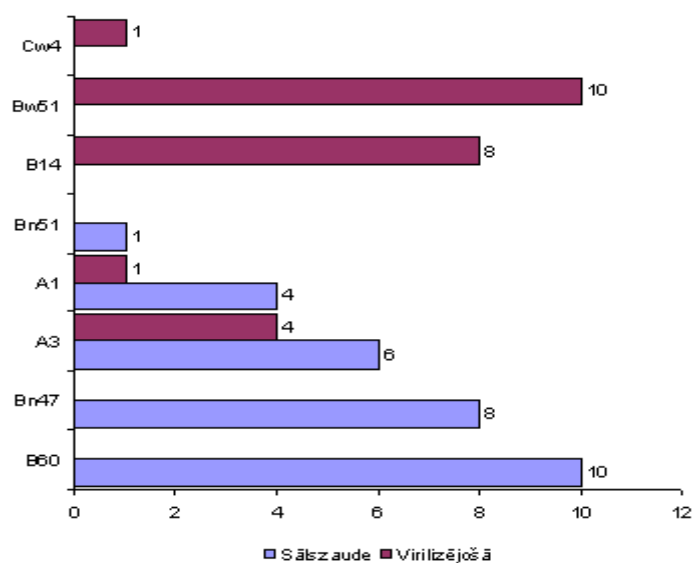
Pilnīgai gēna *CYP21A2* sekvenēšanas taktikas izstrādei būtu nepieciešams mainīt *PCR* stratēģiju *CYP21A2* gēna eksonu 4-10 amplifikācijai, ņemot vērā *CYP21A2P* pseidogēna eksistenci.

5.3.3. HLA lokusu atradne IVGH pacientiem

Izpētes atradne liecina par HLA lokusu A1, Bn47 un B60 saistību ar IVGH sālszaudes formas attīstību, bet HLA lokusi B14 un Bw51, savukārt, saistās ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību. HLA lokuss A3 ir saistīts gan ar IVGH sālszaudes, gan vienkārši virilizējošās formas attīstību (skat. Attēlu 15 un Attēlu 16).

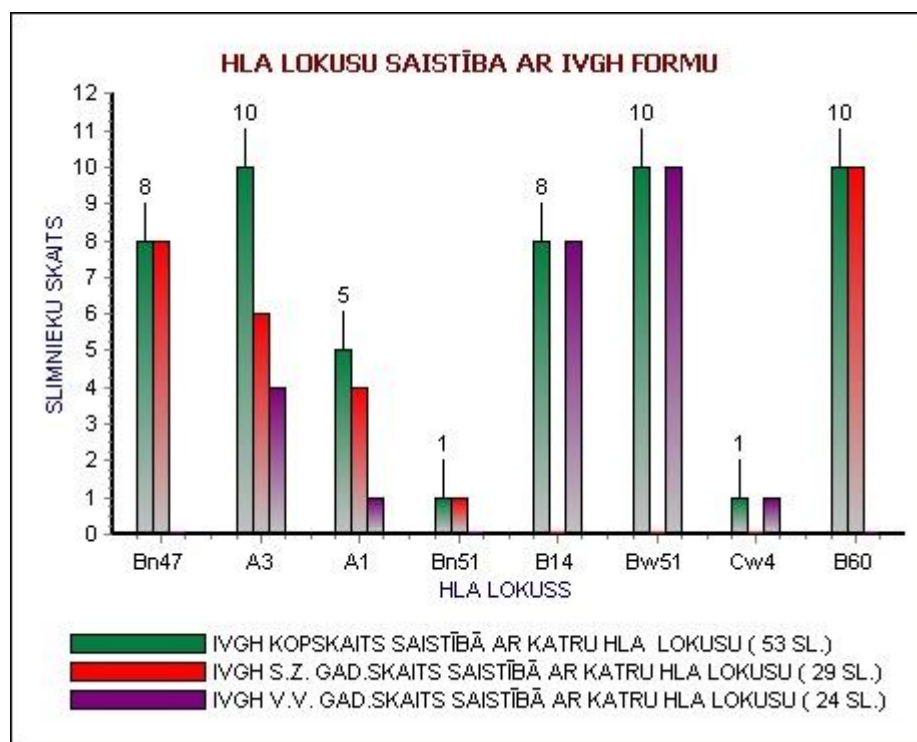
Attēls 15.

IVGH pacientu HLA lokusu atradnes saistība ar SZ un VV formām.



Attēls 16.

HLA lokusu saistība ar noteiktas slimības formas attīstību.

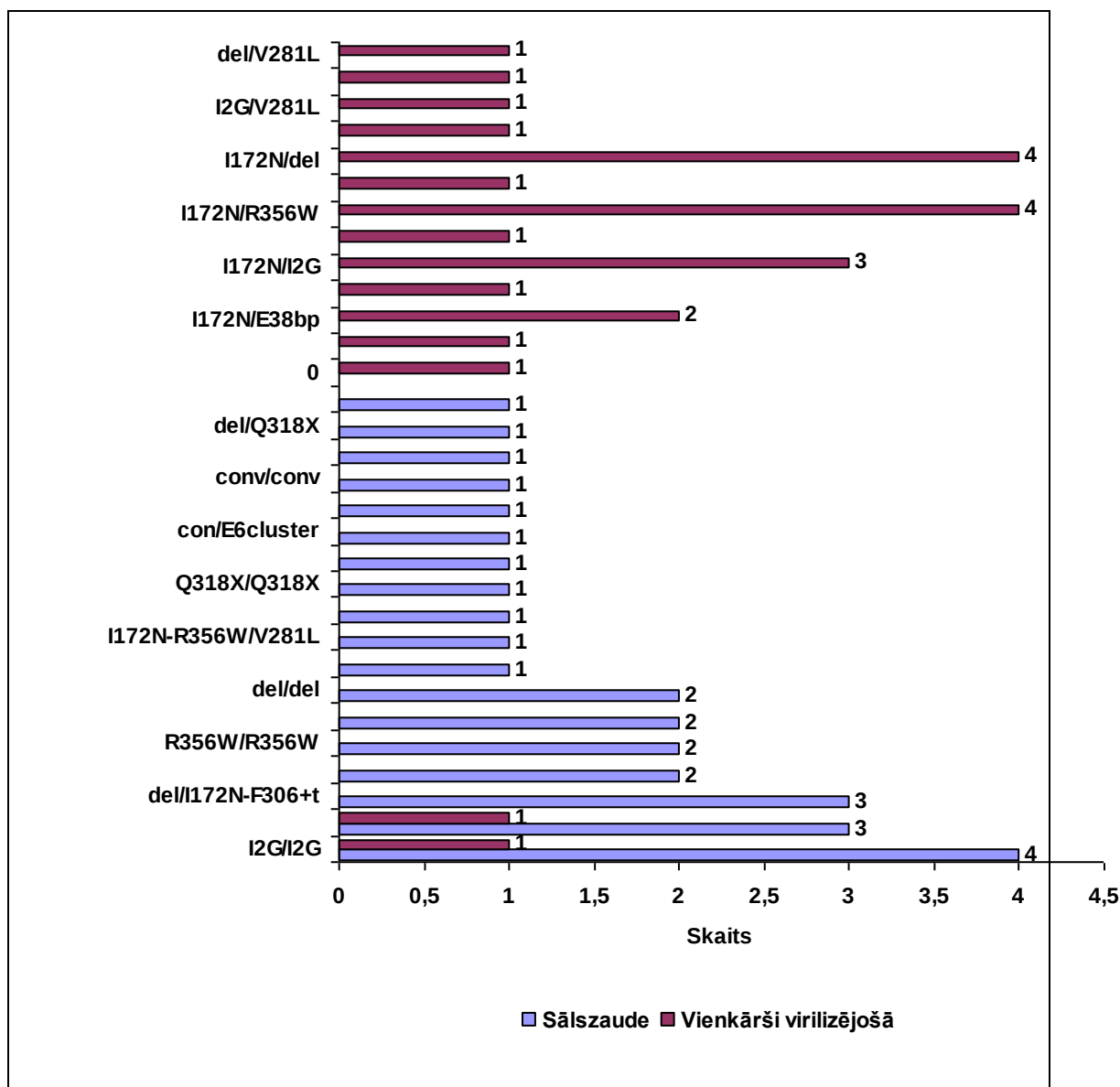


Saskaņā ar izpētē iegūtajiem datiem - HLA lokusi Bn47, A1 un B60 saistās ar IVGH sālszaudes formas attīstību, bet HLA lokusi B14 un Bw51 - ar vienkārši virilizējošās formas attīstību.

5.3.4. Atrasto CYP21 gēna mutāciju raksturojums IVGH pacientiem

Attēls 17.

IVGH pacientiem konstatēto CYP21 gēna mutāciju kopsavilkums.



Izpētē iekļautajiem IVGH slimniekiem visvairāk atrastas CYP21 gēna 12G/12G mutācijas intronā 2, kā arī - ar Ile172Asn un 8-bp delēciju eksonā 3 (skat. IVGH pacientiem konstatēto CYP21 gēna mutāciju kopsavilkums).

CYP21 gēna 12G/12G mutācijas intronā 2 un citas ar 12G saistītas mutācijas (12G/del, 12G/E38bp, 12G/R356W) izteikti saistās ar IVGH sālszaudes formas attīstību gan zēniem, gan arī – meitenēm.

CYP21 gēna ar Ile172Asn saistītās mutācijas (I172N/del, I172N/E38bp, I172N/12G I172N/R356W) izteikti saistās ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību; vairāk zēniem nekā meitenēm.

Savukārt, CYP21 gēna ar Val281Leu saistītās un Pro30Leu CYP21 gēna mutācijas pārliecinoši saistās ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību.

No izpētē iekļautajiem IVGH pacientiem 12G/V281L mutācija atrasta meitenei, bet del/V281L un P30L mutācijas - zēniem.

CYP21 gēna del/I172N-F306+t mutācija saistās ar virilizāciju pie IVGH sālszaudes formas.

12G/del, 12G12G un 12G/R356W mutācijas saistās ar virilizāciju gan pie IVGH sālszaudes, gan vienkārši virilizējošās formas. Savukārt, CYP21 gēna I172N/del, I172N/R356W un I172N/E38bp mutācijas saistās ar virilizāciju pie IVGH vienkārši virilizējošās formas. CYP21 gēna del/V281L un del/P30L mutācijas pēc pētījumā iegūtajiem datiem nesaistās ar izteiktu virilizāciju pie IVGH vienkārši virilizējošās formas.

5.3.5. Piecu gadu laikā veiktā pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitas dinamiskās novērošanas analīze

Līdz 2009.gadam veikta visu 53 pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitas dinamiskā novērošana. Ambulatoro vizīšu vidējais biežums pirmajā dzīves gadā - 3 ± 1 (rekomendēts - 4), bet pēc 1 gada vecuma - 2 ± 1 (rekomendēts - 3).

Novērojuma periodā pacienti, kuri dzimuši no 1984. līdz 1991.gadam sasnieguši 18 gadu vecumu un tie ir 14 (8 pacienti ar sālszaudes formu un 6 pacienti ar vienkārši virilizējošo formu). Pārējie 39 pacienti (21 - sālszaudes formas un 18 vienkārši virilizējošās formas) - augšanas procesā. 2 pacientiem ar sālszaudes formu - *exitus letalis*.

Pacienti, kuri novērošanas laikā 18 gadus veci, sasnieguši sekojošu fināla augumu:

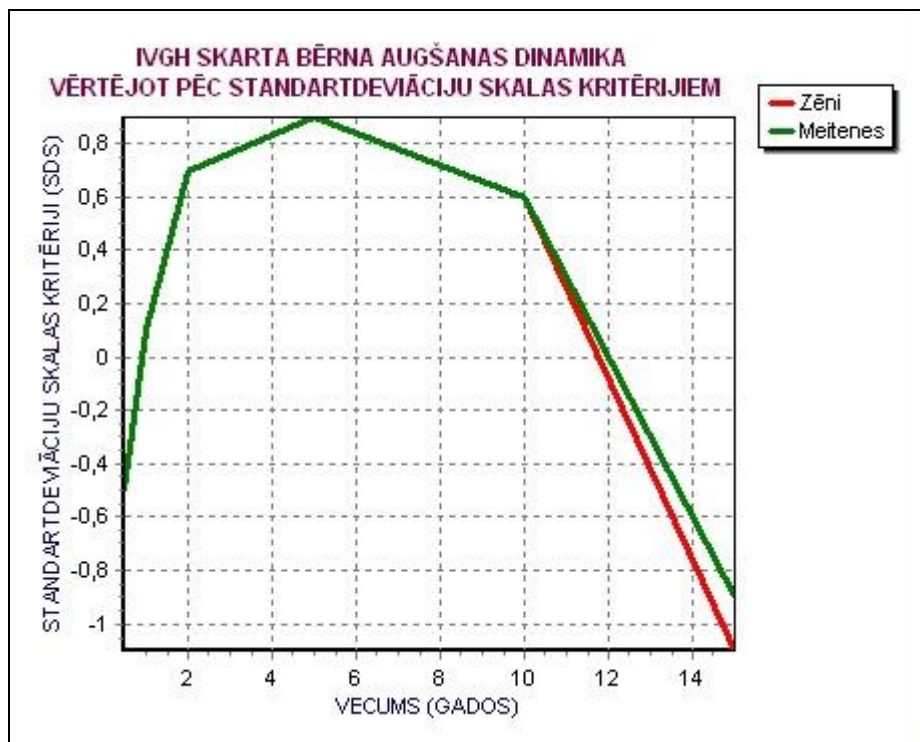
- 1.9 $\pm$ 0.4 SDS meitenes (no tām - 1.7 $\pm$ 0.4 SDS patientes ar sālszaudes formu un - 2.0 $\pm$ 0.4 SDS patientes ar vienkārši virilizējošo formu),
- 1.7 $\pm$ 0.3 SDS zēni (no tiem - 1.5 $\pm$ 0.2 SDS pacienti ar sālszaudes formu un - 1.9 $\pm$ 0.2 SDS pacienti ar vienkārši virilizējošo formu).

Analizējot šo 14 pacientu gēnu mutāciju analīžu rezultātus, konstatēts, ka sālszaudes forma saistās ar I2G/I2G, 8-bp delēciju eksonā 3 mutācijām, bet vienkārši virilizējošā forma - Pro30Leu, Val281Leu, Ile172Asn mutācijām.

39 pacientu augšanas dinamiskā analīzē tika konstatēta sekojoša augšanas dinamika atkarībā no bērna vecuma:

- līdz 6 mēnešu vecumam - - 0.5 $\pm$ 0.3 SDS
- no 6 m.v. līdz 1 gada vecumam - 0.1 $\pm$ 0.2 SDS
- no 1 g.v. līdz 2 gadu vecumam - 0.7 $\pm$ 0.4 SDS
- no 2 g.v. līdz 5 gadu vecumam - 0.9 $\pm$ 0.3 SDS
- no 5 g.v. līdz 10 gadu vecumam - 0.6 $\pm$ 0.4 SDS
- no 10 g.v. līdz 15 gadu vecumam zēniem - - 1.1 $\pm$ 0.5 SDS, meitenēm - - 0.9 $\pm$ 0.4 SDS (skat.attēlu 18).

IVGH bērnu augšanas dinamika, vērtējot pēc SDS kritērijiem.



Pubertātes sākuma vecums meitenēm ($n = 16$) konstatēts 10.1 ± 0.6 gadi, zēniem ($n = 20$) konstatēts 9.2 ± 0.5 gadi. Menarche vecums ($n = 12$) 13.4 ± 0.4 gadi.

IVGH diagnosticēšanas brīdī tika analizēts elektrolītu līmenis asinīs un iegūti sekojoši rezultāti:

- Na 125 – 134 mmol/l konstatēts 35 pacientiem, t.i. 66 %,
- Na zem 125 mmol/l konstatēts 13 pacientiem – 24.5%,
- K līmenis 5 – 7 mmol/l – 21 pacientam, t.i. 39.6%,
- K līmenis virs 7 mmol/l – 29 pacientiem – 54.7%.

29 pacientiem dokumentēti akūtas virsnieru mazspējas jeb sālszaudes klīniskie simptomi.

17 α OHPg līmenis asinīs kā IVGH diagnostiskais kritērijs izmantots 45 pacientiem, t.i. 85% pacientu. 8 pacientiem diagnosticēšanas brīdī noteikts 17 – ketosteroīdu līmenis urīnā. 17 α OHPg līmenis diagnosticēšanas brīdī svārstās no 15.9 ng/ml līdz 200.7 ng/ml, vidēji – 40.08 ng/ml ($n = 45$, $p < 0.05$).

17 α OHPg līmeņa svārstības pacientu novērošanas laikā atklātas sekojošas – no 0.3 ng/ml līdz 121.4 ng/ml, vidēji – 24.716 ng/ml ($n = 1060$, $p < 0.05$). Vecuma grupā no 10 līdz 15 gadiem 17 α OHPg vidējais rādītājs – 45.76 ng/ml ($n = 486$, $p < 0.05$). Netika konstatēta statistiski ticama atšķirība rādītājos starp abām IVGH formām.

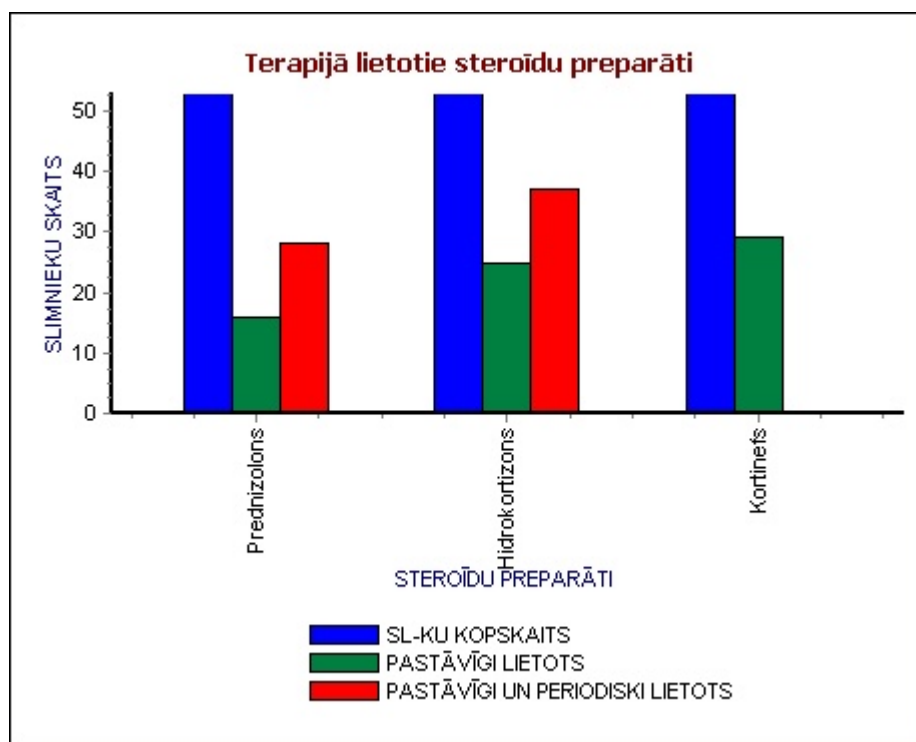
Veikta visu 53 pacientu terapijas analīze (skat.attēlu 19):

- neatkarīgi no IVGH formas, visi pacienti saņēmuši glikokortikoīdu preparātus trīs reizes dienā:
 - o 16 pacienti – 30.2% pastāvīgi un 12 pacienti periodiski lietojuši Prednisaloni sekojošās devās, neatkarīgi no slimības formas:

- līdz 1 gada vecumam $3.4 \pm 1.2 \text{ mg/m}^2$,
- no 1 gada līdz 10 gadu vecumam – $6.2 \pm 1.3 \text{ mg/m}^2$,
- no 10 līdz 18 gadu vecumam – $7.9 \pm 1.2 \text{ mg/m}^2$.
- 25 pacienti – 47.2% pastāvīgi un 12 pacienti periodiski lietojuši Hydrocortisoni sekojošās devās:
 - sālszaudes formas gadījumā – līdz 6 mēnešu vecumam – $23.4 \pm 1.9 \text{ mg/m}^2$, no 6 m.v. līdz 1 gadam – $19.2 \pm 2.1 \text{ mg/m}^2$, no 1 gada līdz 10 gadu vecumam – $17.4 \pm 1.5 \text{ mg/m}^2$, no 10 līdz 18 gadu vecumam – $20.5 \pm 1.4 \text{ mg/m}^2$,
 - vienkārši virilizējošās formas gadījumā - līdz 1 gada vecumam – $18.4 \pm 2.3 \text{ mg/m}^2$, no 1 gada līdz 10 gadu vecumam – $13.8 \pm 1.3 \text{ mg/m}^2$, no 10 līdz 18 gadu vecumam – $24.8 \pm 1.3 \text{ mg/m}^2$.
- 29 sālszaudes formas pacienti saņēmuši mineralokortikoīdus - 9α fludrocortisoni reizi dienā sekojošās devās:
 - līdz 3 mēnešu vecumam – 150 μg/m^2 , no 3 mēnešu līdz 1 gada vecumam – 100 μg/m^2 , no 1 gada līdz 2 gadu vecumam – $50 - 100 \text{ μg/m}^2$, pēc 2 gadu vecuma – 50 μg/m^2 .
- visi 29 sālszaudes formas pacienti līdz 1 gada vecumam lietojuši papildus 1 – 2 g/dienā NaCl.

Attēls 19.

IVGH terapijā lietotie steroīdu preparāti.



Smagas IVGH komplikācijas dokumentētas 15 reizes 12 pacientiem – 22.6%, visiem ar sālszaudes formu un sekojošām gēnu mutācijām – I2G/I2G, I2G/R356W, I2G/del, Q318X/R356W, R356W/R356W. 2 gadījumos – 1.06% *exitus letalis*, abi zēni – 8 mēnešu vecumā smaga pneumonija, otrs 2 gadu vecumā – meningokokcēmija. 3 pacientiem novērotas akūtas virsnieru mazspējas krīzes divas reizes. 100% visas akūtās virsnieru mazspējas novērotas akūtu slimību laikā, 10

gadījumos gastrointestinālu infekciju dēļ. Hipoglikēmija novērota 9 gadījumos – 7.8% vecumā no 8 mēnešiem līdz 3 gadiem, sālszaudes krīze ar hiponatriēmiju konstatēta vecuma grupā no 1.8 līdz 4.6 gadu vecumam.

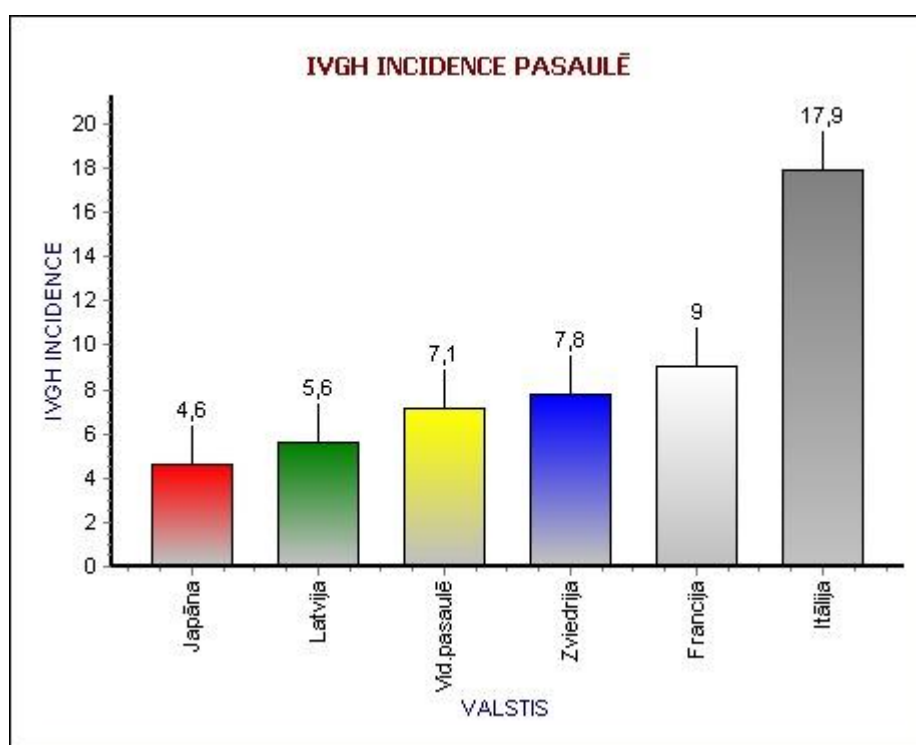
6. Diskusija

Epidemioloģiskie dati

Uzsākot iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas izpēti, vispirms šķita svarīgi izvērtēt šīs iedzimtās metabolās slimības izplatību Latvijā un salīdzināt to ar līdzīgas izpētes datiem kaimiņvalstīs un pasaulē (skat. Attēlu 20). Šāds datu salīdzinājums liecina, ka IVGH saslimstība Latvijā ir vidēji par 5000 zemāka nekā Ziemeļeiropas valstīs [15, 58]. Respektīvi, Latvijā uz 17795 jaundzimušiem ir viens IVGH slimnieks, kamēr Zviedrijā šis rādītājs ir 1:12578 [13], bet pasaulē vidēji - 1:14000 [2, 3]. Tomēr analizējot pētījumā iegūtos datus kopumā, jāsecina, ka Latvijā ir IVGH hipodiagnostika un IVGH slimnieku skaits mūsu valstī varētu būt lielāks.

Attēls 14.

IVGH incidence pasaulē.



Lai gan izpētē iekļauto slimnieku skaits nav liels, zināmu ieskatu par IVGH izplatību mūsu valstī iegūtie dati sniedz un var kalpot kā pamats diskusijai par IVGH neonatāla skrīninga nepieciešamību arī Latvijā.

Izpētes gaitā noskaidrojās, ka trešdaļa pētījumā iekļauto IVGH slimnieku dzīvo Rīgā. Tā kā tika uzskaitīts absolūtais slimnieku skaits, nevis ņemta slimnieku skaita attiecība uz iedzīvotāju skaitu, tad šāds rezultāts ir skaidrojams ar to, ka Rīgā dzīvo gandrīz puse Latvijas iedzīvotāju. Savukārt, Latvijas austrumu daļā (Vidzemē un

Latgalē) dzīvojošo IVGH slimnieku skaits ievērojami pārsniedz Latvijas dienvidu (Zemgalē) un rietumu daļā (Kurzemē) dzīvojošo slimnieku skaitu.

Iegūtie dati liecina, ka IVGH slimnieki ārpus Rīgas koncentrējas, galvenokārt, lielajās pilsētās - Daugavpilī, Liepājā, Jūrmalā, Valmierā un Jelgavā, bet mazāk - Latvijas dienvidu un rietumu rajonos. Iespējams, ka lauku apvidos daļa IVGH slimnieku paliek neatklāti, jo, ja vien tā nav sālszaudes forma, ikdienā šī slimība dzīvību neapdraud. Tajā pat laikā, pie izteikta stresa, infekcijām, traumām vai tamlīdzīgās situācijās IVGH slimniekam var attīstīties akūta virsnieru garozas nepietiekamība jeb adrenāla krīze, kura ir dzīvību apdraudoša. Īpaši tas attiecas uz bērnu vecuma pacientiem ar šo patoloģiju un ir saprotams, kādēļ klīniskie pediatri visā pasaulē pievērš IVGH problēmai pieaugošu uzmanību. Respektīvi - jautājums, kas patreiz tiek uzdots un bērnu endokrinologu vidē diskutēts ir: "Cik dzīvību spēj izglābt prenatalā IVGH diagnostika vai neonatāls IVGH skrīnings?" [208, 209]. Pasaulē līdz šim pāri par 6.5 miljoniem jaundzimušo veikts skrīnings uz IVGH [82]. Daudzās valstīs tas jau kļuvis par klīnisku rutīnu [33] un šis izpētes darbs ir solis, lai aktualizētu šādu nepieciešamību arī Latvijā.

Izvērtējot pētījumā noskaidrotos datus par IVGH saslimstību Latvijā var konstatēt, ka vērojama tendence jauno IVGH slimnieku skaitam pēdējos gados palielināties. Proti - ja izpētē iekļautajos pirmajos 5 gados (no 1984.-1988.) jauno IVGH slimnieku skaits vidēji ir 1.6 gadā, nākamajos 5 gados (1989.-1993.) - 2 gadā, laikā no 1994. līdz 1998. gadam - 2.8 gadā, tad izpētes laika pēdējos 4 gados (1999.-2002.) ir atklāti vidēji 5 jauni IVGH slimnieki gadā. Minētais vienlīdz attiecas gan uz IVGH sālszaudes, gan uz vienkārši virilizējošo formu. Zinot, ka vienkārši virili-zējošās formas izplatība ir lielāka nekā sālszaudes formas izplatība, pētījumā iegūtie dati, visticamāk, neatspoguļo reālo IVGH vienkārši virilizējošās formas slimnieku skaitu Latvijā (tam būtu jābūt ievērojami lielākam salīdzinoši ar sālszaudes slimnieku skaitu). Iemesls tam varētu būt salīdzinoši vieglā šīs formas klīniskā gaita, kas, atšķirībā no sālszaudes formas, nespiež griezties pie ārsta.

Klīniskie dati

Pētījumā iekļauto IVGH slimnieku grupu veido 30 zēni un 23 meitenes; no šiem zēniem 4 ir ģenētiskas meitenes ar izteiktu virilizāciju; tāpat - izpētes gaitā apsekoti ir 26 zēni un 27 meitenes, kas liecina, ka IVGH attīstībā nav novērota dzimuma atšķirība - šis novērojums sakrīt ar literatūras datiem [210, 215].

IVGH sālszaudes forma konstatēta 55% gadījumu, bet vienkārši virilizējošā forma - 45% gadījumu. Abu IVGH formu biežumam ir dzimuma difference - sālszaudes forma diagnosticēta 40% zēnu un 74% meiteņu, bet vienkārši virilizējošā forma - 60% zēnu un 26% meiteņu. Iespējams, ka šie dati atspoguļo vispārzināmo klīnisko problēmu, proti - IVGH hipodiagnostiku zēniem, jo virilizācijas pazīmes jaundzimušiem / zīdaiņu vecuma zēniem parasti nav pamanāmas.

Izvērtējot šos pētījuma datus, rodas pārliecība, ka nepieciešama papildus izglītojoša informācija adresēta vecākiem, bērniem un arī ārstiem par IVGH vienkārši virilizējošo formu un tās izraisītām problēmām, jo Latvijā, neapšaubāmi, ir daudz vairāk ar to slimojošu meiteņu, nekā pētījumā atklājas.

IVGH sālszaudes forma 20% slimnieku tikusi diagnosticēta dzīves pirmajās 2 nedēļās, ap 40% slimnieku - 1. mēneša laikā, vēl ap 30% - 2. mēnesī, bet, sasniedzot 3 mēnešu vecumu, diagnoze ir tikusi noteikta visiem šīs grupas slimniekiem.

IVGH vienkārši virilizējošā forma slimniekiem straujāk ir tikusi diagnosticēta dzīves pirmo 6 mēnešu un pirmo 2 gadu laikā. To nosaka pamanīta virilizācija. Otrs

aktīvākas diagnostikas pacēlums ir bijis ap pubertātes sākuma laiku. To, savukārt, nosaka bieži pāragra pubertātes sākšanās zēniem vai tās aizkavēšanās meitenēm.

Vienkārši virilizējošās formas vidējais diagnosticēšanas vecums - 39 nedēļas (9.7 mēneši), bet sālszaudes formas - 1.4 mēneši. Kopumā IVGH vidējais diagnosticēšanas vecums Latvijā ir 5.2 mēneši, kamēr Eiropā šāda diagnostika parasti tiek veikta līdz 3 mēnešu vecumam.

Attiecībā uz virilizācijas klīnisko manifestāciju pastāv zināma tās klīnisko pazīmju polari-zācija. No vienas puses - vairumam apsekoto slimnieku (t.i., 54.7% visu IVGH slimnieku vai atsevišķi - 51.7% sālszaudes formas un 58.3% vienkārši virilizējošās formas slimnieku) IVGH diagnosticēšanas laikā virilizācijas pazīmes nav konstatētas. Iespējams, ka virilizācijas pazīmēm nav tikusi pievērsta vajadzīgā uzmanība. No otras puses - izteikta (III - V pakāpes) virilizācija ir atrasta 40% sālszaudes formas slimnieku un 25% vienkārši virilizējošās formas slimnieku. Iespējams, ka arī šie dati atspoguļo reizēm sastopamu klīnisku praksi - respektīvi, mazāk izteiktas virilizācijas pazīmes nepamana.

Līdzīgi kā attiecībā uz IVGH formu biežumu, arī attiecībā uz virilizācijas biežumu pētījuma rezultātos vērojama lielas dzimuma atšķirības. Respektīvi - 86% zēnu un 13% meiteņu IVGH diagnosticēšanas laikā virilizācija nav konstatēta, bet III - V pakāpes virilizācija meitenēm atrasta 77% gadījumu, kamēr zēniem tā nav tikusi konstatēta vispār.

Tā kā virilizācija meitenēm ir viens no vadošajiem IVGH simptomiem, tad pētījuma gaitā tika analizēta nepieciešamība veikt genitoplastisku korekciju. Izrādījās, ka pētījumā iekļautajām IVGH slimniecēm kopā veiktas 35 genitoplastiskas operācijas. Visbiežāk, t.i., 23 gadījumos ir bijis nepieciešams veikt klitora korekciju tā palielinājuma dēļ. Vaginas plastika tikusi veikta 9 gadījumos - galvenokārt, urogenitālā sīnusa likvidēšanai. Ģenētiskā dzimuma maiņa (grūta medicīniska, juridiska un psihosociāla problēma) notikusi 3 gadījumos, t.i. 10% no kopējo operāciju skaita (95% CI 3.5 - 25.6%).

Vaginas plastika IVGH slimniecēm izteiktas virilizācijas dēļ veikta dzīves pirmo divu gadu laikā, klitora korekcija – līdz 4 gadu vecumam, bet dzimuma maiņa izdarīta 8 - 10 gadu vecumā.

Laboratorie dati (imunoģenētiskā un molekulāri ģenētiskā atradne)

Vienā no pētījuma laboratorā darba daļām iekļauto slimnieku materiālā noteikta IVGH un tās klīnisko formu saistība ar noteiktiem HLA lokusiem. Konstatēts, ka ar IVGH attīstību visvairāk saistās HLA lokusi A3, B60 un Bw51 (18.9% gadījumu katrs), kā arī lokusi B14 un Bn47 (15% gadījumu katrs). Izvērtējot minēto HLA lokusu iespējamo saistību ar kādas noteiktas IVGH klīnis-kās formas attīstību, rodas iespaids, ka izpētes atradne liecina par HLA lokusu A1, Bn47 un B60 iespējamo saistību ar IVGH sālszaudes formas attīstību, bet HLA lokusi B14 un Bw51, savukārt, uzrāda zināmu saistību ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību. HLA lokuss A3 varētu būt saistīts ar IVGH abu šo klīnisko formu attīstību. Varbūtēju saistību ar IVGH vienkārši virilizējošo formu nevar izslēgt arī lokusam Cw4.

Otrā no pētījuma laboratorā darba daļām iekļauto slimnieku materiālā noteiktas CYP21 gēna mutācijas. Iegūtie rezultāti liecina, ka apsekoto IVGH slimnieku grupai (kurā ir pārstāvēti visi Latvijas reģioni) dominējošas ir sekojošas CYP21 gēna mutācijas:

8-bp delēcijas eksonā 3 un 12G/12G mutācijas intronā 2, kuras izraisa IVGH sālszaudes formas attīstību un

Pro30Leu, Val281Leu kā arī Ile172Asn mutācijas, kuras, savukārt, izraisa IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību; bez tam, zināms, ka Pro30Leu saistās ar mērenu prenatalu klitora hipertrofiju, Val281Leu - ar neklasisko IVGH formu, bet Ile172Asn - ar izteiktu prenatalu virilizāciju bez sāls zaudes.

Šie novērojumi sakrīt ar literatūras datiem par *CYP21* gēna dominējošām mutācijām Eiropā [13, 15, 92, 93] un par genotipa / fenotipa korelāciju IVGH slimniekiem.

Centrāleiropā (Austrijā, Čehijā, Ungārijā, Slovākijā, Slovēnijā) prevalē Pro453Ser, 8bpdel kā arī punktveida mutācijas intronā 2 [20,85,208].

Ziemeļeiropas reģionā (Zviedrijā, Somijā, Dānijā) prevalē Pro453Ser, 8bpdel un Val281Leu mutācijas [17,155].

Dienvideiropā (Spānijā, Itālijā) prevalē 8bpdel un Val281Leu mutācijas (18,19), bet Rietumeiropā (Vācijā, Francijā, Lielbritānijā) - bez minētajām vēl bieži sastop punktveida mutācijas intronā 2 [73,87,133].

Piecu gadu laikā veiktā pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitas dinamiska novērošana

Aktīvā dinamiskā 5 gadu pacientu novērošanas laikā konstatēta saistība starp klīniski laboratoro parametru, komplikāciju smagumu un ģenētisko mutāciju raksturu – gan elektrolītu izteikts disbalanss, gan ievērojami paaugstinātais 17α OHPg līmenis, gan akūtas virsnieru mazspējas krīzes attīstība kā komplikācija novērota IVGH pacientiem ar sālszaudes formu un tai raksturīgajām gēnu mutācijām - I2G/I2G, I2G/R356W, I2G/del, Q318X/R356W, R356W/R356W, kas atbilst rezultātiem Eiropas valstīs veiktajos pētījumos [13, 15, 02, 93].

Datu analīzi un kopēju secinājumu izdarīšanu apgrūtināja vairāki apstākļi – no 1989. līdz 1992.gadam nebija pieejama 17α OHPg līmeņa noteikšana, Hydrocortisoni kļuva pieejams Latvijā tikai ap 1993.gadu, taču ar pārtraukumiem piegādē un ilgstoši netika iekļauts kompensējamo zāļu sarakstā, līdz ar to pacientiem radās problēmas nodrošināt pastāvīgu nepārtrauktu ārstēšanu ar vienu preparātu.

Pacientu līdzestība ārstēšanas un slimības novērošanas procesā nepietiekama, par ko liecina retāko kontroles vizīšu skaits nekā rekomendēts.

Analizējot augšanas procesu var konstatēt, ka augums pieaugušā vecumā jeb fināla augums ievērojami zemāks par vidējo statistisko normu abu formu IVGH pacientiem, bet tomēr vairāk izteikti vienkārši virilizējošās formas pacientiem, kas jāsaista ar vēlīnāku diagnostiku, ilgstošu hiperandrogēnijas ietekmi uz epifizārām kaulu augšanas zonām un agrīnu kaulu augšanas zonu slēgšanos.

Pētot augšanas dinamiku, novērojamas sekojošas tendences – pirmajā dzīves gadā augšanas temps nedaudz atpaliek, vēlāk līdz 10 gadu vecumam augšanas temps neatšķiras abu dzimumu un IVGH formu pacientiem un tas ir vidēji 0.5 ± 0.3 SDS virs vidējās populācijas, pubertātes vecumā augums sāk atpalikt no populācijas vidējā - zēnu augums atpaliek vairāk nekā meitenēm (zēniem - 1.1 ± 0.5 SDS, meitenēm - 0.9 ± 0.4 SDS).

Mazs augums pieaugušā vecumā – viena no nopietnām problēmām IVGH ārstēšanas laikā. Klīniskos novērojumos un pētījumos tiek meklēts šīs problēmas risinājums, kombinējot terapiju, vienlaicīgi reducējot glikokortikoīdu devas, lietojot Somatropīnu un GnRH agonistus, antiandrogēnus, aromotāzes inhibitorus vai

pielietojot abpusēju adrenalektomiju pacientiem ar ļoti grūti kompensējamu IVGH gaitu [239].

Pubertātes sākuma vecums zēniem ātrāks nekā meitenēm un tas nozīmē, ka zēniem to var uzskatīt kā agrīnu pubertāti, kas saistās ar vienkārši virilizējošās formas vēlinu diagnostiku.

17 α OHPg līmeni asinīs uzskata par vienu no IVGH kompensācijas kritērijiem. Pacientu novērošanas laikā vidējie 17 α OHPg līmeņi pārsniedz kompensācijas pieļaujamo robežu – 1.0 – 10.0 ng/ml [239, 241], galvenokārt paaugstinoties pubertātes vecumā, tātad jāsecina, ka pubertātes laikā grūti panākt labu slimības kompensāciju, ko jāsaista ar gonādu androgēnu fizioloģisku sekrēciju šajā vecumā. Vēl viens faktors, kas ietekmē slimības kompensāciju – pacienta līdzestība ārstēšanā.

Glikokortikoīdu devas no 1 līdz 10 gadu vecumam lielākas sālszaudes formas gadījumā, kas jāsaista ar lielāku hipoglikēmijas un dekompensācijas risku agrīnā vecumā, bet pubertātes vecumā devas lielākas nepieciešamas vienkārši virilizējošās formas pacientiem, kas jāsaista ar priekšlaicīgu pubertāti, gonādu androgēnu sekrēciju un kortizola farmakokinētikas izmaiņām pubertātes vecumā, palielinoties tā klīrensam [238].

Sakarā ar palielināto sālszaudes risku agrīnā periodā līdz 2 gadu vecumam, mineralokortikoīdu devas lielākās līdz 3 mēnešu vecumam, pēc tam pakāpeniski samazinās.

Akūta virsnieru mazspēja kā komplikācija attīstījusies agrīnajā riska vecumā uz citu smagu akūtu slimību fona, kā galvenais simptoms novērojams hipoglikēmija. Smagas komplikācijas ar letālu iznākumu attīstījušās, savlaicīgi nepalielinot glikokortikoīdu devas mājas apstākļos un novēloti uzsākot parenterālu glikokortikoīdu ievadi, ko ietekmēja nepietiekama vecāku apmācība kritiskās situācijās un bērna stāvokļa smaguma nenovērtējums. Salīdzinot ar literatūras datiem, kur aprakstīta letalitāte sālszaudes formas pacientiem 4.6% un 9% pacientu smagas hipoglikēmijas [240], pētījuma pacientu dinamiskās novērošanas laikā konstatēta ievērojami mazāka letalitāte – 1.06%, kā arī retākas hipoglikēmijas – 7.8%.

Agrīna IVGH diagnostika, savlaicīga un optimāla medikamentozā un ķirurģiska ārstēšana, vecāku kvalitatīva atkārtota apmācība, regulāra dinamiska novērošana, adekvāta pacienta līdzestība palīdz nodrošināt slimības labu kompensāciju, novērst akūtās komplikācijas, nodrošināt pacientam labu augšanas tempu, saglabājot fertilitāti un uzlabojot dzīves kvalitāti.

Praktiski apsvērumi

1. Pastāv dažādas DNS diagnostikas metodes mutāciju noteikšanai, kas savā starpā atšķiras ar metodes precizitāti, dārdzību un pieejamību aparatūras dēļ. Zināmas mutācijas ir iespējams noteikt, izmantojot restrikcijas polimorfisma analīzi, genotipēšanas metodes. Jaunu mutāciju atrašanai piemērotāka ir sekvenēšana vai vienpavediena polimorfisma analīze. Izstrādāta metode *CYP21* gēna sekvenēšanai, bet nepieciešams turpināt darbu pie *CYP21* eksonu sekvenēšanas izstrādes pielietojuma rutīnas diagnostikā.

2. Pilna gēna sekvenēšana ir dārga metode pielietojumam rutīnas diagnostikā, tomēr ar tās palīdzību iespējams atrast reti izplatītas un nezināmas mutācijas, izņemot lielās delēcijas un inversijas, kuras ne vienmēr ir detektējamās sekvenējot. Rutīnas diagnostikas vajadzībām būtu nepieciešams pielietot lētāku metodi, kas detektētu biežāk izplatītās mutācijas, kā piemēram - genotipēšanu.

3. Ja atrasts, ka abas mutācijas ir heterozigotā stāvoklī, tad 21-hidroksilāzes deficīta diagnozes apstiprināšanai nepieciešams pierādīt, ka šīs mutācijas atrodas katra savā allēlē. To varētu pierādīt, analizējot bērna vecāku DNS paraugus. Ja šīs mutācijas nebūs atrastas tikai vienam no vecākiem, tad varēs uzskatīt, ka tās ir novietotas dažādās allēlēs un ir par cēloni IVGH.

4. IVGH sālszaudes formas klātbūtni vajadzētu izslēgt visiem jaundzimušajiem [208, 209, 216, 91] ar:

- izmainītām ārējām ģenitālijām (ieskaitot to izteiktu hiperpigmentāciju un/vai kriptorhismu vizuāli zēniem) vai neskaidru jaundzimušā dzimumu,
- izteiktiem ēšanas traucējumiem, atkārtotu vemšanu, svara zudumu, dehidratāciju,
- bronho-pulmonālās displāzijas, apsverot IVGH iespējamību arī pie citu veidu elpošanas nepietiekamības neonatālā periodā,
- septicēmijas klīnisko ainu bez atrodama infekcioza iemesla,
- virsnieru garozas nepietiekamības laboratoro atradni (pirmkārt - hiperkaliēmijas un hiponatriēmijas “šķērēm” rutīnas bioķīmiskajos izmeklējumos).

5. Izpētes dati par diagnosticēšanas vecumu pārliecinoši norāda, ka IVGH diagnostika Latvijā ir aptuveni 5,2 mēnešu vecumā, kamēr Eiropā vidēji tā ir līdz 3 mēnešu vecumam. Rodas pamatots iespaids, ka šādas vēlīnas diagnostikas iemesls ir IVGH hipodiagnostika. Pie tam, tā neattiecas tikai uz IVGH diagnostiku zēniem (kas ir zināma problēma pediatrikajā praksē visā pasaulē, jo virilizāciju zēniem var pamanīt tikai ļoti izteiktos gadījumos), bet arī uz meitenēm ar vieglākām virilizācijas pazīmēm. Tas, savukārt, iezīmē turpmāk darāmo - plašākas un dziļākas informācijas izstrādi, paredzētu bērniem, vecākiem un arī ārstiem, par IVGH, tās izpausmēm un iespējamām veselības problēmām gan bērnu vecumā, gan arī vēlākajos šo slimnieku dzīves posmos.

6. Uz ESPE un *Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society* kopīgi izstrādāto rekomendāciju [214] pamata pasaules pediatrikajā praksē plaši ieviesti attiecīgi IVGH diagnostiskie algoritmi [33,219]. Latvijas apstākļiem adaptēti, šādi algoritmi:

‘Iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija, kas manifestējas jaundzimušo periodā’ (skat. Attēlu 2) un

‘Iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija, kas manifestējas pēc jaundzimušo periodā’ (skat. Attēlu 3).

Šie algoritmi tiek lietoti arī BKUS endokrinoloģijas centrā kā ikdienas rutīna, ir izmantoti šajā izpētes darbā un var tikt ieteikti lietošanai jebkura līmeņa pediatriškai praksei Valstī.

7. Secinājumi

1. HLA lokusu izpētes laboratorā atradne liecina par:

- HLA lokusu A1, Bn47 un B60 saistību ar IVGH sālszaudes formas attīstību,
- HLA lokusu B14 un Bw51 saistību ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību,
- HLA lokusa A3 saistību ar IVGH sālszaudes un vienkārši virilizējošās formas attīstību,
- HLA lokusa Cw4 varbūtēju saistību ar IVGH vienkārši virilizējošo formu.

2. IVGH attīstības HLA tipi Latvijā būtiski neatšķiras no tādiem Eiropā [11,13,91,92].
3. *CYP21* gēna mutāciju izpētes laboratorā atradne liecina, ka Latvijā dominē sekojošas *CYP21* gēna mutācijas:
 - 8-bp delēcijas eksonā 3 un 12G/12G mutācijas intronā 2, kuras izraisa IVGH sālszaudes formas attīstību,
 - Pro30Leu, Val281Leu un Ile172Asn mutācijas, kuras izraisa IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību.
4. *CYP21* gēna dominējošo mutāciju spektrs IVGH pacientiem Latvijā neatšķiras no Eiropas valstīs konstatētajiem [11,13,91,92].
5. Pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitas piecu gadu perioda līdz 2009.gadam dinamiskās novērošanas analīze liecina par: saistību starp klīniski laboratoro parametru, komplikāciju smagumu un ģenētisko mutāciju raksturu; augums pieaugušā vecumā jeb fināla augums ievērojami zemāks par vidējo statistisko normu abu formu IVGH pacientiem, bet tomēr vairāk izteikti vienkārši virilizējošās formas pacientiem; agrīnu pubertātes attīstību zēniem; sliktu IVGH kompensāciju pubertātes laikā; glikokortikoīdu un mineralokortikoīdu devu atkarību no bērna vecuma un IVGH formas.
6. Pētījuma pacientu dinamiskās novērošanas laikā konstatēta ievērojami mazāka letalitāte – 1.06%, kā arī retākas hipoglikēmijas – 7.8%, salīdzinot ar literatūras datiem.

Darba aprobācija

Darba aprobācija veikta RSU Pediatrijas katedras, Latvijas Endokrinologu asociācijas un Latvijas Pediatru endokrinologu asociācijas kopējā sēdē 2009.gada 4.martā.

Promocijas darbu atspoguļošās publikācijas

1. I. Dzīvīte. Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas raksturojums Latvijā 1. konference “Bērnu un pusaudžu ginekoloģijas medicīniskie un sociālie aspekti Latvijā un Austrumeiropā”. Tēzes, 4-5, 1996. X, Vaivari
2. I. Dzīvīte. Adrenogenitālais sindroms. Latvijas Ārsts 10, 24 – 27, 1996.
3. I. Dzīvīte. Review of Latvian patients with CAH. Hormone Research 48 (suppl 2), 856-857, 1997.
4. LBPEC uzskaitē esošo iedzimta AGS slimnieku dažu klīnisko un laboratoro datu analīze. Trešā Pasaules Latviešu Ārstu kongresa tēzes, 6, 1997.
5. I. Dzīvīte. 21-hidroksilāzes deficīta molekulārie mehānismi un tā klīniskās un terapeitiskās sekas. Latvijas Ārstu Žurnāls 11, 15 – 19, 1999.
6. I. Dzīvīte. Iedzimta adrenogenitālā sindroma neklasiskās formas daži praktiski aspekti. Aktualitātes diabetoloģijā un endokrinoloģijā 4, 8 – 10, 2002
7. I. Auziņa, I. Dzīvīte, I. Steinberga. Slimnieks ar iedzimtu virsnieru garozas hiperplāziju jeb sievišķo pseidohermafroditismu. Latvijas Ķirurģijas Žurnāls (Acta Chirurgica Latviensis) 83 – 85, 2002, Nr 2
8. I. Dzīvīte, D. Gardovska. Genotipa – fenotipa korelācijas starp 22 21-hidroksilāzes deficīta pacientiem. ZA Raksti / RSU, 134 – 137, 2002
9. I. Dzīvīte. Dzimundiferenciācijas traucējumi nav kazuistika. Jums kolēģi, 12 – 16, 2003, Nr 1
10. I. Dzīvīte. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Proceedings of Latvian Academy of Sciences. Vol 58 2004, Nr 2, 31 – 38.
11. I. Dzīvīte-Krišāne. 21-hidroksilāzes deficīta molekulārie mehānismi, imūnģenētiskais raksturojums, to klīniskās un terapeitiskās sekas bērniem Latvijā. RSU 2010.gada Zinātniskā konference. Tēzes, 133 lpp.
12. I. Dzīvīte-Krišāne. Molecular mechanisms, immunogenetic characteristics, clinical and therapeutical consequences of the 21-hydroxylase deficiency in the Latvian children. Proceedings of Latvian Academy of Sciences. 2010 (pieņemts publikācijai 2010.gada aprīlī LZA Vēstu 5/6 numurā).
13. I. Dzīvīte-Krišāne. Molecular mechanisms, immunogenetic characteristics, clinical and therapeutical consequences of the 21-hydroxylase deficiency in the Latvian children. Hormone Research in Paediatrics 74(suppl 3), 167, 2010 (abstract).

Ziņojumi par darba rezultātiem

1. Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas raksturojums Latvijā. 1. konference “Bērnu un pusaudžu ginekoloģijas medicīniskie un sociālie aspekti Latvijā un Austrumeiropā”. 1996.gada 28.oktobris, Vaivari.
2. Characteristic of CAH patients. ESPE Winter School, 1997.gada janvāris, Lezno, Polija.

3. LBPEC uzskaitē esošo iedzimta AGS slimnieku dažu klīnisko un laboratoro datu analīze. Trešais Pasaules Latviešu Ārstu kongress, 1997.gada 20.jūnijs, Rīga.
4. Review of Latvian patients with CAH. European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) / Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) 5th Joint Meeting. 1997.gada 4.jūnijs, Stokholma, Zviedrija. (stenda referāts).
5. Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas raksturojums bērniem Latvijā. AML BS konference, 1999.gada decembris, Rīga.
6. Molecular genetic characteristics of Latvian CAH patients. Zviedrijas Endokrinologu asociācijas kongress, 2001.gada 15.oktobris, Gēteborga, Zviedrija.
7. Immunogenetic analysis of CAH patients in Latvia. Amsterdams Brīvēs Universitātes Pediatrijas klīnikas konference, 2002.gada 10.aprīlis, Amsterdamā, Nīderlande.
8. Iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija. Latvijas Endokrinologu asociācijas konference, 2002.gada novembris, Rīga.
9. 21-hidroksilāzes deficīta molekulārie mehānismi un to klīniskās sekas bērniem Latvijā. Baltijas bērnu endokrinologu konference, 2005.gada 3.maijs, Vaivari.
10. 21-hidroksilāzes deficīta klīniskā sekas Latvijā. Pediātru Endokrinologu asociācijas konference, 2006.gada 26.septembris, Kauņa, Lietuva.
11. CAH as a cause of short stature. Eiropas Endokrinologu Asociācijas 3.Pēcdiploma izglītības kursi klīniskajā endokrinoloģijā 2007.gada 24.martā Ohridā, Maķedonija.
12. I.Dzīvīte-Krišāne. 21-hidroksilāzes deficīta molekulārie mehānismi, imūnģenētiskais raksturojums, to klīniskās un terapeitiskās sekas bērniem Latvijā. RSU 2010.gada Zinātniskā konference. 2010.gada 19.martā. Stenda referāts.
13. I.Dzīvīte-Krišāne. Molecular mechanisms, immunogenetic characteristics, clinical and therapeutic consequences of the 21-hydroxylase deficiency in the Latvian children. European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE). 2010.gada 22.-25.septembris, Prāga, Čehija. (stenda referāts).

Pateicības

Mans vislielākais un vismīļākais paldies maniem vecākiem – Tālivaldim Ciekurzim un Vizmai Dzīvītei, manam dzīvesdraugam un meitiņām. Bez viņu mīlestības, ticības manam mērķim, manām idejām, atbalsta un ikdienas soļa atvieglošanas šis darbs nevarētu tapt.

Visvairāk gribu pateikties darba vadītājai profesorei Dacei Gardovskai par sniegtajām idejām, uzmundrinājumu, sirsnību, pacietību un atbalstu un zinātniskajam konsultantam Edvīnam Miklaševičam par atsaucību, vērtīgajiem padomiem un veselīgo kritiku.

Liels paldies maniem skolotājiem bērnu endokrinoloģijas grūtajā disciplīnā – Mārai Ārentei, profesoram Martin Ritzen Stokholmas Karolinskas institūtā, pie kura man bija tas gods un laime apgūt zināšanas ilgu laiku un kurš visiem spēkiem centās palīdzēt man darba eksperimentālās daļas tapšanā, kā arī profesorei Henriette Delemarre van de Waal Amsterdamā.

Savus pateicības vārdus sūtu saviem atbalstītājiem un padomdevējiem Stokholmā – profesoram Martin Ritzen, profesorei Anna Wedel, Svetlanai Lajic, profesoram Olle Soder un docentiem Mikaelam Holstam un Larsam Hagenas.

Paldies manām kolēģēm Inārai Kirillovai, Unai Laugai, visām nodaļas kolēģēm par drauga plecu, mierinājumu, atbalstu, idejām, domām, koleģialitāti un pacietību visā garajā darba tapšanas laikā. Paldies māsiņām par lielo darbu, jo bez viņu atsaucības, pacietības, čakluma un entuziasma zinātniskā darba praktiskā daļa nebūtu iespējama.

Vēlos pateikties profesoram Uldim Teibem par lielo palīdzību pareizā ceļa meklēšanā sarežģītajā statistikas labirintā.

Paldies visiem bērniem un vecākiem, kuri piedalījās pētījumā.

Nobeigumā paldies par finansiālu atbalstu Zviedrijas Institūtam un Eiropas Pediātru Endokrinologu Asociācijai.

Atsauces

1. Crecchio D. Sopra un caro di apparenzi virili in una donna. Morgagni 1865;7:154-188
2. Wilkins L., Levis R. and Rosenberg E. The suppression of androgen secretion by cortizone in a case of congenital adrenal hyperplasia. Bull Johns Hap 1950;86:249-252
3. White Perrin C. and Speiser Phyllis W. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. Endocrine Review 2000;21:245-291
4. Speiser Phyllis W. Congenital Adrenal Hyperplasia Owing to 21-Hydroxylase Deficiency. Endocrinology and Metabolism Clinics North America 2001;1:31-59
5. Migeon Claude J. and Wisniewski Amy B. Congenital Adrenal Hyperplasia Owing to 21-Hydroxylase Deficiency. Endocrinology and Metabolism Clinics North America 2001;1:193-205
6. New Maria I. Prenatal Treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia. Endocrinology and Metabolism Clinics North America 2001;1:1-13
7. Merke Deborah P. and Cutler Gordon B. New Ideas for Medical Treament of Congenital Adrenal Hyperplasia. Endocrinology and Metabolism Clinics North America 2001;1:121-135
8. Chin Daisy, Speiser Phyllis W., Imperato-McGinley Julianne et al. Study of a Kindred with Classic Congenital Adrenal Hyperplasia: Diagnostic Challenge due to Phenotypic Variance. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:1940-1945
9. Acerini Carlo L., Hughes Ieuan A. 21-Hydroxylase Deficiency Defects and Their Phenotype. In: Adrenal Disease in Childhood. Clinical and Molecular Aspects. Endocr. Dev. Basel, Karger, 2000, vol 2, pp 93-111
10. Speiser Phyllis W., Knochenhauer Eric S, Dewailly Didier et al. A multicenter Study of Women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia: Relationship between Genotype and Phenotype. Molecular Genetics and Metabolism 2000;71:527-534
11. Rumsby G, Averyt CJ, Conway GS and Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparision to the classical forms. Clinical Endocrinology 1998;48:707-711
12. Charmandari E, Lichtarowicz-Krynska EJ, Hindmarsh PC. et al. Congenital adrenal hyperplasia: management during critical illness. Arch Dis Child 2001;85:26-28
13. Jaaskelainen J. and Voutilainen R. Long-term outcome of classical 21-hydroxylase deficiency: diagnosis, complications and quality of life. Acta Paediatr 2000;89:183-187
14. Moran Carlos, Azziz Ricardo, Carmina Enrico et al. 21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: A multicenter study. Am J Obstet Gynecol 2000;183:1468-1474
15. Wedell A. Molecular genetics of Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. Acta Paediatr 1998;87:159-164
16. Higashi Yujiro, Hiromasa Takako, Tanae Ayako et al. Effects of Individual Mutations in the P-450 (C21) Pseudogene on the P-450 (C21) Activity and Their Distribution in the Patient Genomes of Congenital Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. J Biochem 1991;109:638-644
17. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. J Clin Endocrinol Metab 1994;78:1145-1152
18. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, et al. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. Hum Genet 1995;96:198-204
19. Dracopoulou-Vabuoli M., Maniati-Christidi M., Dacou-Voutetakia C. The spectrum of molecular defects of the CYP21 gene in the Hellenic population. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2845-2849

20. Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhausl W, et al. Mutational Spectrum of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in Austria: Identification of a Novel Missense Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4771-4775
21. Krone Nils, Roscher Adelbert Anton, Schwarz Hans Peter and Braun Andreas. Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem* 1998;44:2075-2082
22. Oriola J, Plensa I, Machuka I, et al. Rapid screening method for detecting mutations in the 21-hydroxylase gene. *Clin Chem* 1997;43:557-561
23. Lee HH, Chao HH, Ng HAT, Choo KB. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in Congenital adrenal hyperplasia. *J Med Genet* 1996;33:371-375
24. Olney Robert C., Mougey Edward B., Wang Jianwei et al. Using Real-Time, Quantitative PCR for rapid Genotyping of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in a North Florida Population. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:735-741
25. Owerbach D, Draznin MB, Carpenter RJ, Greenberg F. Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1992;89:109-110
26. Honour JW, Torresani T. Evaluation of neonatal screening for Congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2001;55(4):201-205
27. Krone N, Wachter I, Stefanidou M, Roscher AA, Schwarz HP. Mothers with Congenital adrenal hyperplasia and their children : outcome of pregnancy, birth and childhood. *Clin Endocrinol* 2001;55 (4):523-529
28. Loke KY, Lee YS, Lee WW, Poh LK. Molecular analysis of CYP-21 mutations for Congenital adrenal hyperplasia in Singapore. *Horm Res* 2001;55 (4):179-184
29. Charmandari E, Matthews DR, Johnston A, Brook CG, Hindmarsh PC. "TI"Serum cortisol and 17-hydroxyprogesterone interrelation in classical 21-hydroxylase deficiency : is current replacement therapy satisfactory ? *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4679-4685
30. Hargitai G, Solyom J, Battelino T, et al. Growth patterns and final height in Congenital adrenal hyperplasia due to classical 21-hydroxylase deficiency. Results of multicenter study. *Horm Res* 2001;55(4):161-171
31. Nordenstrom A, Wedell A, Hagenfeldt L, Marcus C, Larsson A. Neonatal screening for Congenital adrenal hyperplasia : 17-hydroxyprogesterone levels and CYP-21 genotypes in preterm infants. *Pediatrics* 2001;108 (4):E68
32. Merke D, Kabbani M. Congenital adrenal hyperplasia: epidemiology, management and practical drug treatment. *Paediatr Drugs* 2001;3(8):599-611
33. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of Congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2007;67(2):53-60
34. David M, Forest MG. Prenatal treatment of Congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1984;105:799-803
35. Jeffcoate TN, Fliegner JR, Russell SH, Davis JC, Wade AP. Diagnosis of the adrenogenital syndrome before birth. *Lancet* 1965;2:553-555
36. Frasier SD, Thorneycroft IH, Weiss BA, Horton R. Elevated amniotic fluid concentration of 17 alpha-hydroxyprogesterone in Congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr* 1975;86:310-312
37. Marcus ES, Holcombe JH, Tulchinsky D, Rich RR, Riccardi VM. Prenatal diagnosis of Congenital adrenal hyperplasia. *Am J Med Genet* 1979;4:201-204
38. Speiser PW, Laforgia N, Kato K. First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:838-848
39. American Academy of Pediatrics, Section of Endocrinology and Committee on Genetics. Technical Report: Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatrics* 2000; 106:1511-1518

40. Pang S, Hotchkiss J, Drash AL, Levine LS, New MI. Microfilter paper method for 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;45:1003-1008
41. Therrell BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient Congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics*. 1998;101:583-590
42. Allen DB, Hoffman GL, Fitzpatrick P, Laessig R, Maby S, Slyper A Improved precision of newborn screening for Congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr* 1997;130:128-133
43. Dixit N, Torresani T, Speiser PW. Genotyping CYP21 as an adjunct to hormonal screening of newborns for CAH. In. *Programs and Abstracts*. New Orleans, LA: The Endocrine Society; 1998;. Abstract P2-151
44. Pang S, Shook MK Current status of neonatal screening for Congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Pediatr* 1997;9:419-423
45. al Saedi S, Dean H, Dent W, Stockl E, Cronin C Screening for Congenital adrenal hyperplasia: the Delfia Screening Test overestimates serum 17-hydroxyprogesterone in preterm infants. *Pediatrics* 1996;97:100-102
46. Newborn Screening Committee, The Council of Regional Network for Genetic Services (CORN). *National Newborn Screening Report*, 1994. Atlanta, GA: The Council of Regional Network for Genetic Services; January 1999:118-133
47. Gotoh H, Kusakabe M, Shiroishi T, Moriwaki K. Survival of steroid 21-hydroxylase-deficient mice without endogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis as a model system for treatment of Congenital adrenal hyperplasia in humans. *Endocrinology* 1994;135:1470-1476
48. Tajima T, Okada T, Ma X, Ramsey W, Bornstein S, Aguilera G. Restoration of adrenal steroidogenesis by adenovirus-mediated transfer of human cytochromeP450 21-hydroxylase into the adrenal gland of 21-hydroxylase-deficient mice. *Gene Ther* 1999;6:1898-1903
49. Miller WL, Chrousos GP. The adrenal cortex. In Felig P, Frohman L (eds): *Endocrinology and Metabolism*, 4th ed. New York, McGraw-Hill, 2001, 385-524
50. Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid DNA analysis by allele-specific PCR for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1635-1640.
51. White PC, New MI. Molecular genetics of Congenital adrenal hyperplasia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1988 2:941-965
52. Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J. Reverse dot-blot hybridization as an improved tool for the molecular diagnosis of point mutations in Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Mol Diagn* 2001;6(3):193-199
53. Hernanz-Schulman M, Brock JW, Russel W. Sonographic findings in infants with Congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Radiol* 2002;32(2):130-137
54. Witchel SF, Smith R, Crivellaro CE, et al. CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 2000;106(4):414-419
55. Wudy SA, Hartmann M, Homoki J. Hormonal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in plasma and urine of neonates using benchtop gas chromatography-mass spectrometry. *J Endocrinol* 2000;165(3):679-683
56. Root AM. Neonatal screening for 21-hydroxylase deficient Congenital adrenal hyperplasia - the role of CYP21 analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1503-1504
57. Merke DP, Bornstein SR, Braddock D, Chrousos GP. Adrenal lymphocytic infiltration and adrenocortical tumors in a patient with 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med* 1999;340(14):1121-1122

58. Levo A, Jaaskelainen J, Sistonen P, Siren MK, Voutilainen R, Partanen J. Tracing past population migrations: genealogy of steroid 21-hydroxylase (CYP21) gene mutations in Finland. *Eur J Hum Genet* 1999;7(2):188-196
59. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, et al. Low frequency of CYP21B deletions in Brazilian patients with Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered* 1999;49(1):9-14
60. Lai C, Tsai C, Tsai F, Wu J, Lin W, Lee C. Rapid screening assay of Congenital adrenal hyperplasia by measuring 17-alpha-hydroxyprogesterone with high performance liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *J Clin Lab Anal* 2002;16(1):20-25
61. Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):786-741
62. Gmyrek GA, New MI, Sosa RE, Poppas DP. Bilateral laparoscopic adrenalectomy as a treatment for classical Congenital adrenal hyperplasia attributable to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 2002;109(2):E28
63. Nordenstrom A, Servin A, Bohlin G, Larsson A, Wedell A. Sex-typed toy play behavior correlates with the degree of prenatal androgen exposure assessed by CYP21 genotype in girls with Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5119-5124
64. Merke DP, Fields JD, Keil MF, Vaituzis AC, Chrousos GP, Giedd JN. Children with classic Congenital adrenal hyperplasia have decreased amygdala volume: potential prenatal and postnatal hormonal effects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1760-1765
65. Berenbaum SA, Bailey JM. Effects on gender identity of prenatal androgens and genital appearance: evidence from girls with Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1102-1106
66. Levo A, Partanen J. Novel mutations in the human CYP21 gene. *Prenat Diagn* 2001;21(10):885-889
67. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, et al. Prenatal diagnosis for Congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5651-5657
68. Nordenstrom A, Marcus C, Axelson M, Wedell A, Ritzen EM. Failure of cortisone acetate treatment in Congenital adrenal hyperplasia because of defective 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase reductase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(4):1210-1213
69. Witchel SF, Smith R, Suda-Hartman M. Identification of CYP 21 mutations by single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. *Hum Mutat* 1999;13(2):172
70. Wei WL, Killeen AA. Analysis of four common salt-wasting mutations in CYP21 (steroid 21-hydroxylase) by cleavage fragment length polymorphism analysis and characterization of a frequent polymorphism in Intron 6. *Mol Diagn* 1998;3(3):171-177
71. Lo J.C., Schwitzgebel VM, Tyrrell JB, et al. Normal female infants born of mothers with classic Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(3):930-936
72. Lako M, Ramsden S, Campbell RD, Strachan T. Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1999;36(2):119-124
73. Garner PR. Congenital adrenal hyperplasia in pregnancy. *Semin Perinatol* 1998;22(6):446-456
74. Speiser PR, White PC. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol* 1998;49(4):411-417
75. Lopez-Gutierrez AU, Riba L, Ordonez-Sanchez ML, et al. Uniparental disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency: evidence of different genetic mechanisms involved in the production of the disease. *J Med Genet* 1998;35(12):1014-1019
76. Moran C, Knochenhauer ES, Azziz R. Non-classic adrenal hyperplasia in hyperandrogenism: a reappraisal. *J Endocrinol Invest* 1998;21(10):707-720

77. Killeen AA, Jiddou RR, Sane KS. Characterization of frequent polymorphisms in Intron 2 of CYP21: application to analysis of segregation of CYP21 alleles. *Clin Chem* 1998;44(12):2410-2415
78. Wedell A. An update on the molecular genetics of Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic and therapeutic aspects. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998;11(5):581-589
79. Lajic S, Wedell A, Bui TH, Ritzen EM, Holst M. Long - term somatic follow-up of prenatally treated children with Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(11):3872-3880
80. Erel CT, Senturk LM, Oral E, Colgar U, Ertunçalp E. Adrenal androgenic response to 2-hour ACTH stimulation test in women with PCOS. *Gynecol Endocrinol* 1998;12(4):223-229
81. Tajima T, Fujieda K, Mikami A, Igarashi Y, Nakae J, Cutler GB Jr. Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by the modified polymerase chain reaction to detect splice site mutation in the CYP21 gene. *Endocr J* 1998;45(3):291-295
82. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988;81:866-874
83. Lajic S, Nordenstrom A, Ritzen EM, Wedell A. Prenatal treatment of Congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004;151(suppl 3):U63-U69
84. Dolzan V, Solyom J, Fekete G, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with Congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005;153:99-106
85. Friaes A, Rego AT, Aragues JM, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with Congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four partial gene conversions. *Mol Genet Metab* 2006;88:58-65
86. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, et al. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3852-3859
87. Miller WL, Levine LS. Molecular and clinical advances in Congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatrics* 1987;111:1-16
88. Vilee DB. The development of steroidogenesis. *Am J Med* 1972;53:533-544
89. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancy at risk for Congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374-378
90. Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med* 2002;346:1502
91. Bajpai A, Kabra M, Menon PSN. 21-hydroxylase deficiency: clinical features, laboratory profile and pointers to diagnosis in Indian children. *Indian Pediatrics* 2004;41:1226-1232
92. Osinovskaya NS, Ivashchenko TE, Baranov VS. Analysis of the association between the HLA-DQA1 alleles and the steroid 21-hydroxylase gene mutations in the patients with Congenital adrenal hyperplasia. *Russian Journal of Genetics* 2004;40(1):81-85
93. Turowski G, Gieracka-Pazucha D, Turowska-Heydel D, Pietrzyk JJ. Soluble HLA-A and HLA-B antigens in children with Congenital adrenal hyperplasia (CAH) and the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *Med Sci Monit* 1998;4(4):633-639
94. White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI, Seidman JG . Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nature* 1984; 312: 465-467
95. White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7505-7509

96. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1089-1093
97. Rich MA, Keating MA, Levin HS, Kay R. Tumors of the adrenogenital syndrome: an aggressive conservative approach. *J Urol* 1998;160(5):1838-1841
98. Toth M, Racz K, Glaz E. Increased plasma 17-hydroxyprogesterone response to ACTH in patients with non-hyperfunctioning adrenal adenomas is not due to a deficiency in 21-hydroxylase activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(10):3756-3757
99. Gell JS, Carr BR, Sasano H, Atkins B, Margraf L, Mason JJ, Rainey WE. Adrenarche results from development of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-deficient adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(10):3695-3701
100. Tajima T, Okada T, Ma XM, Ramsey W, Bornstein S, Aguilera G. Restoration of adrenal steroidogenesis by adenovirus-mediated transfer of human cytochrome P540 21-hydroxylase into the adrenal gland of 21-hydroxylase deficient mice. *Gene Ther* 1999;6(11):1898-1903
101. Spiro RP, Christian SL, Ledbetter DH, New MI, Wilson RC, Roizen N, Rosenfield RL. Intrauterine growth retardation associated with maternal uniparental disomy for chromosome 6 unmasked by adrenal hyperplasia. *Pediatr Res* 1999;46(5):510-513
102. Huerta R, Dewailly D, Decanter C, Knochenbauer ES, Boots LR, Azziz R. 11-beta-hydroxyandrostendione and delta-5-androstendiol as markers of adrenal androgen production in patients with 21-hydroxylase-deficient non-classic adrenal hyperplasia. *Fertil Steril* 1999;72(6):996-1000
103. Cohen MA, Sauer MV, Lindheim SR. 21-hydroxylase deficiency and Turner's syndrome: a reason for diminished endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1999;72(5):937-939
104. Azziz R, Hincapie LA, Knochenbauer ES, Dewailly D, Fox L, Boots LR. Screening for 21-hydroxylase-deficient non-classic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril* 1999;72(5):915-925
105. New MI, Wilson RC. Steroid disorders in children: Congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96(22):12790-12797
106. Escobar-Morreale HF, San Millan JL, Smith RR, Sancho J, Witchel SE. The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women : phenotype-genotype correlations. *Fertil Steril* 1999;72(4):629-638
107. Bonaccorsi AC, Adler I, Figueiredo JG. Male infertility due to Congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. *Fertil Steril* 1987;47:664-670.
108. Klingensmith G, Wentz A, Meyer W, Migeon C. Gonadotropin output in Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;43:933
109. Cabrera M, Vogiatzi M, New M. Long term outcome in adult males with classic Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3070-3078
110. Moore G, Lacroix A, Rabin D, McKenna T. Gonadal dysfunction in adult men with Congenital adrenal hyperplasia. *Acta Endocrinol* 1980;95:185-193
111. Stikkelbroeck N, Otten B, Pasic A, et al. High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5721-5728
112. Ghali I, David M, David L. Linear growth and pubertal development in treated Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol* 1977;6:425-436
113. Urban M, Lee P, Migeon C. Adult height and fertility in men with Congenital virilizing adrenal hyperplasia. *New Engl J Med* 1978;299:392
114. Valentino R, Savastano S, Tommaselli A, et al. Success of glucocorticoid replacement therapy on fertility in two adult males with 21-CAH homozygote classic form. *J Endocrinol Invest* 1997;20:690-694

115. Molitor J, Chertow B, Fariss B. Long-term follow-up of a patient with Congenital adrenal hyperplasia and failure of testicular development. *Fertil Steril* 1973;24:319
116. Blumberg-Tick J, Boudou P, Nahoul K, Schaison G. Testicular tumors in Congenital adrenal hyperplasia: steroid measurements from adrenal and spermatic veins. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1129-1133
117. Cutfield R, Bateman J, Odell W. Infertility caused by bilateral testicular masses secondary to Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Fertil Steril* 1983;40:809-814
118. Rutgers J, Young R, Scully R. The testicular "tumor" of the adrenogenital syndrome. A report of six cases and review of the literature on testicular masses in patients with adrenocortical disorders. *Am J Surg Pathol* 1988;12:503-513
119. Combes-Moukhovsky M, Kottler M, Valensi P, Boudou P, Sibony M, Attali J. Gonadal and adrenal catheterization during adrenal suppression and gonadal stimulation in a patient with bilateral testicular tumors and Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1390-1394
120. Radfar N, Bartter F, Easley R, Kolins J, Javadpour N, Sherins R. Evidence for endogenous LH suppression in a man with bilateral testicular tumors and Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;45:1194-1204
121. Kuhnle U, Land M, Ulick S. Evidence for the secretion of an antimineralocorticoid in Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:934-940
122. Kowarski A, Finkelstein J, Spaulding J, Holman G, Migeon C. Aldosterone secretion rate in Congenital adrenal hyperplasia. A discussion of the theories on the pathogenesis of the salt-losing form of the syndrome. *J Clin Invest* 1965;44:505
123. Rose L, Newmark S, Strauss J, Pochi P. Adrenocortical hydroxylase deficiencies in acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 1976;66:324-326
124. Lucky A, Rosenfield R, McGuire J, Rudy S, Helke J. Adrenal androgen hyperresponsiveness to adrenocorticotropin in women with acne and/or hirsutism: adrenal enzyme defects and exaggerated adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:840-848
125. Laue L, Merke DP, Jones JV, Barnes KM, Hill S, Cutler GB. A preliminary study of flutamide, testolactone, and reduced hydrocortisone dose in the treatment of Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3535-3539
126. Merke D, Keil M, Jones J, Fields J, Hill S, Cutler G. Flutamide, testolactone, and reduced hydrocortisone dose maintain normal growth velocity and bone maturation despite elevated androgen levels in children with Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1114-1120
127. Merke D, Cutler G. New ideas for medical treatment of Congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:121-135
128. Speiser PW, Laforgia N, Kato K, et al. First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:838-848
129. Josso N. Anatomy and endocrinology of fetal sex differentiation. In: DeGroot L, Jameson J, eds. *Endocrinology*. Vol. 3. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:1947-1954
130. Forest MG, Betuel H, David M. Prenatal treatment in Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Update 88 of the French multicentric study. *Endocr Res* 1989;15:277-301.
131. Seckl J, Miller W. How safe is long-term prenatal glucocorticoid treatment? *JAMA* 1997;277:1077-1079
132. Forest M, Betuel H, David M. Prenatal treatment in Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: up-date 88 of the French multicentric study. *Endocr Res* 1989;15:277-301.

133. Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI. Extensive personal experience: Prenatal treatment and diagnosis of Congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2014-2020.
134. Forest MG, David M, Morel Y. Prenatal diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency. [Review]. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993;45:75-82
135. Gotoh H, Kusakabe M, Shiroishi T, Moriwaki K. Survival of steroid 21-hydroxylase-deficient mice without endogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis as a model system for treatment of Congenital adrenal hyperplasia in humans. *Endocrinology* 1994;135:1470-1476
136. Barker DJP, Byll AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990;301:259-262.
137. Whincup PH, Cook D, Papacosta O, Walker M. Birth weight and blood pressure: cross-sectional and longitudinal relations in childhood. *BJM* 1995;311:773-776.
138. Barker D, Osmond C, Simmonds S, Wield G. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 1993;306:422-426.
139. Barker D. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171-174.
140. Barker DJP, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938-941
141. Trautman PD, Meyer-Bahlburg HF, Postelnek J, New MI. Effects of early prenatal dexamethasone on the cognitive and behavioral development of young children: results of a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20:439-449
142. Kadair RG, Block MB, Katz FH, Hofeldt FD. 'Masked' 21-hydroxylase deficiency of the adrenal presenting with gynecomastia and bilateral testicular masses. *Am J Med* 1977;62:278-282
143. Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R. Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:685-689
144. Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, Reincke M. Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2585-2588
145. Kawaguchi H, O'hUigin C, Klein J. Evolutionary origin of mutations in the primate cytochrome P450c21 gene. *Am J Hum Genet* 1992;50:766-780
146. Miller WL. Congenital adrenal hyperplasias. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991;20:721-49
147. Miller WL, Strauss JF 3rd. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999 Apr-Jun; 69(1-6): 131-41
148. Miller WL. Congenital adrenal hyperplasia in the adult patient. *Adv Intern Med* 1999; 44: 155-73
149. Migeon CJ, Donohoue PA. Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991;20:277-96
150. Cutler GB Jr, Laue L. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med* 1990;323:1806-13
151. New MI. Genetic disorders of adrenal hormone synthesis. *Horm Res* 1992;37(suppl 3):22-33
152. Stratakis CA, Rennert OM. Congenital adrenal hyperplasia: molecular genetics and alternative approaches to treatment. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999;36(4):329-63
153. Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC. Mutation in the CYP21B gene (ile172-to-asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Nat Acad Sci* 1988;85:1600-1604

154. Partanen J, Campbell RD. Substitution of ile172-to-asn in the steroid 21-hydroxylase B (P450c21B) gene in a Finnish patient with the simple virilizing form of Congenital adrenal hyperplasia. *Hum Genet* 1991;87:716-720
155. Wedell A, Ritzen EM, Haglund-Stengler B, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Nat Acad Sci* 1992;89:7232-7236
156. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC. Disease expression and molecular genotype in Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90:584-595
157. Speiser PW, New MI, White PC. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. *New Engl J Med* 1988;319:19-23
158. Speiser PW, New MI, White PC. Clinical and genetic characterization of nonclassic 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Res* 1989;15:257-276
159. Mornet E, Crete P, Kuttann F, Raux-Demay MC, Boue J, White PC, Boue A. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1991;48:79-88
160. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet* 1995;96:198-204
161. White PC, Tusie-Luna MT, New MI, Speiser PW. Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Hum Mutat* 1994;3:373-378
162. Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, Reincke M. Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2585-2588
163. Chiou SH, Hu MC, Chung B. A missense mutation at ile172-to-asn or arg356-to-trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 1990;265:3549-3552
164. Tajima T, Fujieda K, Nakae J, Toyoura T, Shimozawa K, Kusuda S, Goji K, Nagashima T, Cutler GB Jr. Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2350-2356
165. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. A mutation (pro30-to-leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Molec Endocr* 1991;5:685-692
166. Owerbach D, Crawford YM, Draznin MB. Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Molec Endocr* 1990;4:125-131
167. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase (P-450[C21]) deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Nat Acad Sci* 1988;85:7486-7490
168. Miller WL. Gene conversions, deletions and polymorphisms in Congenital adrenal hyperplasia. *Am J Hum Genet* 1988;42:4-7
169. Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela JM, Jariego C. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (gln318-to-stop) contribute to the most frequent severe point mutations in Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet* 2002;62:181-188
170. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Nat Acad Sci* 1988;85:4436-4440,
171. White PC, New MI, Dupont B. Structure of the human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5111-5115
172. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific, and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991;37:197-204

173. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2841-2845
174. Yu CY. The complete exon-intron structure of a human complement C4A gene. DNA sequences polymorphism, and linkage to the 21-hydroxylase gene. *J Immunol* 1991;146:1057-1066
175. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL. Two genes encoding 21-hydroxylase are located near the genes encoding the forth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1089-1093
176. Holler W, Scholz S, Knorr D, Bildingmaier F, Albert ED. Genetic differences between the salt-wasting, simple virilizing, and non-classical types of Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:757-763
177. Takemori S, Kominami S. The role of cytochrome P450 in adrenal steroidogenesis. *TIBS* 1984;393-396
178. Waterman MR, Simpson ER. Regulation of the biosynthesis of cytochromes P450 involved in steroid hormone synthesis. *Mol Cell Endocrinol* 1985;39:81-89
179. Kimura T. ACTH stimulation on cholesterol side chain cleavage activity of adrenocortical mitochondria. *Mol Cell Biochem* 1981;36:105-122
180. Voutilainen R, Tapanainen J, Chung B, et al. Hormonal regulation of P450_{scc} (20,22 desmolase) and P450_{c17} (17-hydroxylase / 17,20 - lyase) in cultured human granulosa cells. *J Clin Endocrinol* 1986;63:202-207
181. Voutilainen R, Miller WL. Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450_{scc}, in human stereogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1590-1594
182. Chung B, Matteson K, Voutilainen R, et al. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:8962-8966
183. Matteson K, Chung B, Urdea MS, et al. Study of cholesterol side-chain cleavage (20,22 desmolase) deficiently causing Congenital lipid adrenal hyperplasia using bovine sequence P450_{scc} oligodeoxyribonucleotide probes. *Endocrinology* 1986;118:1296-1305
184. Yanagibashi K, Haniu M, Shively JE, et al. The synthesis of aldosterone by adrenal cortex: two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11-beta-, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J Biol Chem* 1986;261:3556-3562
185. Curnow KM, Tusie-Luna M-T, Pascoe L, et al. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 1991;5:1513-1522
186. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, et al. Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxydase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4996-5000
187. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, et al. Role of steroid 11-beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1458-1462
188. Clark PA. Nonclassic 11-beta-hydroxylase deficiency: report of two patients and review. *J Pediat Endocr Metab* 2000;13:105-109
189. Hampf M, Dao NTN, Hoan NT, Bernhardt R. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11-beta-hydroxylase genes causes Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4445-4452
190. Geley S, Kapelari K, Johrer K, Peter M, Glatzl J, Vierhapper H, Schwarz S, Helmberg A, Sippell WG, White PC, Kofler R. CYP11B1 mutations causing Congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2896-2901

191. Lin D, Sugawara T, Strauss JFr, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A and Miller WL. 1995 Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995;267:1821-1831
192. Bose H, Sugawara T, Strauss Jr and Miller WL. The pathophysiology and genetics of Congenital lipoid adrenal hyperplasia. International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium. *N Engl J Med* 1996;335:1870-1878
193. Stocco D and Clark B. The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 1997;62:29-36
194. Miller WL, Strauss JF 3rd. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1-6):131-41
195. Chung B, Picado-Leonard J, Haniu M, et al. Cytochrom P450c17 (steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase): Cloning of human adrenal and testis cDNA indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:407-411
196. Matteson KJ, Picado-Leonard J, Chung B, et al. Assignment of the gene for adrenal P450c17 (steroid 17-alpha-hydroxylase / 17, 20 lyase) to human chromosome 10. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:789-791
197. Yanase T, Simpson E and Waterman M. 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev* 1991;12:91-108
198. Rheaume E, Simard J, Morel Y, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nature* 1992;1:239-245
199. Trudel C, Couet J, Martel C, et al. Regulation of adrenal 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity by adrenocorticotropin and corticosterone in the rat. *Endocrinology* 1991;129:2077-2084
200. Lorence MC, Corbin CJ, Kamimura N, et al. Structural analysis of the gene encoding human 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* 1990;4:1850-1855
201. Pang S. The molecular and clinical spectrum of 3 beta hydroxysteroid dehydrogenase deficiency disorder. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1998;9(2):82-86
202. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:81-99
203. Pang S, Levine L, Stoner E, Opitz J, Pollack M, Dupont B and New M. Nonsalt-losing Congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:808-818
204. Chang Y, Kulin H, Garibaldi L, Suriano M, Bracki K and Pang S. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in pubertal male and female siblings with glucocorticoid-treated nonsalt-wasting 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1251-1257
205. Rosenfield R, Rich B, Wolfsdorf J, Cassorla F, Parks J, Bongiovanni A, Wu C and Shackleton C. Pubertal presentation of Congenital delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:345-353
206. Labrie F, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Belanger A, Lachance Y, Zhao H, Labrie C, Breton N, de LY, et al. Structure and tissue-specific expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase genes in human and rat classical and peripheral steroidogenic tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:421-435
207. Bogovich K, Payne AH. Purification of rat testicular microsomal 17-ketosteroid reductase. *J Biol Chem* 1980;255:5552-5559
208. Strnadova KA, Votava F, Lebl J, et al. Prevalence of Congenital adrenal hyperplasia among sudden infant death in the Czech Republic and Austria. *Eur J Pediatr* 2007;166:1-4
209. Grosse SD, Van Vliet G. How many deaths can be prevented by newborn screening for Congenital adrenal hyperplasia ? *Horm Res* 2007;67:284-291
210. New MI. An update of Congenital adrenal hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1038:14-43

211. Speiser P, White P. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349:776-788
212. New M.I., Carlson A., Obeid J., Marshall I. et al. Prenatal diagnosis for Congenital adrenal hyperplasia in 595 pregnancies. *Endocrinologist* 2003;13:233-239
213. Nimkarn S, Weerakulwattana L, Chaichanwatanakul K, et al. Comprehensive study of Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in 92 Thai patients; in 11th Asian Congress of Pediatrics; 2003 November 2-7, Bangkok, Thailand, 11th Asian Congress of Pediatrics, 2003, p.80
214. Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, Ritzen EM, Sippell WG, Speiser PW. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res* 2002;58:188-195
215. Hughes I. Congenital adrenal hyperplasia: phenotype and genotype. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15(Suppl 5):1329-1340
216. Watterberg KL, Scott SM. Evidence of early adrenal insufficiency in babies who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 1995;95:120-125
217. Midgley PC, Russell K, Oates N, et al. Adrenal function in preterm infants: ACTH may not be the sole regulator of the fetal zone. *Pediatr Res* 1998;44:887-893
218. Ng PC. The fetal and neonatal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F25025-4
219. Ogilvy-Stuart A, Midgley P. Practical neonatal endocrinology. Cambridge University Press 2006;69-94
220. Southern, EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517
221. Puppo F, Indiveri F, Scudeletti M, Ferrone S. Soluble HLA antigens: new roles and methods of application. *Immunol Today* 1997;18:154
222. Ze'ev Hochberg. Practical algorithms in pediatric endocrinology. Karger 2007;48-49
223. Ze'ev Hochberg. Practical algorithms in pediatric endocrinology. Karger 2007;50-51
224. WHO Multicentre growth reference study group. WHO Child growth standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr*, 2006; Suppl 450: 76 – 85
225. Tanner J.M. Growth of the human at the time of adolescence. *Lect.Sci.Basis Med.* 1953;1:308– 63
226. Charmandari E, Hindmarsh P, Johnston A, Brook C. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: alterations in cortisol pharmacokinetics at puberty. 2001, *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2701 – 08
227. Merke DP, Bornstein SR, Avila NA, Chrousos GP. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. 2002, *Ann Intern Med* 136: 320 – 34
228. Jaaskelainen J, Voutilainen R. Long-term outcome of classical 21-hydroxylase deficiency: diagnosis, complications and quality of life. 2000, *Acta Paediatr* 89: 183 – 87
229. Hindmarsh PC. Management of the child with congenital adrenal hyperplasia. 2009, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 193 – 208
230. Forest MG. Adrenal Function Tests. In Ranke MB (ed): *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*. Basel, Karger, 2003, 372 – 426