

Rīgas Stradiņa Universitāte

Iveta Dzīvīte-Krišāne

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

(Specialitāte - pediatrija)

PROMOCIJAS DARBS

Zinātniskā darba vadītāja: Dr. hab. med. profesore Dace Gardovska

Konsultants: Dr. biol. Edvīns Miklaševičs

Rīga, 2010

Saturs

# saīsinājumi	3
1. Ievads	5
1.1. Darba aktualitāte	5
1.2. Problēmas nostādne	6
1.3. Darba mērķi	7
1.4. Darba uzdevumi	7
1.5. Aizstāvēšanai izvirzītās idejas	7
1.6. Darba hipotēzes	7
2. Literatūras apskats	8
2.1. Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas raksturojums	8
2.2. IVGH ģenētiskā diagnostika	12
2.2.1. IVGH ģenētiskās diagnostikas pamatprincipi	12
2.2.2. IVGH prenatalā diagnostika	14
2.3. IVGH neonatālais skrīnings	15
2.4. IVGH gēnu terapija	16
2.5. IVGH klasiskā tipa prenatalā terapija	17
2.6. 21-hidoksilāzes deficīta molekulārā ģenētika	18
2.6.1. 21-hidoksilāzes deficītu determinējošas CYP21 gēna mutācijas	20
2.6.2. CYP21 gēna mutāciju klīniskā nozīme (genotipa un fenotipa korelācija)	21
2.6.3. IVGH saistība ar HLA haplotipiem	24
2.6.4. IVGH molekulārā ģenētika	24
2.6.5. Kopsavilkums	25
3. Materiāli un metodes	26
3.1. Slimnieku raksturojums un atlase	26
3.1.1. Pētījuma subjekti	27
3.1.2. Ieslēgšanas kritēriji	28
3.1.3. Izslēgšanas kritēriji	28
3.2. Diagnostika un klasifikācija	28
3.3. Lietotās metodes	28
3.3.1. CYP21/CYP21P molekulārai analīzei izmantotie praimeru	28
3.3.2. DNS izdalīšana no asinīm	29
3.3.3. CYP21 gēna mutāciju noteikšana ar PCR	29
3.3.4. DNS sekvenēšana	30
3.3.5. Southern Blot	32
3.3.6. HLA gēnu haplotipēšana	33
3.3.6.1. HLA A,B,C gēnu amplifikācija	33

3.3.6.2.	HLA B gēnu tipēšana	33
3.4.	Iegūto rezultātu statistiskā apstrāde	33
4.	Rezultāti	34
4.1.	Klīnisko gadījumu piemēri	34
4.2.	Epidemioloģiskās izpētes atradne	36
4.3.	Klīniskā materiāla izvērtējums	40
4.3.1.	Slimnieku struktūra	40
4.3.2.	Pacientu raksturojums pēc dzimšanas parametriem, saistībā ar IVGH diagnosticēšanas vecumu	42
4.3.3.	Pacientu raksturojums pēc virilizācijas pakāpes	44
4.4.	Pacientu raksturojums	47
4.4.1.	Pacientu raksturojums pēc gestācijas un dzimšanas parametriem, saistībā ar IVGH diagnosticēšanas vecumu	48
4.4.2.	Pacientu raksturojums pēc virilizācijas pakāpes	50
4.4.3.	HLA lokusu atradne IVGH pacientiem	53
4.4.4.	Atrasto CYP21 gēna mutāciju raksturojums IVGH pacientiem	55
4.4.4.1.	Konstatēto CYP21 gēna mutāciju vispārīgs raksturojums	55
4.4.4.2.	Konstatēto CYP21 gēna mutāciju saistība ar IVGH fenotipu	56
4.4.4.3.	Konstatēto CYP21 gēna mutāciju saistība ar virilizāciju	58
4.5.	Laboratoro metožu iegūto rezultātu piemēri	60
4.6.	Klīniskā materiāla molekulāri ģenētiskā analīze	64
4.6.1.	CYP21A2 gēna amplifikācija	66
4.6.2.	CYP21A2 gēna sekvenēšana un iegūtie rezultāti	67
4.6.3.	HLA lokusu atradne IVGH pacientiem	68
4.6.4.	Atrasto CYP21 gēna mutāciju raksturojums IVGH pacientiem	72
4.6.4.1.	Konstatēto CYP21 gēna mutāciju vispārīgs raksturojums	72
4.6.4.2.	Konstatēto CYP21 gēna mutāciju saistība ar dzimumu un fenotipu	73
4.6.4.3.	Konstatēto CYP21 gēna mutāciju saistība ar virilizāciju	75
4.7.	Piecu gadu laikā veiktā pētījumā iekļauto bērnu IVGH slimības gaitas dinamiskās novērošanas analīze	77
5.	Diskusija	83
6.	Secinājumi	91
7.	Rezultātu novitāte	92
8.	Darba anotācija	93
9.	Atsauces	94
10.	Pielikumi	107

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 adenoziņ-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 ģenēzes 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

Vairāk nekā simts gadus attīstās ģenētika - zinātne par iedzimtību. Šobrīd iespējams noteikt DNS secību visā cilvēka genomā. Tas nākotnē dos iespēju izmantot gēnu terapiju - ievietojot normālus gēnus, lai aizvietotu bojātos pie daudzām hroniskām slimībām. Būs nepieciešams laiks, lai pilnveidotu šo metodi, taču daudz praktiskākas un ātrākas izredzes ir medikamentu pielāgošana konkrētajam genotipam. Tā kā gēni nosaka to, kā pacients reaģē uz kādu konkrētu medikamentu, būs iespējams radīt dažādas zāļu formas, kas būtu pielāgotas indivīda ģenētiskajai uzbūvei. Šo zinātnisko nākotnes problēmu risinājuma sākuma etaps saistās ar promocijas darbu, jo 21-hidroksilāzes iedzimtas mutācijas kodējošā gēnā ir cēlonis iedzimtai virsnieru garozas hiperplāzijai.

Iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija (IVGH) jeb iedzimts adrenogenitālais sindroms (AGS) ir viens no visbiežāk sastopamākiem 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,
- neauglības 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 pataloģijas atklāšanai un prenatālas terapijas uzsākšanai. Mūsdienās šāda skrīninga diagnostika balstās, galvenokārt, uz molekulāri ģenētiskiem izmeklējumiem un daudzās valstīs tā arvien plašāk tiek ieviesta kā klīniskās 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 mērķi

Promocijas darba mērķis ir izpētīt 21-hidroksilāzes deficīta molekulāros mehānismus, imūngēnētisko 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. Literatūras apskats

Iedzimtu virsnieru garozas hipeplāziju pirmo reizi klīniski aprakstīja itāļu ārsts *Crecchio* 1865. gadā, bet, tikai atklājot tās cēloni (kortizola sintēzes deficītu) 1950. gadā, kļuva iespējama šīs slimības ārstēšana [1,2].

2.1. Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas raksturojums

Iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija (IVGH) jeb adrenogenitālais sindroms ir viens no visbiežāk sastopamākiem iedzimtiem metaboliem defektiem, kā pamatā ir autosomāli-recesīvs, monogēni noteikts viena vai vairāku steroīdu biosintēzes enzīmu deficīts [3, 4]. 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 [3,4,9] .

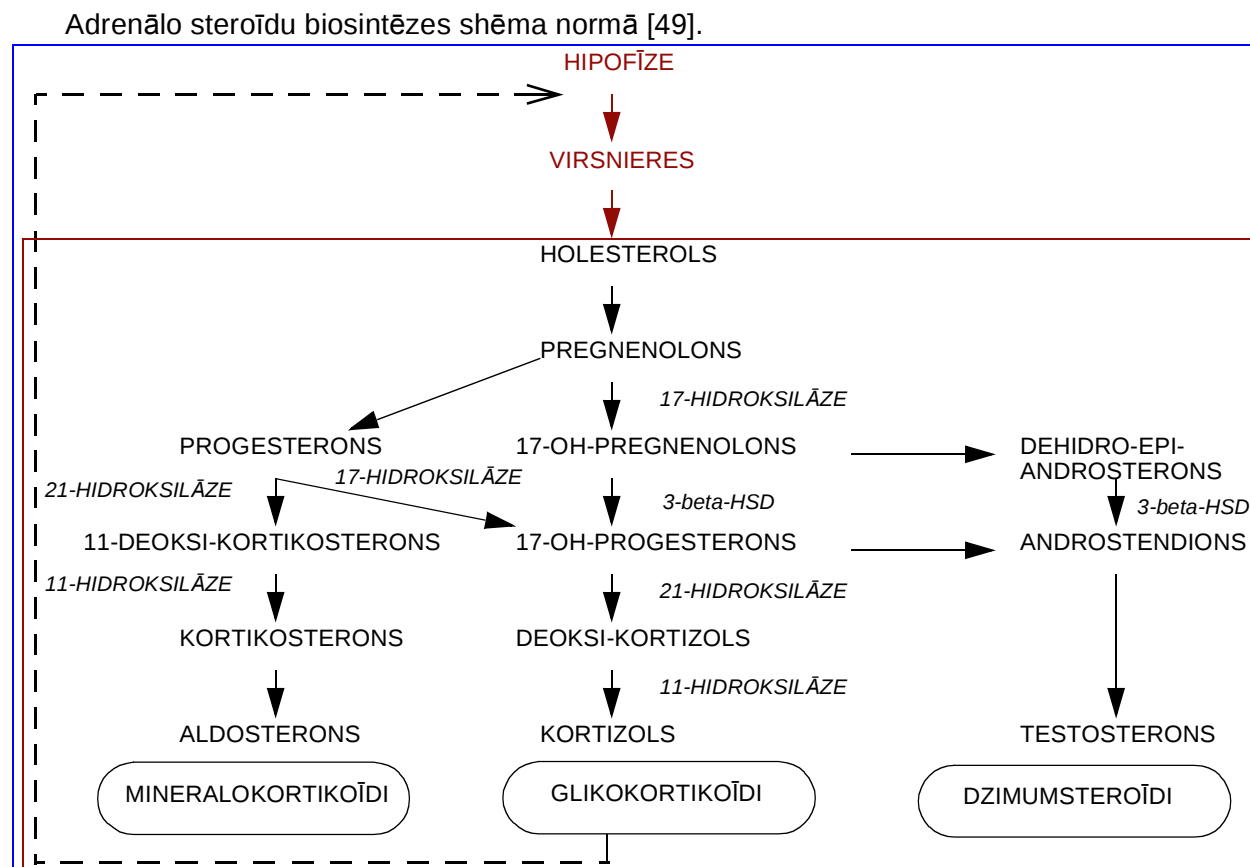
IVGH patoģenēzes galvenais posms - 21-hidroksilāzes katalizēta kortizola sintēze notiek hipofīzes AKTH kontrolē pēc, t.s., negatīvās atgriezeniskās saites principa. Tas nozīmē, ka zems kortizola līmenis asinīs paaugstina AKTH sekrēciju un otrādi - augsts kortizola līmenis asinīs to pazemina. Bez tam, AKTH stimulējošai ietekmei uz virsnieru garozas darbību ir bazālā, diennakts svārstību un stresa-inducētā komponente, kuru saskaņošana notiek hipotalāma līmenī. Respektīvi - hormonālo un centrālās un veģetatīvās nervu sistēmu impulsu integrācija hipotalāmā rezultējas ar atbilstošu gan hipotalāmiskā kortikotropīna-rilīzing-hormona (CRH) izstrādi, gan arī - hipofīzes AKTH sekrēciju un, tai sekojošu, situācijai adekvātu kortizola sintēzi virsnieru garozā. Visu šo glikokortikoīdu regulācijas mehānismu kopumā mēdz apzīmēt par hipotalāma-hipofīzes-virsnieru garozas asi (skat. Attēlu 2-1).

21-hidroksilāzes deficīta gadījumā (skat. Attēlu 2-2) kortizola biosintēze virsnieru garozā ir traucēta un tā līmenis asinīs pazeminās. Tas izraisa hronisku AKTH hipersekrēciju, pastāvīgu adrenālo steroīdu biosintēzes stimulāciju, kortizola bioķīmisko prekursoru (17-OH-P) uzkrāšanos un to tālāku ieslēgšanos netraucēti noritošos virsnieru androgēnu veidošanās procesos.

Steroīdu 21-hidroksilāze (21-H) ir mikrosomāls enzīms un tā pieder citohroma P450 enzīmu grupai. Steroīdu biosintēzes ķēdē 21-H nodrošina 17-OHP un progesterona (P) pārvērtības par, attiecīgi, 11-deoksi-kortizonu un deoksi-kortikosteronu. Attīstoties 21-HD, kortizola un aldosterona produkcija (SZ formas gadījumā) ir samazināta vai bloķēta. Reaģējot uz samazinātu kortizola produkciju, saskaņā ar atgriezeniskās saites principu, pastiprināti izdalās hipofīzes AKTH, tādējādi, hiperstimulējot virsnieru garozas darbību. Šādas hiperstimulācijas rezultātā pieaug korti-

zola sekrēcija, kompensējot 21-HD radīto tā nepietiekamību, bet vienlaikus ar to pieaug arī kortizola prekursoru (galvenokārt, 17-OHP) produkcija, kas, savukārt, noved pie virsnieru androgēnu līmeņa paaugstināšanās.

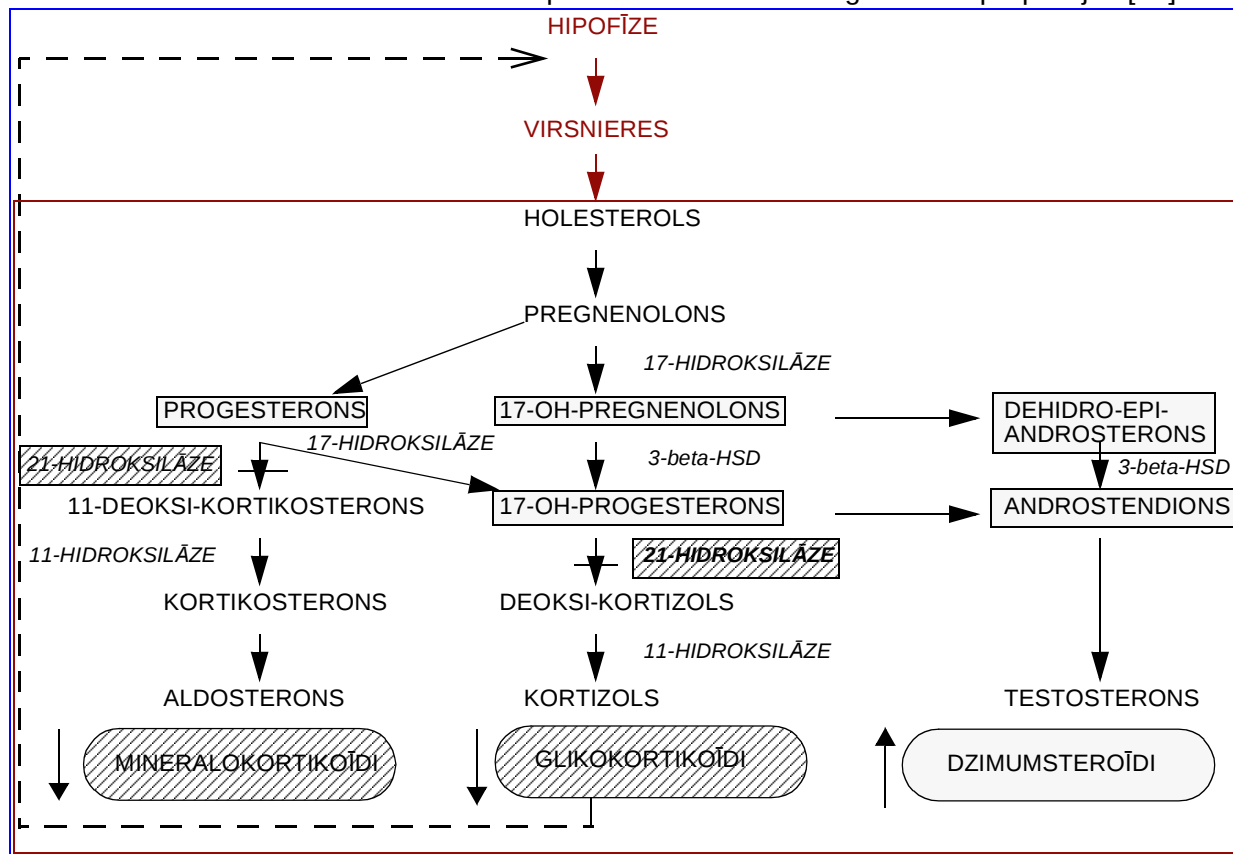
Attēls 2-1.



Īsam kopsavilkumam IVGH bioķīmisko mehānismu daži galvenie principi ir sekojoši:

- skartā enzīma bojājums var būt parciāls vai pilns un, līdz ar to, tā darbība var būt kavēta vai bloķēta,
- skartā enzīma bojājuma pakāpe nosaka IVGH smaguma pakāpi,
- steroīdu biosintēzes metabolīti, kuri veidojas pirms kavētā (vai bloķētā) 21-H posma, uzkrājas un tiek šuntēti uz virsnieru androgēnu sintēzes ceļiem,
- kortizola deficīts tiek kompensēts ar, pēc atgriezeniskās saites principa noritošu, hipofīzes AKTH hipersekrēciju un sekojošu virsnieru garozas kompensatoru hiperstimulāciju.

Adrenālo steroīdu biosintēzes shēma pie iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas [49].



AKTH hiperstimulācija, savukārt, norāda uz primāru steroīdu ģenēzes defektu. Starp citiem IVGH metaboliem un klīniskiem efektiem, kurus tieši vai netieši nosaka kāda steroīdu biosintēzes enzīma deficīts, visbiežāk sastopami dzimumsteroīdu un mineralokortikoīdu biosintēzes traucējumi ar atbilstošām klīniskām konsekvencēm - dzimumdiferenciācijas traucējumiem, virsnieru garozas mazspēju un, adekvāti neārstētiem IVGH slimniekiem, ar tipiskiem augšanas traucējumiem, kuri raksturojas ar ļoti strauju augšanu agrā bērnībā, kaulu augšanas zonu ātru slēgšanos un izteikti mazu augumu pieaugušā vecumā.

Būtiskākie veselības traucējumi skar IVGH slimnieka dzimumsfēras attīstību un funkciju vai arī attiecas uz sirds un asinsvadu sistēmas dažādām, bieži - vitāli svarīgām, funkcijām (perifērs kollapse, bradikardija, šoks). 90% - 95% IVGH gadījumu pamatā ir steroīdu 21-hidroksilāzes deficīts (21-HD), kas radies *CYP21* gēna kādas mutācijas rezultātā (patreiz ir zināmas apmēram 60 šādas mutācijas). Atkarībā no klīniskajām izpausmēm, izšķir IVGH klasisko tipu (ar sālszaudes un vienkāršo virilizējošo formu) un neklasisko tipu [4,7,11].

Pamatojoties uz aptuveni 6.5 miljoniem jaundzimušo veiktajiem skrīninga datiem, konstatēts, ka IVGH klasiskā tipa incidence vidēji pasaulē ir ap 1:14 000 dzīvi dzimušu jaundzimušo [4].

IVGH neklasiskā tipa incidence Eiropā un Ziemeļamerikā vidēji ir ap 1:500 - 1 000 dzīvi dzimušu jaundzimušo [5], lai gan dažādās populācijās tā mēdz ievērojami atšķirties, dažās valstīs sasniedzot pat 1:100 [5, 7-9]. IVGH neklasiskais tips, tādējādi, tiek uzskatīts par vienu no visbiežāk sastopamajām cilvēka slimībām.

Neklasiskais IVGH tips (jeb vēlīnas manifestācijas IVGH) klīniski parasti manifestējas jauniešu vecumā, lai gan reizēm to izdodas atklāt arī agrā bērnībā. Šis IVGH tips nav dzīvību akūti apdraudošs, tā simptomātika pārklājas ar citu slimību simptomātiku un tādēļ tā diagnostika ir apgrūtināta. Dzīves gaitā neklasiskais IVGH tips neprogresē par klasisko IVGH tipu.

Gan meitenēm, gan zēniem ar neklasisko IVGH tipu ārējie dzimumorgāni piedzimstot ir normāli veidoti. Aizdomas par šīs slimības klātbūtni jaundzimušiem var rasties izvērtējot IVGH skrīninga rezultātus. Tā kā jaundzimušiem ar neklasisko IVGH tipu simptomātikas parasti nav, tad terapija nav nepieciešama. Šo bērnu vecāki par atklāto slimību ir jāinformē un jābrīdina par varbūtējiem veselības traucējumiem bērna vēlākajos dzīves posmos. Viena no biežākajām neklasiskās IVGH pazīmēm ir pubertātes attīstība pirms 8 gadu vecuma meitenēm un 9 gadu vecuma zēniem. Virsnieru androgēnu paaugstināts līmenis organismā vēlāk var radīt menstruālā cikla traucējumus, fertilitātes problēmas gan sievietēm, gan vīriešiem, pastiprinātu ķermeņa apmatojumu, galvas matu izkrišanu meitenēm vai sievietēm, kā arī abiem dzimumiem veicināt strauju augšanu un kaulu augšanas zonu slēgšanos bērnībā, kas rezultējas ar mazu augumu pieaugušā vecumā [5,12].

IVGH klasiskā tipa alēles nesēji dažādās populācijās konstatēti no 1:250 līdz pat 1:50 iedzīvotājiem [5-9]. Ar IVGH neklasisko tipu saistīto gēnu izplatība dažādās populācijās vēl ir maz pētīta un attiecīgi dati nav publicēti.

IVGH slimnieku galvenās klīniskās problēmas ir [11-14]:

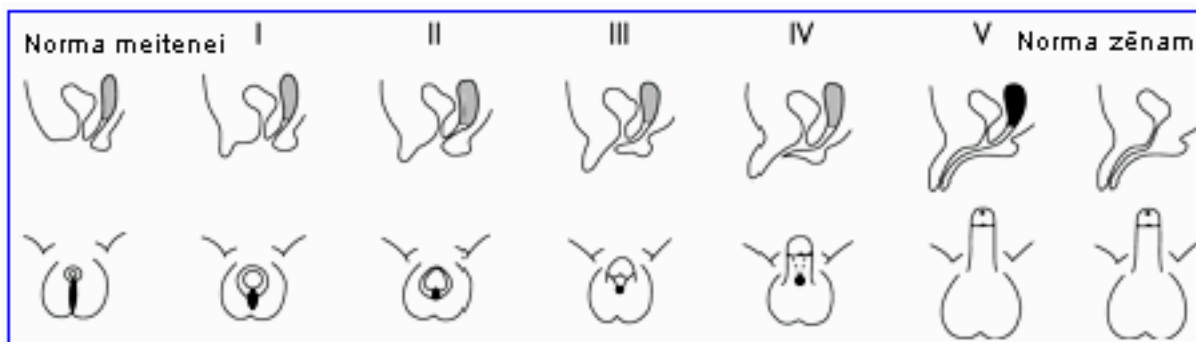
- dzīvību apdraudošas virsnieru mazspējas krīzes paaugstināts risks,
- ūdens un elektrolītu līdzsvara traucējumi,
- nepareiza dzimumattīstība meitenēm, kas smagākos gadījumos rada grūtības noteikt bērna dzimumu,
- dzimumfunkcijas un fertilitātes problēmas IVGH slimnieka vēlākā dzīves laikā,
- kā arī - neārstētiem IVGH slimniekiem, tipiski augšanas traucējumi, kas raksturojas ar
 - ļoti strauju augšanu agrā bērnībā,
 - kaulu augšanas zonu ātru slēgšanos un
 - izteikti mazu augumu pieaugušā vecumā.

Iekšējie un ārējie dzimumorgāni abiem dzimumiem veidojas 6.-8. gestācijas nedēļā. Dzimumdiferenciācijas traucējumi virilizācijas veidā pie IVGH attīstās no 7. gestācijas nedēļas virsnieru hiperandrogēnijas dēļ [10].

IVGH diagnostikā attīstība ir vērsta uz prenatalu diagnostiku, nolūkā uzsākt adekvātu terapiju prenatalajā vai neonatālajā bērna attīstības posmā [5-7]. Virilizācijas pakāpes raksturošanai klīnikā lieto *Prader* 5-punktu skalu [3] (skat. Attēlu 2-3).

Attēls 2-3.

Prader virilizācijas skalas shēma.



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.

2.2. IVGH ģenētiskā diagnostika

2.2.1. IVGH ģenētiskās diagnostikas pamatprincipi

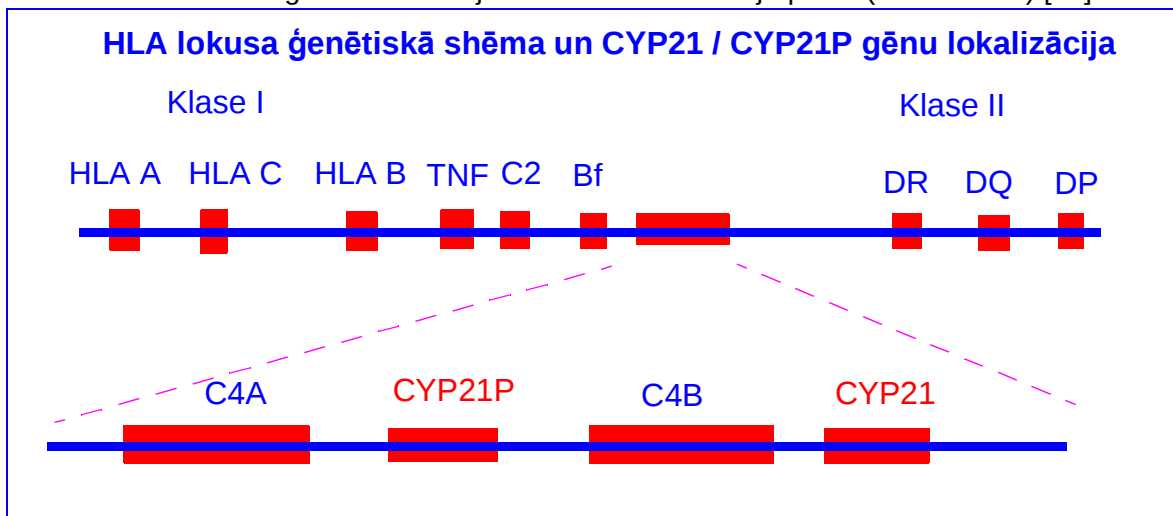
21-H struktūru un, lielā mērā, arī tās aktivitāti regulē *CYP21* gēns [15, 76], kurš (kā vienīgais no steroīdu biosintēzi regulējošiem gēniem) ir lokalizēts 6. hromosomas īsajā plecā, HLA III gēnu reģionā (6p.21.3), starp HLA B un HLA DR gēniem. Gēnu datu bāzē tas reģistrēts ar OMIM numuru 201910 [3].

CYP21A2 (turpmāk - *CYP21*) ir 21-hidroksilāzes funkcionālais gēns, kas sastāv no 10 eksoniem un 9 introniem un ir 3336 bp garš. *CYP21* gēna ekspresijas galvenais induktors ir AKTH, bet ir konstatēts, ka arī angiotenzīnam II, insulīnam un insulīnam līdzīgam augšanas faktoram-1 (IGF-1) piemīt zināmas spējas ietekmēt *CYP21* gēna aktivitāti. Tā transkripcijas rezultātā sintezējas 2112 bp gara mRNS [2,13, 76].

CYP21 atrodas 30 kb no nefunkcionālā pseidogēna *CYP21A1P* (turpmāk - *CYP21P*), ar kuru tam ir augsta sekvenču homologijas pakāpe (nukleotīdu identitāte to eksonos un intronos ir, attiecīgi - 98% un 96%). *CYP21* un *CYP21P* ir lokalizēti cieši pie komplementa faktora C4 regulējošiem gēniem (attiecīgi - pie C4B un C4A), tādējādi veidojot, tandēma veidā atkārtotošas, C4/21-H struktūrālas vienības (skat. Attēlu 2-4).

Attēls 2-4.

CYP21 un *CYP21P* gēnu lokalizācija 6. hromosomas īsajā plecā (HLA lokusā) [39].



Raksturīga šī lokusa iezīme ir augsts, šeit lokalizēto gēnu, blīvums, jo DNS 680 kb intervālā šeit atrodas 36 gēni. Starp tiem ir tādu svarīgu imunoloģisko reakciju elementu kā komplementa faktora 2, properdīna B, kā arī citokīnu - tumoru nekrozes faktora A (TNF-A) un tumoru nekrozes faktora B (TNF-B) - aktivitāti regulējoši gēni. Atrasts C4 deficīts pie tādas autoimūnas izcelsmes slimības kā *lupus erythematosus*, tadēļ šī lokusa (ieskaitot C4/21-H struktūrālas vienības) iespējamā saistība ar endokrīniem autoimunoloģiskiem procesiem izraisa padziļinātu interesi [77-79,81].

CYP21 gēna izmeklēšana tiek veikta, lai apstiprinātu un precizētu IVGH diagnozi, atklātu patoloģiskā gēna nesējus vai veiktu IVGH prenatalu diagnostiku. Šajā nolūkā parasti vispirms nosaka *CYP21* gēna mutācijas un, ja ar šo metodi IVGH izraisījušo alēli atklāt neizdodas, tad analizē *CYP21* gēna nukleotīdu secību [13].

CYP21 gēna mutāciju noteikšana ikdienas praksē (skat. tabulu 2-1) parasti ir vērsta uz 9 biežāk sastopamo mutāciju un gēna delēciju atklāšanu, kas ļauj konstatēt 80 - 95% no IVGH izraisošām alēlēm. Vairums no šīm mutācijām rodas gēnu konversijas rezultātā starp *CYP21* gēnu un *CYP21P* pseidogēnu, kas normāli satur multiplas delēciju tipa mutācijas [15,16]. Visbiežāk pie 21-HD klasiskā tipa sastopamā mutācija (sastop ap 30% gadījumu) ir intronā 2 konstatējamā 656 A/C>G. Bieži sastopamas (ap 20% gadījumu) ir arī *CYP21* gēna pilna delēcija un 8 bp delēcija eksonā 3. To rezultātā 21-H aktivitāte samazinās zem 1%, kas parasti nosaka SZ klīniskās formas attīstību [15,17-20]. Lielo gēna delēciju noteikšanai parasti lieto *Southern blot* metodi [220].

Tabula 2-1.

21-hidroksilāzes deficīta diagnostikai lietotās molekulāri ģenētiskās metodes [15,17].

METODE	NOSAKĀMĀS MUTĀCIJAS	ATKLĀŠANAS BIEŽUMS
Mutāciju analīze	A/C659G (<i>splice</i> mutācijas intronā 2), delēcijas, ieskaitot pilnās <i>CYP21</i> gēna delēcijas un 8 bp delēcijas eksonā 3, P30L, I172N, <i>cluster</i> mutācijas eksonā 6, V281L, F306+ _t , Q318X, R356W, P453S	80 - 95%
Sekvences analīze	<i>CYP21</i> gēna nukleotīdu sekvenču izmaiņas	virs 95%

Sakarā ar to, ka mutācijas var būt cis- vai trans-konfigurācijā un arī gēnu duplikācijas dēļ (respektīvi - uz vienas hromosomas var būt gan neskarts gēns, gan tā mutantā kopija) ir iespējamās diagnostiskās kļūdas [21]. Lai pēc iespējas no tām izvairītos, šo molekulāri ģenētisko izmeklēšanu ir ieteicams veikt gan probandam, gan abiem viņa vecākiem, gan arī viņa brāļiem un māsām [20,21].

2.2.2. IVGH prenatālā diagnostika

Izmeklēšanas metodika un terapeitiskā taktika IVGH augsta un zema riska grūtniecību gadījumos ir nedaudz atšķirīga [6,9,11].

Augsta IVGH riska gadījumā pirms plānotas grūtniecības abiem partneriem veic molekulāri ģenētisku izmeklēšanu nolūkā konstatēt IVGH izraisošas *CYP21* gēna mutācijas. Ja partneri ir heterozigoti, tad, nolūkā novērst iespējamās meitenes virilizāciju, pirms gestācijas 10. nedēļas (un pirms jebkādas augļa izmeklēšanas) mātei nozīmē deksametazonu - 20 µg/kg/diennaktī, sadalot to uz 3 devām. 10. - 12. gestācijas nedēļā, izmeklējot horiona bārkstiņu paraugu vai 16. - 18. nedēļā, amniocentēzes materiālā nosaka augļa dzimumu; meitenei veic molekulāri ģenētisku

izmeklēšanu nolūkā atklāt IVGH izraisošu *CYP21* gēna mutāciju homozigotu klātbūtni un, pozitīvā gadījumā, mātes terapiju ar deksametazonu turpina līdz dzemdībām. Ja auglis ir zēns vai, ja meitenei IVGH esamību molekulāri ģenētiski nediagnosticē, tad deksametazona terapiju mātei pārtrauc [22-26].

IVGH zema riska grūtniecību gadījumā (grūtniecību ar zemu IVGH risku uzskata tad, ja ne abiem vecākiem, ne pirmās un otrās pakāpes radniekiem nav norādes par jebkādu IVGH formu) 21-HD attīstības iespējamību pirms grūtniecības iestāšanās nav pamata apsvērt, bet nepareizu ārējo genitāliju attīstību meitenei konstatē ultrasonogrāfiski, kontrolējot gestācijas gaitu. Pie šādas atradnes meitenei nosaka kariotipu, *SRY* un ultrasonogrāfiski izmeklē Millera vadu struktūras. Ja kariotips ir 46, XX, *SRY*-negatīvs un dzemde ultrasonogrāfiski izskatās normāla, tad, nolūkā izslēgt IVGH, amnija šķidrumā nosaka 17-OH-P un veic amniocentēzes materiāla attiecīgu molekulāri ģenētisku diagnostiku. Lai gan GK terapiju uzsākt šajā vēlā gestācijas periodā nav nozīmes, prenatali diagnosticēts IVGH ļauj sagatavoties adekvātai bērna postnatālai terapijai un aprūpei [27-32].

Pēdējos gados arvien plašāk kā izvēles vai rutīnas metode IVGH prenatalai diagnostikai tiek ieviesta augļa DNS materiāla ģenētiskā izmeklēšana nolūkā noteikt iespējamās IVGH izraisošas *CYP21* gēna mutācijas. Augļa DNS parasti izdala no horiona bārkstiņu epitēlija materiāla, ko ņem gestācijas 8.-9. nedēļā. Ja horiona bārkstiņu materiāls nav iegūstams, tad kā alternatīvu augļa DNS izdarei gestācijas 12.-13. nedēļā veic amniocentēzi [33].

Patreiz vēl izstrādes stādijā esoša metode augļa DNS iegūšanai no mātes asins parauga ļautu izslēgt invazīvas procedūras augļa DNS materiāla iegūšanai un tuvinātu IVGH prenatalo diagnostiku ikdienas klīniskās rutīnas līmenim [33].

2.3. IVGH neonatālais skrīnings

21-HD izraisīta IVGH neonatālā skrīninga galvenais mērķis ir atklāt šādus slimniekus tūlīt pēc piedzimšanas, lai varētu nekavējoties uzsākt adekvātu terapiju un, tādējādi, novērstu viņiem dzīvību apdraudošas virsnieru krīzes attīstību. Sakarā ar to, ka jaundzimušiem zēniem IVGH pazīmes ir grūti pamanīt, un arī to, ka zēniem ar IVGH pirmajās dzīves nedēļās kļūdaina virsnieru krīzes diagnostika un ar to saistīta mirstība ir ievērojami augstāka nekā IVGH skartām meitenēm, IVGH neonatālais skrīnings zēniem ir īpaši nozīmīgs. Papildus tam, šāda jaundzimušo izmeklēšana ļauj izvairīties gan no kļūdainas dzimuma noteikšanas meitenēm ar izteiktu ārējo genitāliju virilizāciju, gan arī - no viņu postnatālas hiperandrogenizācijas un atbilstošu klīnisko pazīmju attīstības [34-36].

IVGH neonatālā skrīninga metodika klīniskai pielietojšanai (iegūstot papēža kapilāro asiņu paraugu uz filtrpapīra un vēlāk nosakot tajā 17-OH-P) ir pieejama kopš 1977. gada. Patreiz šīs metodikas modifikācijas lieto daudzās valstīs un tas, bez acīmredzama klīniska ieguvuma, ļauj arī uzkrāt (patreiz pieejami apmēram 10 miljonu jaundzimušo IVGH skrīninga rezultāti) [3] un analizēt dažādus IVGH epidemioloģiskus datus [4]. Tā, piemēram, pateicoties šim skrīningam ir noskaidrots, ka 75% no jaundzimušiem ar IVGH klasisko tipu ir sāls zaudes forma, bet 25% - vienkārši virilizējošā forma. Izmeklējumus uz IVGH neklasiskā tipa klātbūtni neonatālā skrīningā parasti neiekļauj [37-43].

IVGH neonatālais skrīnings parasti tiek organizēts pēc sekojošiem principiem: asins parauga paņemšana 3. - 5. dienā pēc piedzimšanas, iespējami ātra un ticama 17-OH-P noteikšana, skaidra 17-OH-P līmeņa robeža starp normu un IVGH, iespējami vienkārša un skaidra rīcības shēma pozitīvas atbildes gadījumā, diagnozes apstiprinājuma izmeklējumi bērniem ar pozitīviem IVGH skrīninga rezultātiem [137].

Patreiz lietotās IVGH neonatālā skrīninga metodikas [44], tāpat kā citas jaundzimušo skrīninga metodikas; piemēram - uz fenilketonūriju, hipotireozi u.c., paredz kapilāro asiņu parauga iegūšanu ar dūrienu papēdī un tā uzglabāšanu kā pilienu uz filtrpapīra.

Līdzšinējā klīniskā pieredze liecina, ka, sakarā ar vienlaicīgi veicamiem vairākiem skrīningiem un tendenci iespējami ātrāk izrakstīt māti ar bērnu no stacionāra, materiāls IVGH skrīningam nereti tiek paņemts par ātru, respektīvi, 1. - 2. dienā pēc dzimšanas; tas var būt iemesls kļūdaini pozitīvam IVGH skrīninga rezultātam. Cits iemesls kļūdaini pozitīvam IVGH skrīningam ir 17-OH-P datu izvērtēšana neņemot vērā jaundzimušā gestācijas laiku un/vai svaru; t.i., priekšlaicīgi dzimušiem un jaundzimušiem ar dzimšanas svaru zem 1500 g 17-OH-P līmenis parasti ir ievērojami augstāks un tādēļ korektai rezultātu izvērtēšanai ir jālieto atbilstošas tabulas. Analizējot IVGH neonatālā skrīninga kļūdas, konstatēts, ka kļūdaini negatīvi rezultāti rodas reti [45,46].

2.4. IVGH gēnu terapija

21-hidroksilāzes deficīta izraisīta IVGH ir ļoti perspektīva diagnoze varbūtējai gēnu terapijai salīdzinoši tuvā nākotnē, galvenokārt, divu apsvērumu dēļ - to nosaka viena gēna defekts un 21-hidroksilāzes aktivitāte izpaužas tikai virsnieru garozā. Šādas terapijas iestrādes patreiz ir dzīvnieku eksperimenta stadijā [47-49] un perspektīvē sagaidāms, ka IVGH slimnieku ārstēšanas iespējas radikāli uzlabosies. Līdzšinējā pieredze ārstēt IVGH ar gēnu terapiju iezīmē klīnisku problēmu - sākotnējam terapijas efektam seko tā kritums, jo mazinās gēna ekspresija; noskaidrots, ka gēnu terapija IVGH gadījumā pielietojama tikai ļoti agrīni, pirms virilizācijas veidošanās, jo pretējā gadījumā neizdodas novērst dzimumdiferenciācijas traucējumu attīstību [174].

2.5. IVGH klasiskā tipa prenatalā terapija

Pirmie IVGH prenatalās diagnostikas mēģinājumi klīniskajā praksē tiek datēti ar 1965. gadu [35]; tie balstījās uz ketosteroīdu, pregnāntriola un, kopš 1975. gada [35], arī 17-OH-P daudzuma noteikšanu amnija šķidrumā. Pagājušā gadsimta 70. - 80.-tajos gados IVGH prenatalai diagnostikai sāka izmantot HLA tipēšanu [36] un, vēlāk - arī *CYP21* gēna molekulāro izmeklēšanu [37].

Parasti šādu ārstēšanas iespēju apsver, ja ģimenē jau ir IVGH slimnieki [128] un to nozīmē vēl pirms ir zināms augļa dzimums un ir veikta *CYP21* gēna molekulārā izmeklēšana; respektīvi - pirms grūtniecības 9. nedēļas vai, ideālā gadījumā, pirms grūtniecības 7. nedēļas. Terapijas mērķis ir nomākt iespējamo IVGH skartās meitenes virsnieru garozas androgēnu hipersekrēciju un sekojošu viņas virilizāciju jau pašā intrauterīnās attīstības sākumā. Šajā nolūkā mātei perorāli nozīmē deksametazonu devā - 20 µg/kg/diennaktī, sadalot to 2 - 3 daļās.

Tā kā urogenitālā sīnusa veidošanās sākas laikā ap gestācijas 9. nedēļu [38], tad, lai novērstu IVGH-skartās meitenes virilizāciju, prenatalai terapijai ir jāsākas tūlīt pēc grūtniecības konstatēšanas (saskaņā ar Amerikas Pediātru Asociācijas Tehnisko Ziņojumu par IVGH [39] - 5. gestācijas nedēļā). Deksametazons šim nolūkam tiek izmantots tādēļ, ka tas viegli šķērso placentāro barjeru.

Augļa dzimuma noteikšanai un DNS izmeklēšanai [50,51] var lietot vai nu horiona bārkstiņu paraugu, ko šim nolūkam iegūst 9.- 11. gestācijas nedēļā, vai arī - amnija šķidrumā esošās šūnas, ko, veicot amniocentēzi, iegūst 15. - 18. gestācijas nedēļā.

Ja, nosakot kariotipu, noskaidrojas, ka auglis ir vīriešu dzimuma vai ja, veicot DNS analīzi, konstatē, ka sieviešu dzimuma auglim nav IVGH izraisošas *CYP21* gēna mutācijas, tad deksametazona terapiju pārtrauc. Pretējā gadījumā, deksametazonu mātei turpina līdz dzemdību laikam.

IVGH ir pirmā no iedzimtām metabolisma slimībām, kuru sāk ārstēt jau ilgi pirms dzimšanas [51,67]. Adekvāti nozīmēts, deksametazons spēj efektīvi aizkavēt IVGH-skartās meitenes ārējo genitāliju intrauterīnu virilizāciju. Deksametazona terapija ir indicēta, ja IVGH klasiskā tipa diagnoze ir pierādīta. Kā liecina klīniskā prakse, deksametazona terapiju šādos gadījumos gan māte, gan bērns panes labi [52,67].

Atsevišķos novērojumos konstatēts paaugstināts svara pieaugums un pastiprināta tieksme uz tūsku veidošanos mātēm, kuras lieto deksametazonu. Savukārt, bērniem, kuru mātes gestācijas laikā saņēmušas deksametazona terapiju, lielos klīniskos pētījumos nav novērots paaugstināts iedzimtu anomāliju risks vai konstatētas kādas būtiskas dzimšanas svara, auguma vai galviņas apkārtmēra novirzes no normas [53-56]. Reizēm novēro nedaudz mazāku dzimšanas svaru un/ vai augumu šiem jaundzimušiem, kas, iespējams, ir glikokortikoīdu augšanu kavējošais efekts.

Nav apstiprinājušās arī bažas par iespējamo deksametazona prenatalās terapijas saistību ar spontāna abortu attīstību un augļa intrauterīnu bojāeju [57-60]. Šo problēmu sakarā veiktie klīniskie pētījumi liecina tieši pretējo - prenatalā deksametazona terapija ar IVGH saistītu spontāno abortu un intrauterīnas augļa bojāejas incidenci samazina [46].

Pirmie šādi prenatali ārstētie bērni patreiz ir apmēram 20 gadus veci - pirmais šāds ziņojums ir datēts ar 1984. gadu [61] un, kā liecina klīniskās novērošanas dati, viņu augšana un attīstība pārsvarā ir noritējusi normāli.

Sakarā ar atsevišķiem arteriālas hipertensijas gadījumiem pusaudžiem un jauniešiem ar IVGH, kuri prenatali ārstēti ar deksametazonu [46,49] dažādās valstīs ir veikta plaša šīs problēmas klīniskā izpēte. Tās rezultāti liecina, ka arteriālās hipertensijas risks vēlākā dzīves laikā ir augstāks tiem cilvēkiem, kuriem, neatkarīgi no iemesla, ir bijis zems dzimšanas svars un, vienlaicīgi, palielināts placentas svars [62]. Tomēr jāatzīmē, ka dažādos pētījumos ir iegūti atšķirīgi rezultāti un šīs problēmas vērtējumam patreiz nav vienota viedokļa [26, 33]. Teiktais zināmā mērā attiecas arī uz prenatalās deksametazona terapijas varbūtējo ietekmi uz apmācības spējām, uzvedību, emociju spektru un seksuālo orientāciju šo slimnieku pusaudžu vai jauniešu vecumā [63-65].

IVGH slimnieku prenatalās terapijas neapmierinoši rezultāti - piemēram, izteiktu virilizācijas pazīmju attīstība meitenei, neskatoties uz prenatalu deksametazona lietošanu - saistās, galvenokārt, ar vēlu terapijas sākumu, neadekvāti mazu deksametazona devu vai ar terapijas pārtraukumiem.

2.6. 21-hidoksilāzes deficīta molekulārā ģenētika

Monogēnas slimības parasti ir samērā retas un tām mēdz būt smaga klīniska simptomātika. Daudzkārt lielāks ir poligēni ir izraisītu slimību skaits; pastāv uzskats, ka katras hroniskas slimības pamatā ir arī kāds ģenētiskais faktors, respektīvi - kāda gēna vai vairāku gēnu spontāni iegūtas vai pārmantotas, slimību rosinošas, paliekošas mutācijas [66].

DNS replikācijas laikā gēnā var rasties kāda nukleotīdu sekvences kļūda jeb mutācija, kas nosaka gēna struktūras un, sekojoši - arī tā funkcijas izmaiņas. Gēnu mutācijas nosaka izmainītu RNS un attiecīgo olbaltumvielu sintēzi, kurai, savukārt, var būt gan bioķīmiskas, gan arī - bioloģiskas un klīniskas konsekvences organisma audu, orgānu vai visa organisma līmenī [67-73].

Gēnu mutācijas tipiski var būt kā atsevišķa nukleotīda aizvietošana ar citu, kā lielāku gēna daļu vai visa gēna delēcija vai tā duplikācija recīprokālās homologo gēnu rekombinācijas rezultātā vai kā gēnu konversija nerekīprokālās homologo gēnu rekombinācijas rezultātā. Mutācijas var izraisīt dažādi ķīmiskie un fizikālie ārējie faktori.

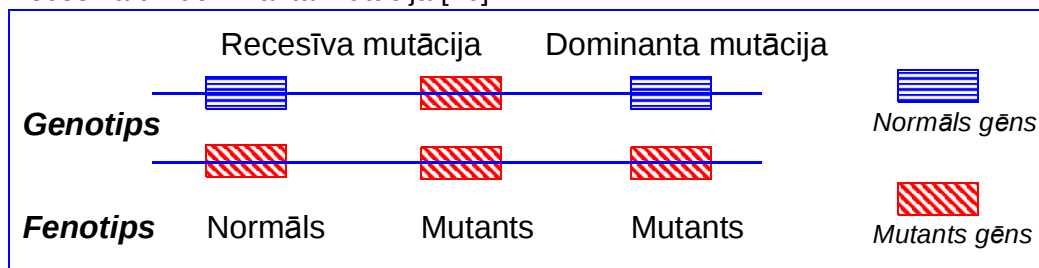
Organismam esošo gēnu komplektu apzīmē kā genotipu, bet tā fiziskās un funkcionālās izpausmes - kā fenotipu [74-76].

Katra atsevišķa gēna dažādas formas (piemēram, normālo jeb, t.s., '*wild type*' un mutanto) apzīmē kā tā alēles. Tā kā diploīda (dubulta) hromosomu komplekta organismā (cilvēkam) katram gēnam ir 2 kopijas, tad, ja tā alēles ir identiskas - gēns ir homozigotā stāvoklī, bet, ja tā alēles ir atšķirīgas - gēns ir heterozigotā stāvoklī. Ja kāda gēna mutācijas fenotipiska izpausme attīstās tikai homozigotā stāvoklī, tad šī mutācija ir recesīva, bet, turpretīm, ja gēna mutācijas fenotipiska izpausme attīstās heterozigotā stāvoklī, tad šī mutācija ir dominanta [77-80].

Uzskata, ka tipiskā gadījumā - recesīva mutācija izraisa genotipisku un fenotipisku funkcijas pazemināšanos vai tās zudumu, bet dominanta mutācija - genotipiski un fenotipiski funkciju var pastiprināt. Šāds uzskats tomēr nav kategorisks, jo nereti var novērot gan abu heterozigotito alēļu, gan to produktu mijiedarbību, kas var izraisīt jauktas fenotipiskas izpausmes [78,79]. Recesīvu mutāciju no dominantas var atšķirt, analizējot attiecīgās fenotipiskās iezīmes pārmantotību probanda ģimenē (skat. Attēlu 2-5).

Attēls 2-5.

Recesīva un dominanta mutācija [76].



Lai attiecībā pret kādu pazīmi attīstītos mutants fenotips, recesīvas mutācijas gadījumā abām alēlēm ir jābūt mutantām, bet dominantas mutācijas gadījumā ir pietiekami, ja mutanta ir tikai viena no alēlēm. Recesīva mutācija parasti saistās ar gēna funkcijas pavājināšanos vai pilnīgu tās zudumu, kamēr dominanta mutācija nereti (bet ne vienmēr) saistās ar gēna funkcijas pastiprināšanos.

Pārmantotība realizējas tēva un mātes dzimumšūnu saplūšanas rezultātā, tām veidojot gametu ar diploīdu hromosomu komplektu (dzimumšūnām apaugļošanas brīdī ir haploīds hromosomu komplekts). Kamēr somatiskās šūnas dalās mitotiski, dzimumšūnu un gametas dalīšanās notiek mejozes ceļā. Premejozes stādijā gameta satur 2 hromosomas ar ģenētisko materiālu no tēva un mātes [23].

2.6.1. 21-hidroksilāzes deficītu determinējošas *CYP21* gēna mutācijas

Apkopojot, *CYP21* gēna mutācijas var iedalīt:

- a) pilnas gēnu delēcijas,
- b) lielas gēnu konversijas,
- c) atsevišķas punktveida gēnu mutācijas un
- d) mazas (8-bp) gēnu delēcijas.

Attiecībā uz lielajām delēcijām un konversijām, eksistē 2 galvenie to veidošanās mehānismi.

Viens no tiem saistās ar nevienlīdzīgu hromosomu fragmentu apmaiņu mejozes laikā un tiek apzīmēts par "*crossing-over*". Tā rezultātā, piemēram, var veidoties pilna C4B gēna delēcija un *CYP21* gēna "*net-deletion*" [81,82].

Otrs no šiem mehānismiem, savukārt, saistās ar konversiju, kuras gaitā *CYP21* pseidogēnam raksturīgas (normāli notiekošas) delēciju veida mutācijas tiek pārnestas uz *CYP21* gēnu. *CYP21P* pseidogēnam ir 3 tipiski defekti - 8-bp delēcija eksonā 3, T-insercija eksonā 7 un stop-kodons eksonā 8 [74,77,83].

Lielās delēcijas, kas skar C4B komplementa un *CYP21* gēnus un ir defektīvas meiotiskas rekombinācijas rezultāts, sastāda apmēram 20% no klasisko IVGH izraisošo alēļu kopskaita. Šo mutāciju veidošanās gaitā zūd 30-kb segments, kas ietver *CYP21P* pseidogēna 3' galu, visu pieguļošo C4B komplementa gēnu un *CYP21* gēna 5'galu. Rezultātā veidojas nefunkcionējošs himērs pseidogēns. Daudzas no šīm delēcijām saistās ar haplotipu *HLA-A3;Bw47;DR7* un, esot homozigotā stāvoklī, izraisa klasiskā IVGH sāls zaudes formu [80,84,124].

Lielās gēnu konversijas, kuru gaitā *CYP21* pseidogēnā normāli esošās mutācijas tiek pārnestas uz *CYP21* gēnu, sastāda apmēram 10% no klasisko IVGH izraisošo alēļu kopskaita. Lietojot polimerāžu ķēžu reakciju (*PCR*), reizēm ir grūti atšķirt *CYP21* gēna delēcijas no konversijām [3,4,15,85,92].

Ja nonsense mutācijas kodonā 318 un delēcijas eksonā 3 (kuras normāli sastop *CYP21* pseidogēnā) veidojas *CYP21* gēnā, tad tās izraisa 21-H sintēzes pilnu bloku un, sekojoši, nosaka sāls zaudes formas attīstību [87-89,91,138].

Zināmas vairāk par 100 *CYP21* gēna mutācijas [16-20] starp kurām sastop nukleotīdu nomaiņas (*missense/nonsense*), nukleotīdu nomaiņas *splice site* rajonos, mazas delēcijas, mazas insercijas, mazas insercijas/delēcijas, lielas delēcijas, lielas insercijas un inversijas, saistītas ar sekojošu 21-HD un IVGH attīstību.

2.6.2. *CYP21* gēna mutāciju klīniskā nozīme (genotipa un fenotipa korelācija)

Biežāk sastopamās *CYP21* gēna mutācijas, kuras determinē kāda noteikta IVGH tipa vai formas attīstību, var iedalīt sekojošās grupās:

1. Mutācija intronā 2 (656 A/C > G)

Šīs ir ar gēnu delēcijām nesaistītas, punktveida mutācijas, kuras slimniekiem ar klasisko IVGH sastop visbiežāk; respektīvi - 22% SZ formas gadījumu, 25% VV formas gadījumu un, papildus tam, tās var konstatēt arī 12% no IVGH neklasiskā tipa slimniekiem [90, 94-99, 159, 160, 161, 166].

Šī mutācija skar 656. nukleotīdu secības pozīciju [100, 117, 167] un ir noskaidrots, ka normāli tajā var atrasties gan adenozīna, gan citozīna bāzes nukleotīds [168], kas mutācijas rezultātā tiek attiecīgi aizvietots ar guanīna nukleotīdu [169].

2. Pro 30 Leu mutācija

Šīs mutācijas (eksonā 1), lai gan ir tipiskas slimniekiem ar neklasisko IVGH, parasti sastop ne biežāk kā 15% gadījumu (biežākās mutācijas pie neklasiskās IVGH ir Val-281 par Leu). 21-H aktivitāte šiem slimniekiem ir saglabāta par 30 - 60%, bet IVGH klīniskās izpausmes raksturojas ar samērā izteiktām maskulinizācijas vai virilizācijas pazīmēm.

Tāpat kā Val281Leu, arī Pro30Leu mutācija [1, 13, 77, 164, 165] ir normāli sastopama *CYP21P* pseidogēnā un uz funkcionālo *CYP21* gēnu tiek pārnesta gēnu konversijas ceļā.

3. Ile 172 Asn mutācijas

Šādas mutācijas ir tipiskas klasiskās IVGH vienkāršai virilizējošai formai. Lai gan šiem slimniekiem ir saglabāts tikai 1% no 21-H aktivitātes, mineralokortikoīdu (aldosterona) deficīta klīniskās pazīmes (respektīvi - sāls zaudes pazīmes) viņiem parasti nenovēro. Tomēr situācijās, kas saistītas ar lielu stresu, mineralokortikoīdu nepietiekamība var attīstīties un radīt slimniekam dzīvību apdraudošas situācijas.

IVGH izraisošā mutācija kodonā 172 ir [153, 154] izoleicīnu kodējošā DNS nukleotīdu sekvenču (adenīns, timīns, citozīns) nomaiņa ar asparagīnu kodējošo nukleotīdu sekvenču (adenīns, adenīns, citozīns). Šī mutācija normāli ir sastopama *CYP21P* pseidogēnā un gēnu konversijas rezultātā tiek pārnesta uz funkcionālo *CYP21* gēnu. Līdzīga Ile uz Asn mutācija ir atrasta arī eksona 4 kodonā 173; klīniski Ile 173 Asn izraisa VV formas attīstību pie 2% reziduālās 21-H aktivitātes [155, 156].

4. Ile 236 Asn, Val 237 Glu, Met 239 Lys kompleksa mutācija un Ile 235 Asn, Val 236 Glu un Met 238 Lys mutācijas

Ile 236 Asn, Val 237 Glu un Met 239 Lys mutācijas, attiecīgi, notiek 1380., 1383. un 1389. pozīcijā timīna nukleotīdam aizvietojošies ar adenozīna nukleotīdu [96,99,149]. Šāda trīskārša *missense* mutācija eksonā 6 pilnīgi izslēdz jebkādu 21-H aktivitātes iespēju, jo 21-H pie šī defekta nav spējīga saistīties ar bioķīmisko substrātu. Klīniski tā izpaužas ar smagu IVGH SZ formu.

Ile235Asn mutāciju (21-H molekulas 235. pozīcijā esošā izoleicīna aizvietošanu ar asparģīnu) izraisa *CYP21* gēna eksona 6 nukleotīdu sekvences nomaiņa 1380. pozīcijā esošā timīna nomaiņa ar adenozīnu [2,77,167]. Normāli šī mutācija ir sastopama *CYP21P* pseidogēnā. Personām, kurām tā homozigotā stāvoklī ir *CYP21* aktīvā gēnā - 21-H aktivitāte iztrūkst un viņiem attīstās IVGH SZ forma.

Līdzīgi - Val 236 Glu mutāciju izraisa timīna nomaiņa pret adenozīnu eksona 6 nukleotīdu sekvences 1383. pozīcijā, bet Met 238 Lys mutāciju - timīna aizvietošana ar adenozīnu eksona 6 nukleotīdu sekvences 1389. pozīcijā [101,131,165]. Arī šīs mutācijas normāli sastop *CYP21P* pseidogēnā un IVGH slimniekiem ar šīm mutācijām arī nav 21-H aktivitātes, kas viņiem nosaka SZ formas attīstību.

5. Val 281 Leu mutācija

Šādas mutācijas (eksonā 7) [157, 158] sastop līdz 70% [159] no neklasiskā IVGH gadījumiem. Šiem slimniekiem parasti ir saglabāti 50% no 21-H aktivitātes; vairumam no viņiem ir HLA B14;DR1 haplotips.

Analizējot atsevišķus adrenokortikālās karcinomas gadījumus, ir atrasta Val 2181 Leu mutācijas klātbūtne eksonā 7 [162].

6. Arg 356 Trp mutācija

Pie šādām mutācijām kodonā 356 notiek triptofānu kodējošā DNS nukleotīda (CGG) aizvietošana ar arginīnu kodējošo nukleotīdu (TGG); 21-H aktivitāte šajos gadījumos nav saglabāta [163, 164].

7. 8-bp delēcija eksonā 3

Šī mutācija [170] ir sastopama ap 8% slimnieku ar IVGH SZ formu; defekts skar eksona 3 nukleotīdu sekvences 707.-714. pozīcijas un tas normāli ir *CYP21P* pseidogēnā.

8. 30-kb delēcija saistībā ar C4A gēnu

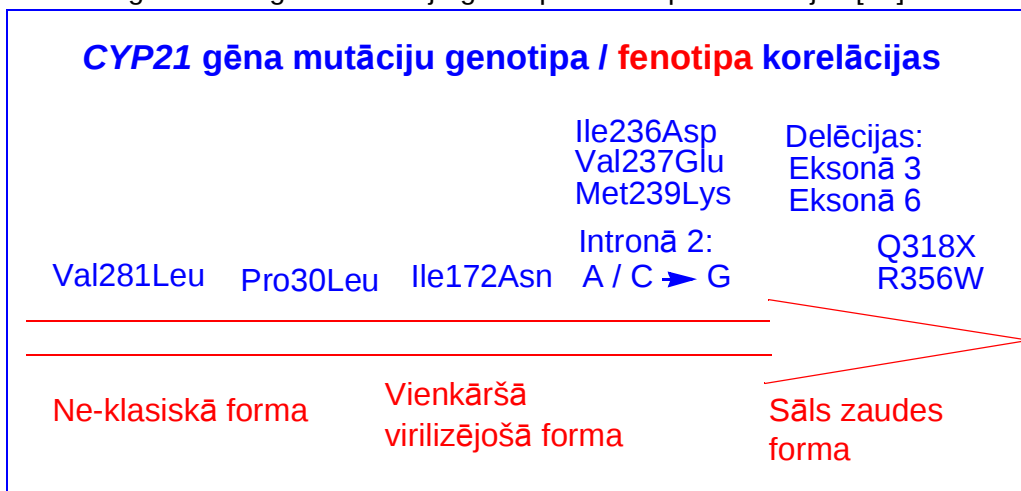
Šī mutācija [170] ir sastopama samērā bieži (ap 30% no visiem IVGH SZ formas slimniekiem) un tā izslēdz jebkādu 21-H aktivitāti, jo traucē šī enzīma sintēzi.

Pēc dažādās valstīs veiktu pētījumu datiem, kopējā 21-HD izraisošo *CYP21* gēna mutāciju spektrā ap 30% sastāda lielās delēcijas un konversijas, mazliet vairāk par 20% - punktveida mutācijas intronā 2, apmēram 15% - Ile 172 Asn un Val 281 Leu, ap 8% - Pro 30 Leu; atlikušo šī spektra daļu veido retāk sastopamās *CYP21* gēna mutācijas [20, 24,165].

Kopainu ieskatam par biežāk sastopamām *CYP21* gēna mutācijām un to saistību ar IVGH klīniskajām izpausmēm (21-hidroksilāzes reziduālo aktivitāti ieskaitot) (skat. Attēlu 2-6 un Tabulu 2-2).

Attēls 2-6.

IVGH raksturīgo *CYP21* gēna mutāciju genotipa / fenotipa korelācijas [79].



Tabula 2-2.

Biežāko *CYP21* gēna mutāciju saistība ar reziduālo 21-hidroksilāzes aktivitāti [78].

21-hidroksilāzes reziduālā aktivitāte	IVGH klīniskais tips	<i>CYP21</i> gēna mutācija
0%	IVGH klasiskais tips (dziļš 21-H defekts)	Pilna <i>CYP21</i> gēna delēcija, liela <i>CYP21</i> gēna konversija, 8 bp delēcija eksonā 3, <i>cluster</i> mutācijas eksonā 6, F306+t, Q318X, R356W
Minimāla reziduāla aktivitāte (mazāka par 1%)		<i>Splice</i> mutācijas intronā 2 (A/C 659G)
2 - 10%		Ile 172 Asn
20 - 50%	IVGH neklasiskais tips (viegls 21-H defekts)	Pro 30 Leu Val 281Leu P 453 S

* Tabulā 2-2 redzams, ka 21-hidroksilāzes atlieku aktivitāte zem 10% saistās ar IVGH klasiskā tipa attīstību, ko galvenokārt nosaka pilna *CYP21* gēna delēcija, liela *CYP21* gēna konversija, splice mutācijas intronā 2 un Ile 172 Asn mutācija, kamēr 21-hidroksilāzes atlieku aktivitāte virs 20% saistās ar IVGH neklasiskā tipa attīstību, ko galvenokārt nosaka Pro 30 Leu un Val 281 Leu mutācijas [78].

2.6.3. IVGH saistība ar HLA haplotipiem

HLA noteikšanai ir praktiska loma prenatalai diagnostikai un heterozigoto ģimenes locekļu atlasei.

IVGH tiek pārmantota kā monogēna autosomāli recesīva slimība, kuru nosaka HLA lokusā izvietoti un ar HLA sistēmu saistīti gēni. Tas nozīmē, ka tuvi radinieki, kuriem ir 21-hidroksilāzes deficīts (21-HD) , bieži mēdz būt HLA identiski [129,132]. Agrāk, pirms bija iespējams klonēt *CYP21* gēnu, HLA tipēšana bija galvenais IVGH prenatalās diagnostikas veids. Bez tam, tika noskaidrots, ka noteiktām 21-HD formām atbilst noteiktas HLA alēles. Tā, piemēram, IVGH klasiskā tipa sāls zaudes formas attīstība saistās ar HLA-A3; B60; B40; Bw47; DR7, kuri izplatīti Skandināvijas valstu populācijās [77]. Papildus 21-HD, šis haplotips parasti satur arī nulles alēli vienā no diviem C4 lokusiem, kuri kodē komplementa C4 sintēzi [173]. Pamatojoties uz šo saistību, tika izvirzīta hipotēze (kura ieviešot *CYP21* klonēšanas tehnoloģiju tika arī apstiprināta), ka šis ģenētiski noteiktais sindroms attīstās C4 un 21-hidroksilāzes gēnu vienkāršas delēcijas rezultātā. IVGH vienkārši virilizējošā forma saistās ar HLA - Bw51. Attiecībā uz IVGH neklasisko tipu tika atklāts, ka tā attīstība visbiežāk asociējas ar HLA-B14; DR1 [174,183]. Šis haplotips saistās ar *CYP21* gēna Val-281 par Leu mutāciju un ar C4 un *CYP21P* gēnu duplikāciju. Beidzot tika konstatēta arī HLA-A1;B8;DR3 haplotipa negatīvā saistība ar 21-hidroksilāzes deficītu. Šim haplotipam ir C4A nulles alēle un tā veidošanos saista ar C4A un *CYP21P* gēnu delēciju. Salīdzinot šos HLA homozigotus tika konstatēts, ka *CYP21* gēns (agrāk dēvēts par 21-hidroksilāzes “B” gēnu) ir aktīvais gēns, kamēr *CYP21P* (agrāk dēvēts par 21-hidroksilāzes “A” gēnu) ir pseidogēns [2,3,194].

2.6.4. IVGH molekulārā ģenētika

IVGH molekulārās ģenētikas sākuma posmu saista ar White un līdzstrādnieku 1984. gadā izdalīto 21-hidroksilāzi determinējošo *CYP21* gēnu un pseidogēnu *CYP21P* [171, 216-218] katru aptuveni 3,4 kb lielu, lokalizētus 6 . hromosomas 13. pleca (6p21.3) HLA reģionā cieši blakus komplementu C4 determinējošiem gēniem (*C4A* un *C4B*). Sekojoša *CYP21* gēna sekvenču noskaidrošana [173] pavēra iespējas noteikt IVGH izraisošas tā mutācijas [4,15,20]. Mūsdienās *CYP21* gēna molekulāri ģenētisko analīzi plaši lieto 21-hidroksilāzes deficīta diagnostikai, kā arī IVGH etioloģijas un terapijas taktikas precizēšanai.

2.6.5. Kopsavilkums

Steroīdu 21-hidroksilāzes deficīts ir iedzimts metabols defekts, kas izraisa samazinātu kortizola (un nereti arī aldosterona) produkciju virsnieru garozā un kura klīniskā konsekvence ir iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija. IVGH incidence pasaulē vidēji ir 1:10000 - 1:15000.

Kortizola deficīts izraisa hipofīzes ACTH hipersekrēciju, kuras sekas ir virsnieru garozas hiperplāzija un sekojoša virsnieru androgēnu hiperprodukcija. Virsnieru androgēni organisma perifērajos audos tiek pārvērsti par testosteronu, kas izraisa pre- un post-natālu virilizāciju.

Smaga 21-hidroksilāzes deficīta forma ir dzīvību apdraudošs stāvoklis, jo kortizola deficītam šajā gadījumā ir pievienojies arī aldosterona deficīts, kas izraisa bērnam masīvu sāls zudumu un progresējošu dehidratāciju.

Steroīdu 21-hidroksilāzi determinē *CYP21* gēns, kas lokalizēts 6. hromosomas īsā pleca HLA reģionā (izteikti mainīgu cilvēka genoma daļu ar augstu gēnu blīvumu tajā).

Izpētes darbs ir iecerēts, lai labāk izprastu saistību starp *CYP21* gēna izplatītākajām mutācijām Latvijas populācijā un to klīniskajiem fenotipiem, kas Latvijā līdz šim nav pētīts, un salīdzinātu atradni ar Eiropas valstīs iegūtajiem datiem .

3. Materiāli un metodes

3.1. 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 - primārās veselības aprūpes ārstu izraksti no ambulatorajām kartēm.

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

Katram slimniekam izveidota anketa (skat. Pielikums 21 "Sākotnējā informācija par IVGH slimnieku." un Pielikums 22 "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 skat. Pielikums 19 "Pieņemšana molekulāri ģenētiskam pētījumam." un Pielikums 20 "Informācija izmeklējamās personas vecākiem.")).

Pirms iesaistīšanas pētījumā visiem pacientiem IVGH diagnoze pierādīta, pamatojoties uz ESPE (*European Society of Pediatric Endocrinology*) izstrādātajiem diagnostiskiem kritērijiem (skat. Pielikumu 23 un Pielikumu 24).

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.

Bērni ar IVGH atradās BKUS bērnu un pusaudžu endokrinoloģijas centra aprūpē. Tā kā BKUS ir vienīgais bērnu endokrinoloģijas centrs Valstī, tad šajā izpētē iegūtie dati ļauj spriest gan par šo problēmu Latvijā kopumā, gan atsevišķos tās reģionos, gan 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.

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

3.1.1. 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 meitenēm tika izvērtēta pēc *Prader* virilizācijas skalas (skat. Pielikumu 25 "*Prader* virilizācijas skala").

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

Augšanas dinamika pacientiem tika izvērtēta pēc standartdeviāciju (SDS) augšanas līknēm (skat. Pielikumu 26 „Augšanas līknes”).

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

$17\alpha\text{OHPg}$ līmenis asinīs tika analizēts pēc laboratorijas references rādītājiem (skat. Pielikumu 27 „ $17\alpha\text{OHPg}$ līmeņa asinīs references rādītāji”).

3.1.2. 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 saslimšanas diagnozi bez klīniskām un laboratorām norādēm uz jebkādu citu veselības traucējumu.

3.1.3. Izslēgšanas kritēriji

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

Pētījumā netika iekļauti slimnieki ar neklasisko IVGH formu.

3.2. 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].

3.3. Lietotās metodes

3.3.1. CYP21/CYP21P molekulārai analīzei izmantotie praimeri

CYP21 / CYP21P molekulārai analīzei tika izmantoti Metabion International AG (Vācija) ražotie praimeri (skat. Tabulu 3-1).

Tabula 3-1.

CYP21 / CYP21P molekulas analīzei izmantotie praimeri.

Praimers	Oligonukleotīda sekvence	Praimera novietojums
21-P1	5'-TTCAGGCATTTCAG-GAAGGC-3'	Promotera rajons
21-P48rev	5'-CAGAGCAGGGAG-TAGTCTC-3'	(730-711)
21-P55	5'-CCTGTCCTTGGGAGAC-TACT-3'	(700-719)
21-P4rev	5'-TCTCGCACCCCAGTAT-GACT-3'	(2911-2892)
21-P55rev	5'-GCTGGAGTTGATT-TATTGGCT-3'	(3214-3194)
21-P-Ex1rev	5'-TGCAGCA(A/G)GTGCAAGAAGC-3'	(125-107)
21-P-Ex7rev	5'-TTGTGCTGCCTCAGCT-GCAT-3'	(1412-1393)

Tabula 3-1.

CYP21 / CYP21P molekulas analīzei izmantotie praimeri.

Praimers	Oligonukleotīda sekvence	Praimera novietojums
21-P-Ex9rev	5'-CCTCGGCGATGGT-GGCATT-3'	(2101-2083)
21-P-Ex10rev1	5'-ACATACCAGGCCA-GAACTCAT-3'	(2355-2335)
21-P-Ex1	5'-CTCTTGAGCTATAAGT-GGCA-3'	Promotera rajons
21-P-Ex5	5'-TCCTTGTCTGAACT-GAAAGT-3'	(1083-1103)
21-P-Ex9-2	5'-TCACTCAGCTCTGAG-CACT-3'	(1846-1864)
21-P-Ex10-3	5'-TTCAGCATCTCCG-GCTACG-3'	(2241-2259)
21-P-Ex10-5	5'-AAACACAGTGCTGCGA-GATC-3'	(2791-2810)
21-P-BF1	5'-CCCAGGTGGGGGCG GACACTA-3'	(314-294)
21-P-AF1	5'-CCCAGGTCGGGGGCG GACACCC-3'	(315-295)
21-P-21BR	5'-AATTAAGCCTCAATC-CTCTGCAGCG-3'	(3177-3153)
21-P-2HP	5'-GGGGGCATATCTTCAG GAGAAG-3'	(569-590)
21-P-B1	5'-CTTTGGGGCATC CCAATCCAA-3'	(522-541)
21-P-IN3R	5'-CTTACCTCACA GAACTCCTG-3'	(807-827)

3.3.2. 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.

3.3.3. 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 3-1). Viena parauga *PCR* amplifikācijas reakcijas pagatavošanai tika izmantots 10 mM dNTP maisījums - 0,1 mM, atbilstoši praimeru 200 mM, $MgCl_2$ - 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.

3.3.4. DNS sekvenēšana

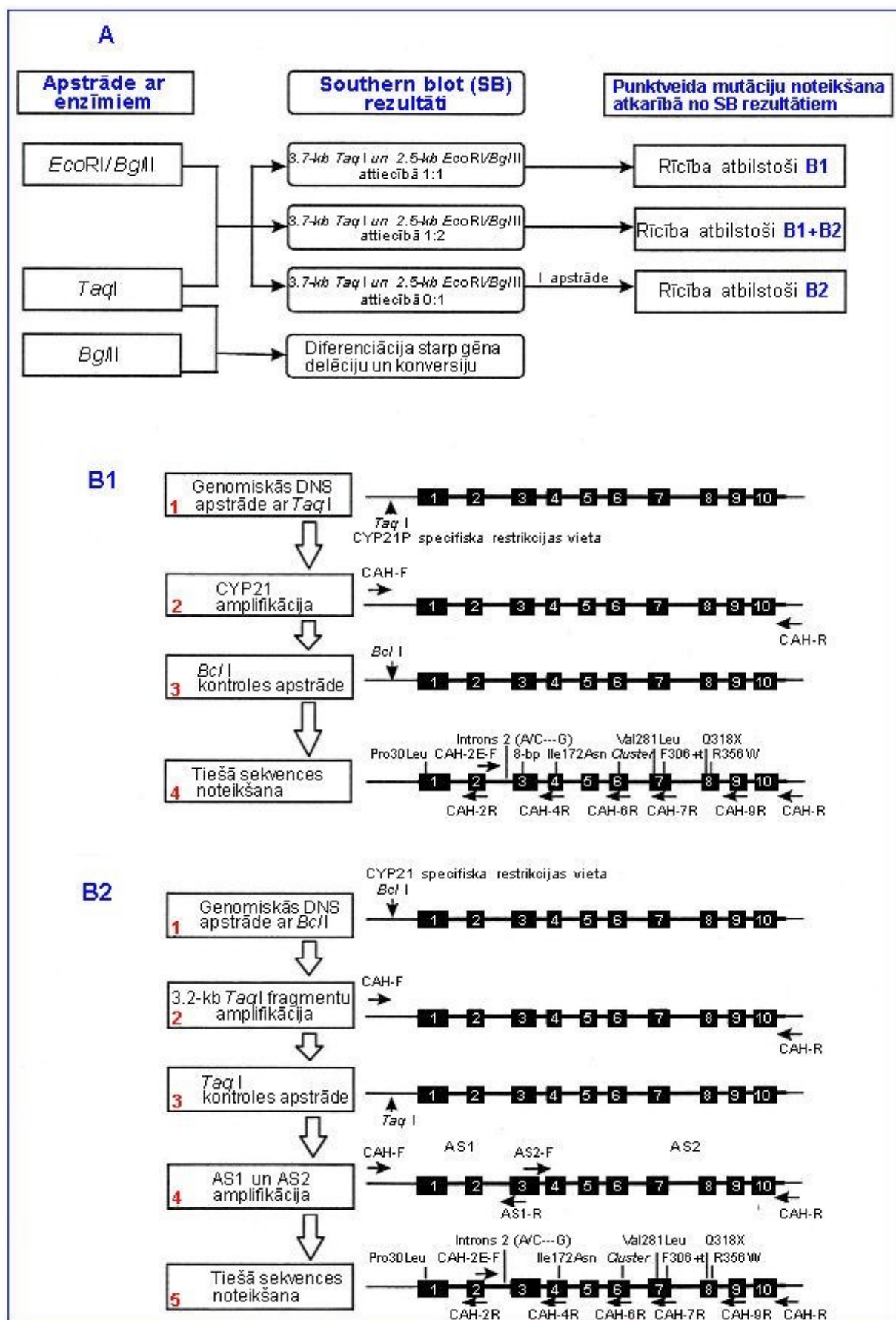
DNS sekvenēšanā izmantoja *Big Dye* kitu (*Biosystems, UK*). Reakciju veica saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Reakciju analizēja, izmantojot tos pašus praimerus, ko *PCR* reakcijā (skat. Tabulu 3-1). Attēlā 3-1 skat. *CYP21* gēna mutāciju noteikšanas paraugu.

Apzīmējumi attēla "B1" un "B2" daļās: pildīto četrstūru virknes ilustrē eksonu secību 21-hidroksilāzes gēnu lokusā; horizontālās bultas apzīmē attiecīgos *primerus* virzienā no 5' uz 3'; "F" un "R" apzīmē, attiecīgi, *sense primeru* un *antisense primeru*; vertikālās bultas norāda uz *CYP21* gēna un *CYP21P* pseidogēna restrikcijas vietām; abās šajās attēla daļās ir parādītas biežāk sastopamās mutācijas, kuras var atklāt nosakot DNS nukleotīdu sekveni [175, 176].

A. Atkarībā no *Southern blot* analīžu rezultātiem *CYP21* punktveida mutāciju turpmākā diagnostika ir atšķirīga. Svarīgs kritērijs šajā sakarībā ir 3.7-kb *Taq I* un 2.5-kb *EcoRI/BglII* fragmentu attiecība; respektīvi - ja šī attiecība ir 1:1, tad tas nozīmē, ka ar 3.2-kb *Taq I* fragmentu asociēta funkcionāla gēna šim slimniekam nav; ja, savukārt, minētā attiecība ir 1:2, tad tas nozīmē, ka viens funkcionālais gēns ir saistīts ar 3.7-kb *Taq I*, bet otrs - ar 3.2-kb *Taq I*; ja 3.7-kb *Taq I* fragmenta slimniekam nav (ir tikai *EcoRI/BglII* fragments), tad to attiecība ir 0:1 un tas nozīmē, ka šajā gadījumā ir ar 3.2-kb *Taq I* saistīts funkcionālais gēns, bet nav ar 3.7-kb *Taq I* saistītā funkcionālā gēna.

B1. Šajā attēla daļā ilustrēta ar 3.7-kb *Taq I* fragmentu saistīto *CYP21* gēna mutāciju noteikšana 4 soļos. 1. solis: *CYP21P* atšķelšana ar *Taq I* (šis enzīms atšķel tikai *CYP21P*, bet *CYP21* saglabājas); 2. solis: *CYP21* amplifikācija (jo *CYP21P* ir atšķelts) ar *primeriem* CAH-F un CAH-R; 3. solis: kontroles apstrāde ar *Taq I*, lai pārliecinātos, ka *CYP21P* ir ticis pietiekami kvali-

CYP21 gēna mutāciju noteikšana (analīzes paraugs) [19].



tatīvi atšķelts; 4. solis: DNS nukleotīdu sekvenču noteikšana, lietojot attēlā uzrādītos *primerus* (ja eksonā 3 ir heterozigota 8-bp delēcija, tad lieto arī *primeru* CAH-2E-F).

B2. Šajā attēla daļā ilustrēta to *CYP21* gēna mutāciju noteikšana, kuru rašanās ir saistīta ar *CYP21P* pseidogēnā tipiski esošajiem 3.2-kb *Taq I* fragmentiem. 1., 2. un 3. solis: izdara tikai tad, ja *Southern blot* hibridizācijā ir iegūts 3.7-kb *Taq I* fragments (lai, tādā gadījumā, eliminētu ar 3.7-kb *Taq I* fragmentu saistītos *CYP21* gēnus); 4. solis: AS1 un AS2 fragmentu amplifikācija (tā ir iespējama tikai tad, ja eksonā 3 nav 8-bp delēcijas); 5. solis: DNS nukleotīdu sekvenču noteikšana, lietojot Attēlā 3-1 uzrādītos *primerus*.

CYP21 gēna mutāciju noteikšana (analīzes paraugs) [19].

3.3.5. *Southern Blot*

Southern Blot ir elektroforētiska metode, kuru lieto, analizējot DNS paraugu, lai atdalītu un identificētu kādus noteiktus DNS fragmentus.

Metode apvieno DNS elektroforēzi agarozes gēlā atsevišķu tās fragmentu atdalīšanai pēc lieluma ar metodēm šo fragmentu pārnešanai uz filtra membrānu tālākai to hibridizācijai.

Southern Blot tā nosaukta pēc tās autora britu zinātnieka *Edwin Southern* vārda [221].

Ar *Southern Blot* metodi var noskaidrot, vai kāds konkrēts gēns analizējamajā DNS materiālā atrodas un cik tā kopijas ir organisma genomā, līdzību starp etalona gēnu un gēnu izmeklējamajā paraugā, kādas restrikcijas endonukleāzes gēns spēj atpazīt un vai gēna klonēšanas procesā ir notikušas kādas tā izmaiņas.

Standarta restrikcijas enzīmi, kurus lieto analizējamā DNS parauga sadalīšanai fragmentos ir *Taq I* un *Bgl II*.

Southern Blot analīzes gaitā DNS paraugs ar restrikcijas enzīmu palīdzību tiek sadalīts attiecīgos fragmentos, kuri pēc tam gēla elektroforēzē tiek atdalīti pēc lieluma un pārnesti uz speciālu filtra membrānu. Iegūtie DNS parauga fragmenti turpmāk tiek inkubēti ar iezīmētu standarta vienspirāles DNS. Saistoties ar komplementārām sekvencēm, no standarta DNS veidojas atbilstoša DNS dubultspirāle, pie kuras fiksējušies analizējamās DNS fragmenti ir konstatējami rentgenoloģiski. Respektīvi, iezīmētās standarta DNS fiksēšanās pie kāda konkrēta analizējamās DNS fragmenta uz filtra membrānas norāda, ka šī fragmenta nukleotīdu sekvence ir komplementāra standarta DNS sekvencei.

Southern Blot analīze veikta pēc ražotāja dotās instrukcijas.

3.3.6. HLA gēnu haplotipēšana

3.3.6.1. 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 ciklerā (*Perkin Elmer, Cetus, Connecticut, USA*). HLA B amplifikācija veikta 30 ciklos: denaturācija 95^o C temperatūrā 1 minūti, hibridizācija - 55^o C temperatūrā 1 minūti, sintēze - 72^o C 2 minūtes. HLA A amplificēti 35 cikli: denaturācija 94^o C temperatūrā 1 minūti, hibridizācija - 62^o C 1 minūti un sintēze - 72^o C temperatūrā 2 minūtes. HLA otrā eksona amplifikācijai tika lietoti praimeri no *Erlich, Bugawan*.

3.3.6.2. HLA B gēnu tipēšana

HLA B gēnu tipēšana veikta ar zemas izšķiršanas polimerāzes ķēdes reakciju (*low resolution PCR-SSP*), lietojot sekvenču specifiskos praimerus atbilstoši ražotāja noteiktajai metodikai (*BA Gene; BAG Lich, Vācija*). Identificēti galvenie HLA B alēļu tipi [222].

3.4. 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* (χ^2 tests),
- * CI analīze - (Wilsona 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 $p=0,05$.

4. Rezultāti

4.1. Klīnisko gadījumu piemēri

Piemērs 1. Bērns V.N. dzimis 1997.gada aprīlī reģionālā slimnīcā. Bērns no IV grūtniecības, I dzemdībām dzimis 39./40.gestācijas nedēļā plānveida Ķeizargriezienā sakarā ar priekšguļu. Dzimšanas svars 3850 g, garums 54 cm, pēc Apgares 6/8. Grūtniecība noritējusi it kā normāli. Iepriekš mātei 3 spontānie aborti. Dzemdību nodaļā noteikts dzimums – zēns.

3.dzīves dienā vispārējā stāvokļa pasliktināšanās – vemšana, anoreksija, apātija, muskulatūras hipotonuss, mikrocirkulācijas traucējumi, dehidratācija. Sakarā ar aizdomām par jaundzimušo sepsi tiek uzsākta antibakteriāla terapija, kas ir bez efekta. Stāvoklim pasliktinoties, bērnu pārved uz Bērnu Klīnisko Universitātes Slimnīcu ar izteiktiem hemodinamikas traucējumiem un šoku.

Bērnā negatīva svara dinamika - - 500 g kopš dzimšanas, ātrā dzimumorgānu izteikta pigmentācija, testis nepalpē, ātrās genitālijas neskaistas. Diferenciāldiagnostika ar hipospādiju un dzimumdiferenciācijas traucējumiem. Ņemot vērā klīniku un anamnēzes datus, aizdomas par iedzimtu virsnieru garozas hiperplāziju – klasisko sālszaudes formu ar IV – V pakāpes virilizāciju (pēc Prader) meitenei (skat. Attēlu 4-1).

Izmeklējumu rezultāti: kariotips – 46XX, hiperkaliēmija – 7.9 mmol/l, hipoglikēmija - 2.9 mmol/l, hiponatriēmija – 128 mmol/l, 17-OH-P līmenis asinīs ievērojami paaugstināts – 198 ng/ml.

Apstiprinoties virsnieru garozas hiperplāzijas sālszaudes formas diagnozei, tiek nekavējoties uzsākta akūtas virsnieru garozas mazspējas terapija - intravenoza rehidratācija ar 0,9% NaCl šķīdumu un 5% glikozes šķīdumu un intravenoza prednizolona ievade.

Vispārējam stāvoklim stabilizējoties, normalizējoties hemodinamikai, mikrocirkulācijai, elektrolītu un glikēmijas rādītājiem, pāriet uz pastāvīgu aizvietojošu perorālu terapiju ar glikokortikoidiem un mineralokortikoidiem - 1997. gadā slimniecei nozīmēts prednizolons 10 mg dienā un kortinefs 5 mg dienā, bet 2001. gadā prednizolona terapija nomainīta pret hidrokortizonu 20 mg dienā.

Pēc diagnozes ģenētiskas apstiprināšanas māte tika informēta par bērna dzimumu – meitene. Ģimeni konsultēja bērnu endokrinologs, urologs, ginekologs, psihologs. Mainīts bērna dzimums – no fenotipiskā – zēns uz ģenētisko – meitene.

Pierādīta mutācija 12G/12G.

1 gada un 1 gada 5 mēnešu vecumā veiktas etapveida ātrās genitālijas plastikas operācijas.

Meitene regulārā bērnu endokrinologa dinamiskā novērošanā. Pastāvīgi saņem substitūcijas terapiju ar *Hydrocortisonum* un *Cortinef*. Virsnieru garozas hiperplāzijas kompensācija laba, akūtas virsnieru mazspējas krīzes nav bijušas.

Māte apmācīta *Hydrocortisonum* devu korekcijai stresa vai interkurentu slimību gadījumā.

Attēls 4-1.

Izteikta IVGH-skartas meitenes virilizācija (attēls no I. Dzīvītes personīgā fotoarhīva).



Piemērs 2. Bērns S.J. dzimis 1999.gadā no III grūtniecības, I dzemdībām 40.gestācijas nedēļā ar svaru 3400 g, garums 52 cm, pēc Apgares 7/8. Mātei anamnēzē 2 spontānie aborti. Grūtniecības pārtraukšanās draudi 3. un 6. gestācijas mēnesī, ārstējusies stacionārā.

4. dzīves dienā bērnam attīstās akūtas virsnieru mazspējas klīnika, kādēļ bērns stacionēts Bērnu Klīniskajā Universitātes Slimnīcā.

Konstatēta dehidratācija, mikrocirkulācijas traucējumi, hipoglikēmija un apskatē – dzimumdiferenciācijas traucējumi ar neskaidrām ārējām genitālijām, kas atbilst *Prader* virilizācijas skalas V pakāpei (skat. Attēlu 4-2A).

Izmeklējumu rezultāti: kariotips – 46,XX, hiperkaliēmija 6.4 mmol/l, hiponatriēmija – 127 mmol/l, hipoglikēmija – 2.3 mmol/l, izteikti paaugstināts 17-OH-P līmenis asinīs – 168 ng/ml.

Pierādīta diagnoze – iedzimta virsnieru garozas hiperplāzija, sālszaudes forma, V pakāpes virilizācija.

Pierādīta mutācija – del/R356W.

Tiek uzsākta akūtas virsnieru mazspējas krīzes terapija un, vispārējam stāvoklim stabilizējoties, pāriet uz pastāvīgu aizvietojošu perorālu terapiju ar glikokortikoidiem un mineralokortikoidiem.

Pēc diagnozes ģenētiskas apstiprināšanas, vecāki tiek informēti par bērna dzimumu – meitene.

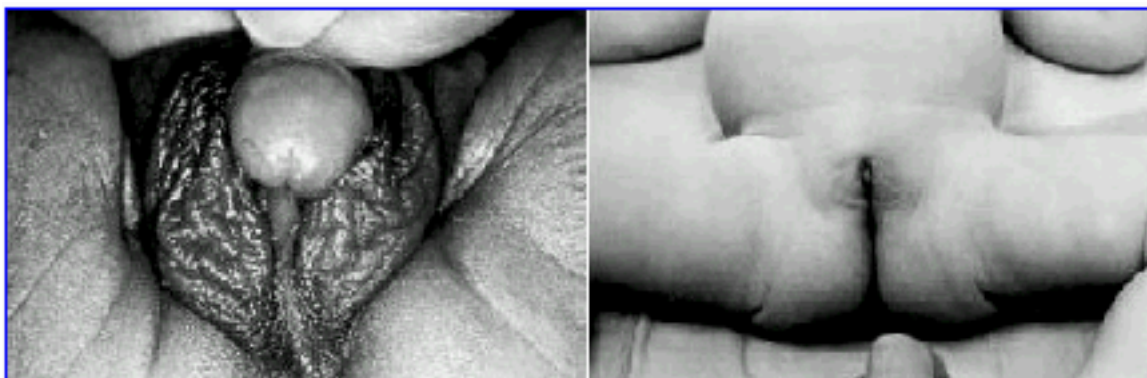
1 gada 2 mēnešu un 1 gada 10 mēnešu vecumā veiktas etapveida ārējo genitāliju plastiskās operācijas.

2001.gadā mātei IV grūtniecība. Ņemot vērā, ka iepriekšējam bērnam IVGH, mātei 10.gestācijas nedēļā veikta amniocentēze, konstatēts augļa kariotips – 46,XX un uzsākta prenatalā ārstēšana ar deksametazonu devā 1 mg diennaktī. Grūtniecība norit bez sarežģījumiem un 39.gestācijas nedēļā piedzimst vesela meitenīte ar svaru 3320 g.

Prenatālā terapija novērsusi ārējo genitāliju virilizāciju (skat. Attēlu 4-2B) un IVGH attīstību (17-OH-P līmenis normas robežās – 1.03 ng/ml).

Attēls 4-2.

Slimnieces S.J. terapijas rezultāts (attēli no I. Dzīvītes personīgā fotoarhīva).



Attēls A

Attēls B

Attēlā 4-2A redzama prenatali neārstētas IVGH-skartas meitenes ārējo genitāliju virilizācija ar izteiktu klitora palielinājumu, penīlas lokalizācijas uretras atveri un lielo kaunuma lūpu skrotalizāciju.

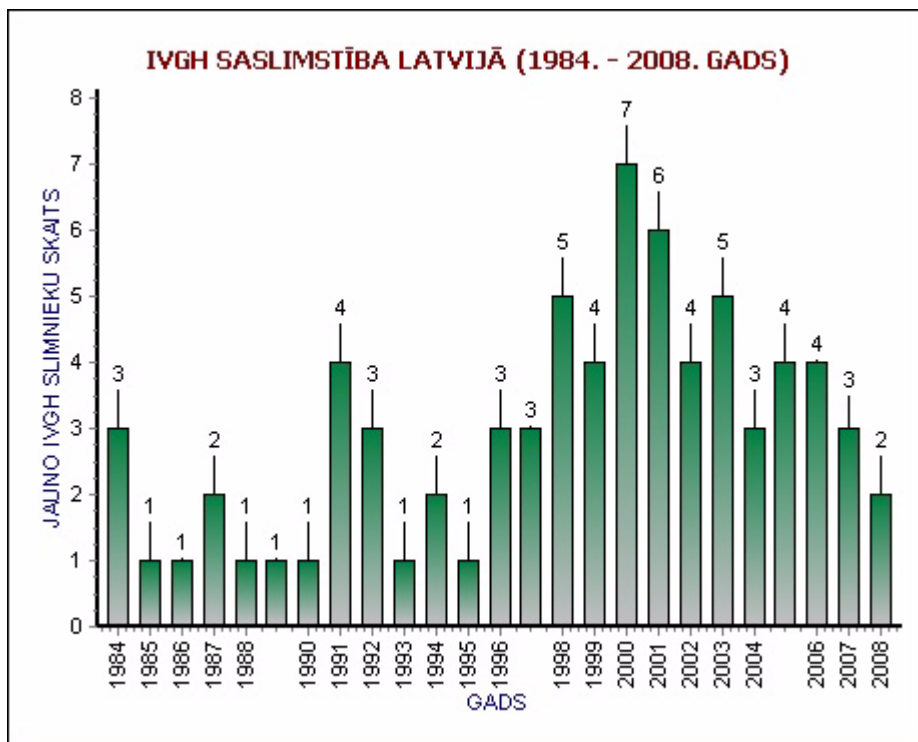
Attēlā 4-2B redzama ārstētas IVGH-skartas meitenes normāla ārējo genitāliju attīstība.

4.2. Epidemioloģiskās izpētes atradne

Primāri diagnosticēto IVGH slimnieku skaits gadā novērojuma laikā svārstīgs. 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 (resp. 1999.-2002.) ir atklāti vidēji 5 jauni IVGH slimnieki gadā (skat. Attēlu 4-3).

Turpinot novērojumus pēc izpētes darba noslēguma (līdz 2008. gadam), redzama tendence atklāto IVGH pacientu skaitam atkal samazināties.

Saslimstība ar IVGH Latvijā (1984. - 2008.).



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 (skat. Attēlu 4-4).

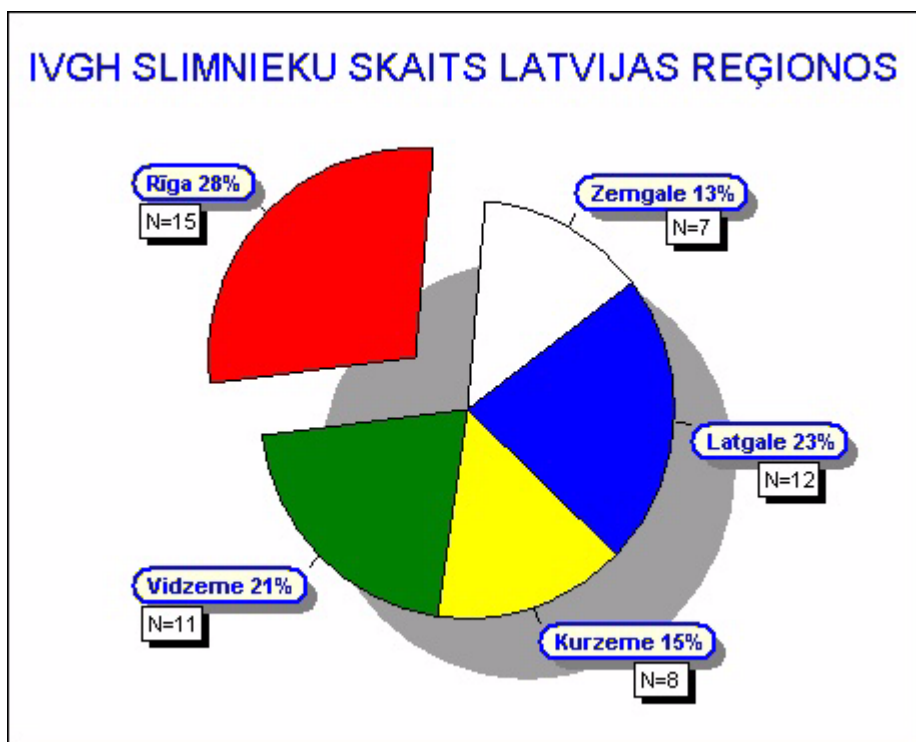
Redzams, ka no Latvijas administratīvām vienībām vairāk IVGH slimnieku dzīvo lielajās pilsētās - Rīgā, Daugavpilī, Liepājā, Jūrmalā, Valmierā un Jelgavā, bet mazāk - Latvijas dienvidu un rietumu rajonos (skat. Attēlu 4-5).

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 (skat. Attēlu 4-6).

Izpētes darbā konstatētā tendence jauno IVGH slimnieku skaitam pieaugt saglabājas arī attiecībā uz IVGH klasiskā tipa vienkārši virilizējošās formas slimniekiem - ja novērojumu perioda sākumā šo slimnieku skaits gadā svarstījās ap vienu, tad izpētes perioda beigu posmā tas vidēji ir divi (skat. Attēlu 4-7).

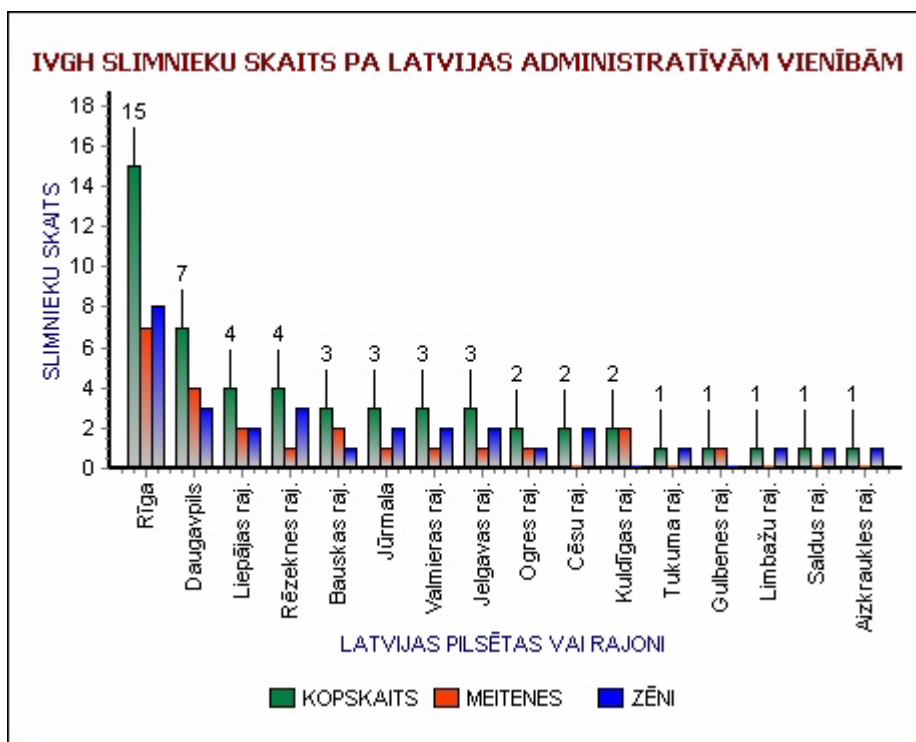
Attēls 4-4.

IVGH slimnieku skaita sadalījums pa Latvijas reģioniem.



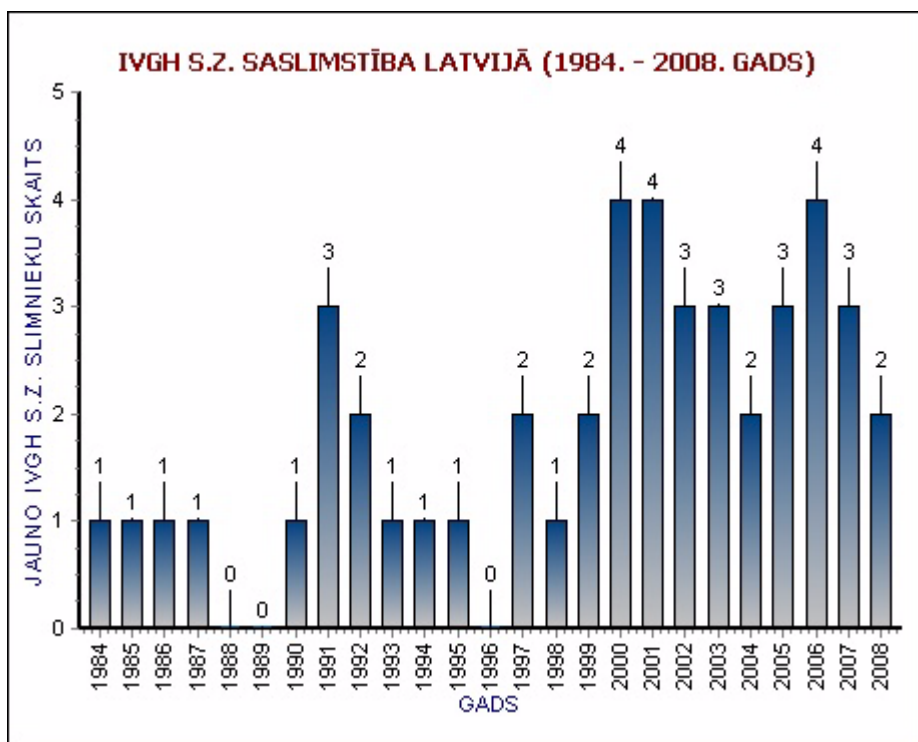
Attēls 4-5. .

IVGH slimnieku skaits pa Latvijas administratīvām vienībām.



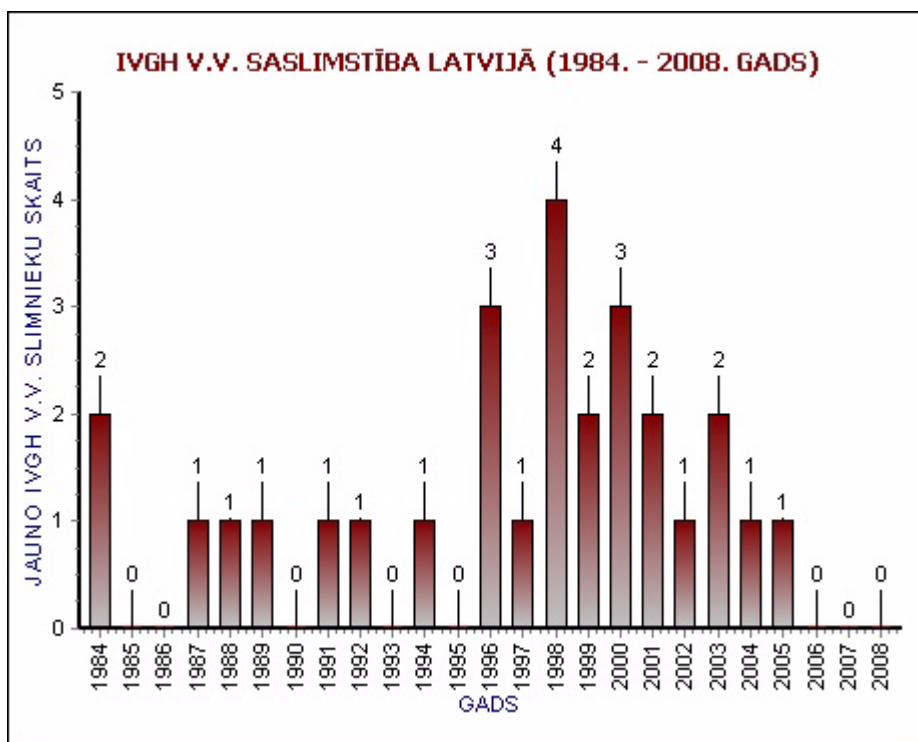
Attēls 4-6.

Saslimstība ar IVGH sālszaudes formu Latvijā (1984.-2008. gads).



Attēls 4-7.

Saslimstība ar IVGH vienkārši virilizējošo formu Latvijā (1984.-2008. gads).



Zinot, ka vienkārši virilizējošās 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 (skat. Attēlu 4-7).

4.3. Klīniskā materiāla izvērtējums

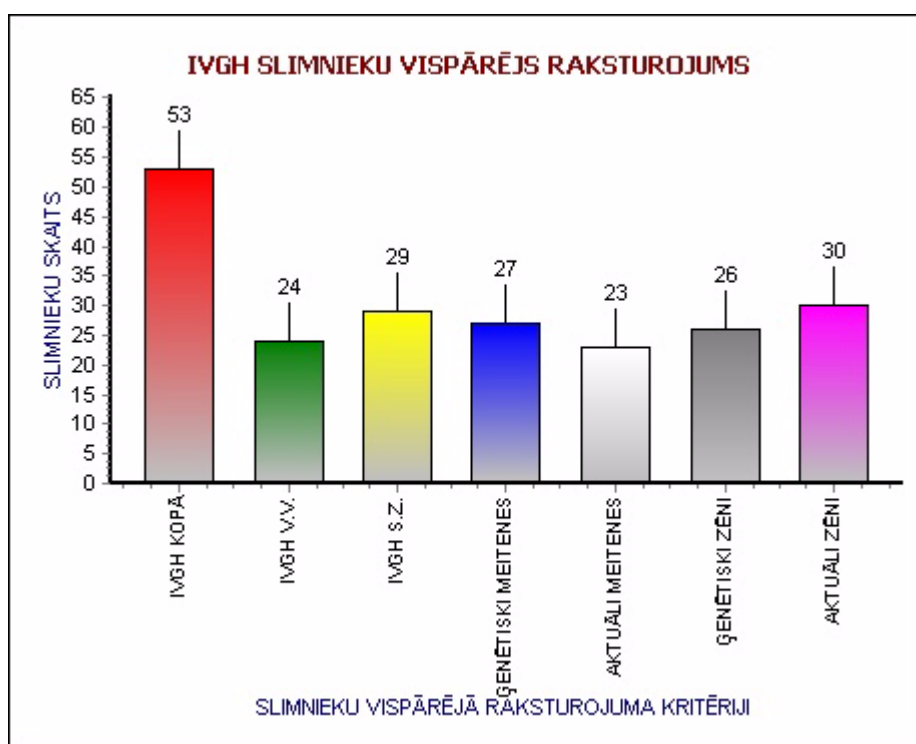
4.3.1. Slimnieku struktūra

Slimnieku 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 4-8 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.

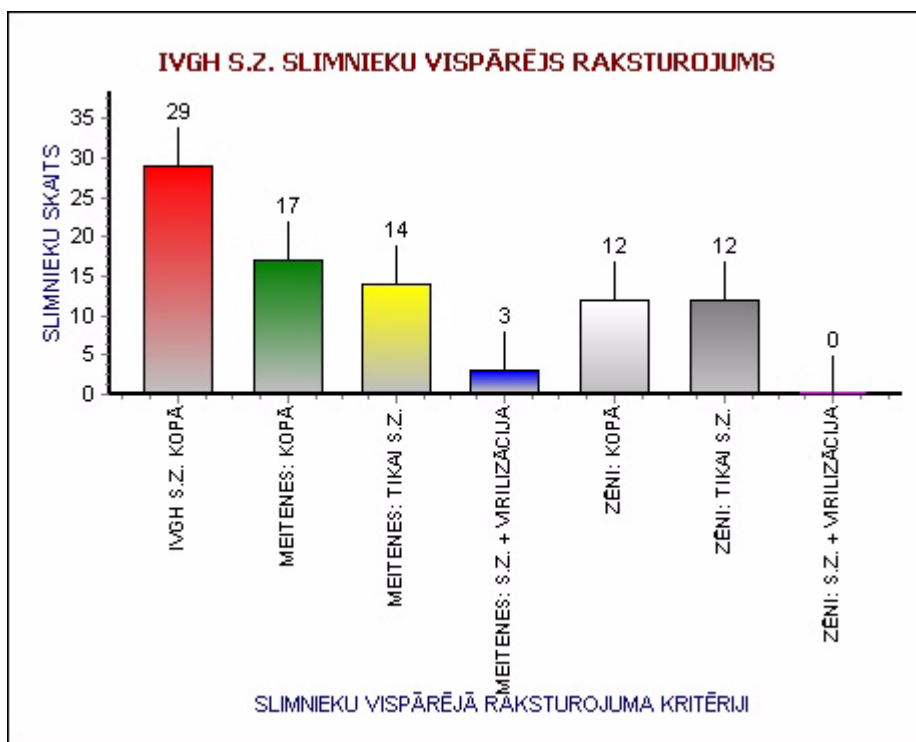
Attēls 4-8.

IVGH slimnieku vispārīgs raksturojums.



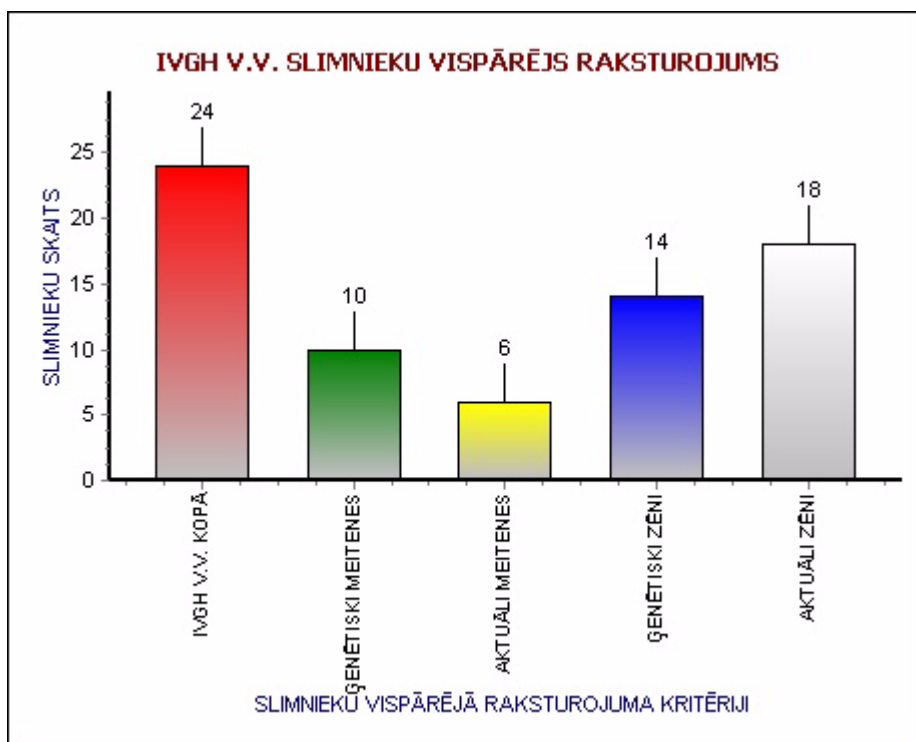
Attēls 4-9.

IVGH sālszaudes formas slimnieku vispārējs raksturojums.



Attēls 4-10.

IVGH vienkāršās virilizējošās formas slimnieku vispārīgs raksturojums.



Starp izpētē iekļautajiem IVGH sālszaudes slimniekiem vairāk ir meitenes. Iegūtie rezultāti, kā redzams Attēlā 4-9, liecina, ka izteikta virilizācija nav šīs formas vadošais simptoms.

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 4-10 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.

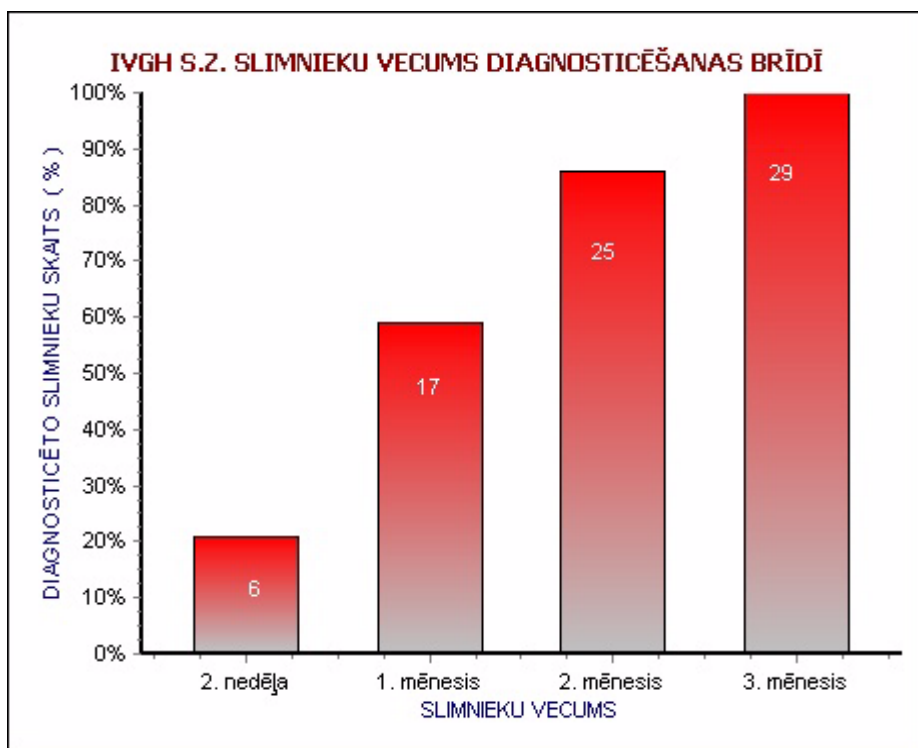
4.3.2. Pacientu raksturojums pēc dzimšanas parametriem, saistībā ar IVGH diagnosticēšanas vecumu

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 noteikta visiem šīs grupas slimniekiem (skat. Attēlu 4-11).

Savukārt, 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 (skat. Attēlu 4-12).

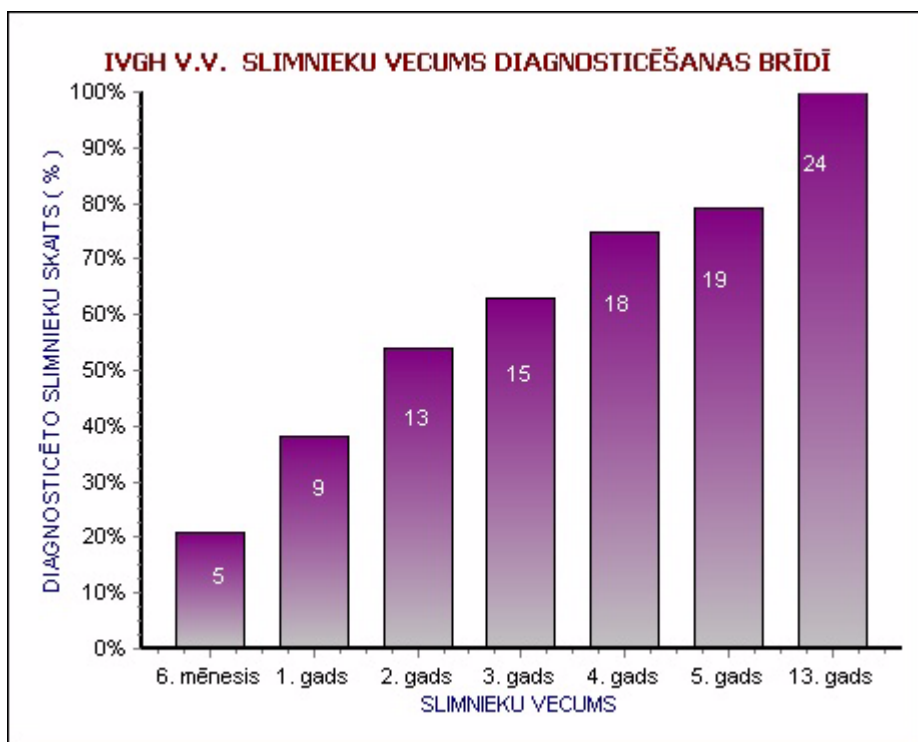
Attēls 4-11.

IVGH sāls zaudes formas pacientu vecums diagnosticēšanas brīdī.



Attēls 4-12.

IVGH vienkāršās virilizējošās formas pacientu vecums diagnosticēšanas brīdī.

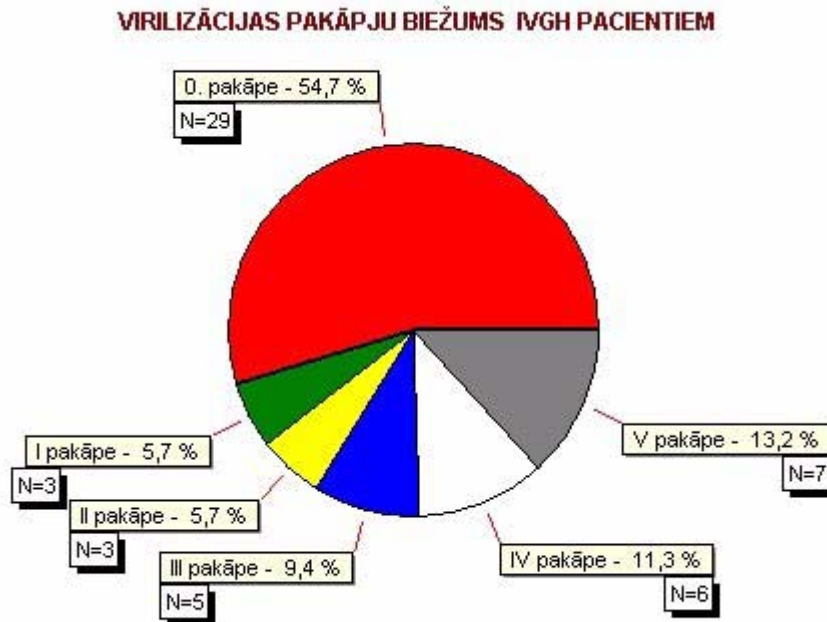


4.3.3. Pacientu raksturojums pēc virilizācijas pakāpes

Trešdaļai pētījumā iekļauto IVGH slimnieku ir tikusi konstatēta izteikta virilizācija (III pakāpe pēc Prader un augstāk).

Attēls 4-13.

Virilizācijas pakāpju biežums IVGH slimniekiem.



Tajā pat laikā, vairāk kā pusei slimnieku virilizācija nav konstatēta. Pirmkārt tas attiecas uz zēniem, kam virilizāciju var pamanīt tikai ļoti izteiktos gadījumos. Papildus tam, kā redzams Attēlā 4-13, 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.

Kopējais IVGH slimnieku virilizācijas biežums (ap 45%) saglabājas līdzīgi sālszaudes un vienkārši virilizējošās formas gadījumā (skat. Attēlu 4-14).

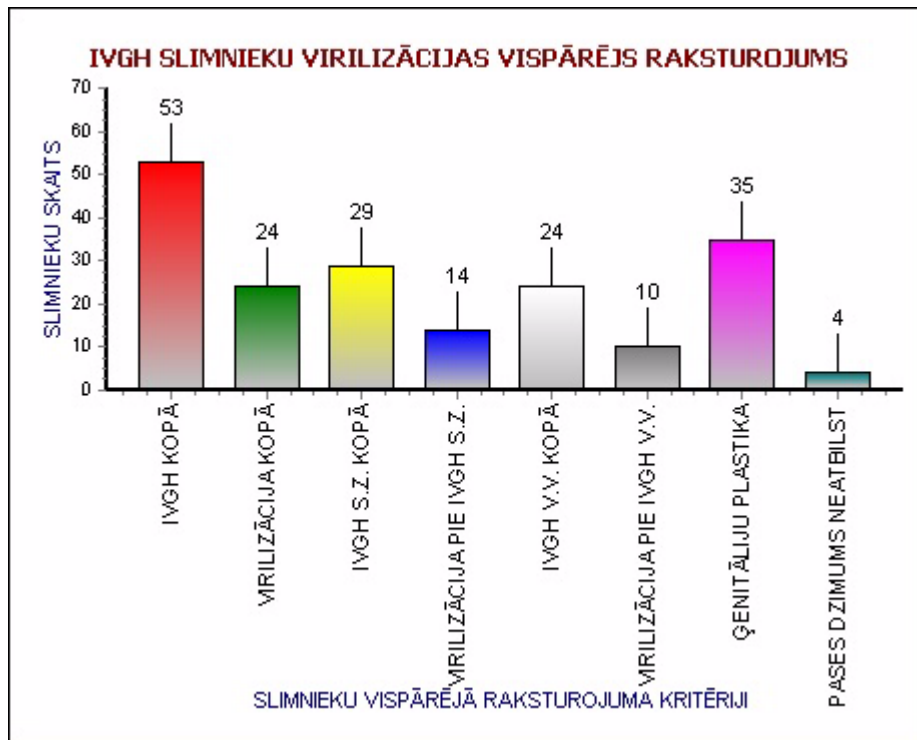
IVGH vienkārši virilizējošās formas slimniekiem mēdz būt izteiktākas pakāpes virilizācija, kas var novest pie ģenētiskā un pases dzimuma neatbilstības.

No visiem 53 pētījumā iekļautajiem IVGH slimniekiem, virilizāciju novēroja 24, t.i., 45,3%.

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

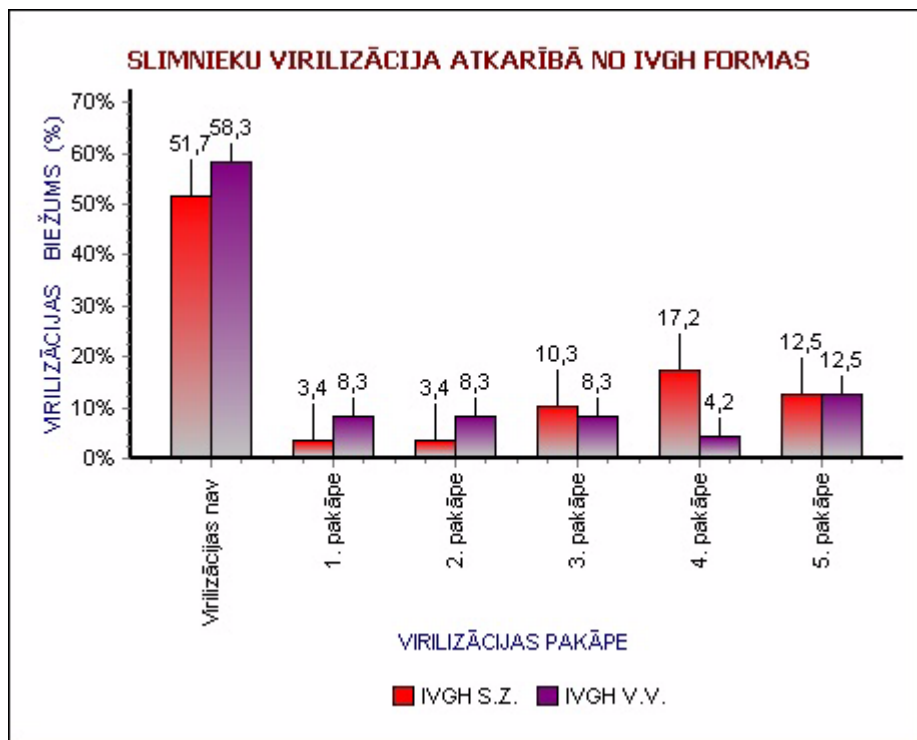
Attēls 4-14.

IVGH slimnieku virilizācijas vispārējs raksturojums (pēc Prader).



Attēls 4-15.

Slimnieku virilizācija atkarībā no IVGH formas.



IVGH vienkārši virilizējošās formas slimniekiem līdzīgi sastopamas visas virilizācijas pakāpes, kamēr sālszaudes formas slimniekiem vieglas pakāpes virilizācija sastopama retāk, bet izteiktākas pakāpes virilizācija - biežāk (skat. Attēlu 4-15).

IVGH sālszaudes formas gadījumā konstatētā smagā virilizācija jāsaista ar 21-hidroksilāzes pilnīgu deficītu, kas izraisa augstu hiperandrogēniju jau intrauterīnā periodā un nosaka dzimum-diferenciācijas traucējumu rašanos.

Pētījumā iekļautajām IVGH slimniececēm kopā veiktas 35 genitoplastiskas operācijas.

Visbiežāk ir bijis nepieciešams veikt klitora korekciju tā palielinājuma dēļ.

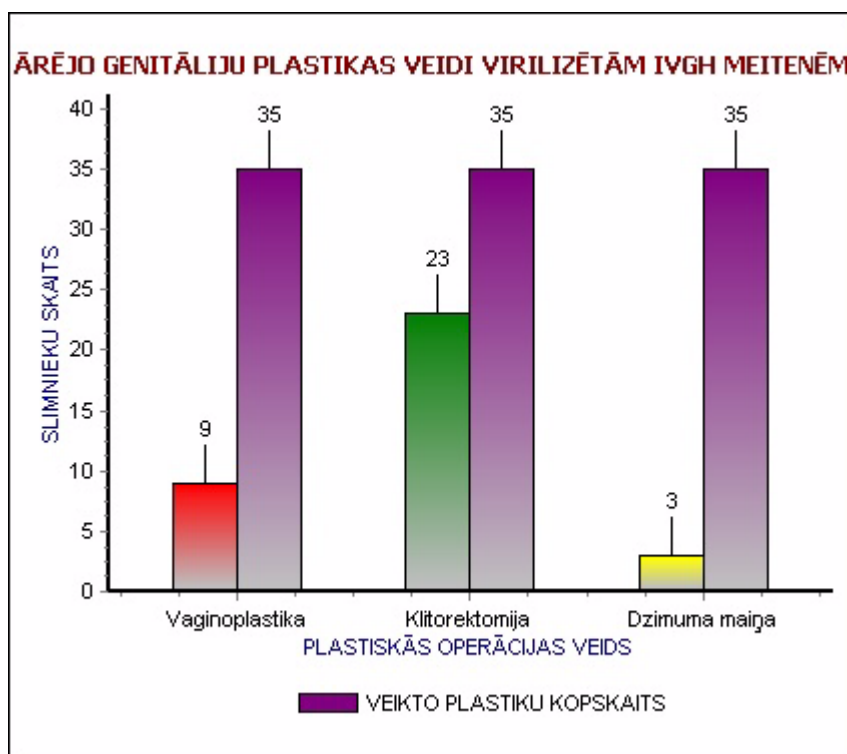
Vaginas plastika bijusi nepieciešama, galvenokārt, urogenitālā sīnusa likvidēšanai.

3 gadījumos veikti kompleksi pasākumi dzimuma maiņai (skat. Attēlu 4-16 un Attēlu 4-17).

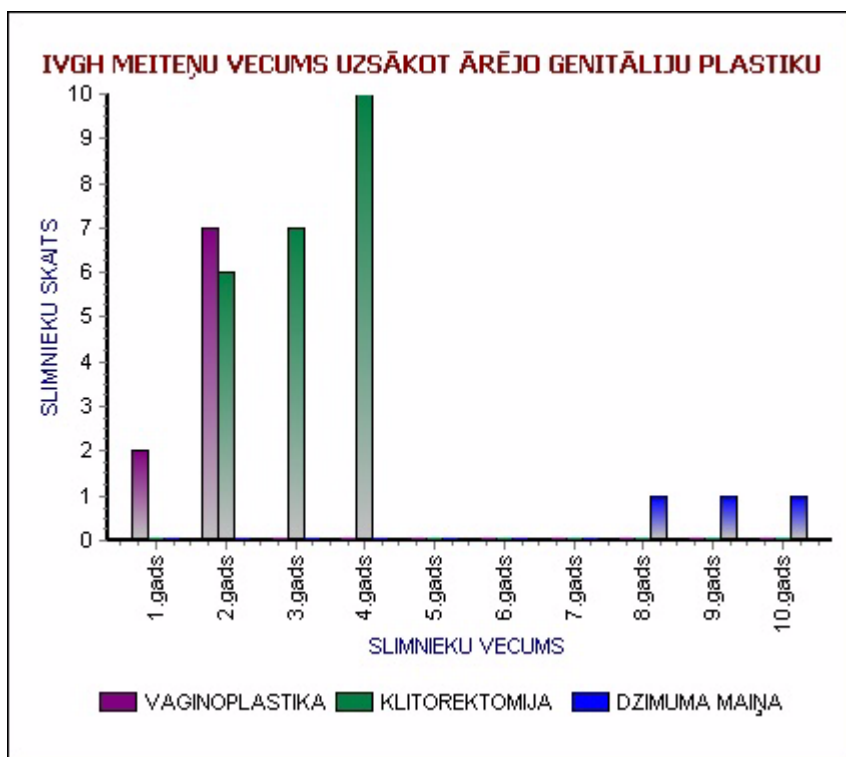
Ģenētiskā dzimuma maiņa (grūta medicīniska, juridiska un psihosociāla problēma) notikusi 3 gadījumos, t.i. 10% no kopējo operāciju skaita (95% CI 3.5 - 25.6%).

Attēls 4-16.

Ārējo genitāliju plastikas veidi virilizētām IVGH meitenēm.



IVGH meiteņu vecums, uzsākot ārējo genitāliju plastiku.



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.

Visas genitāliju plastiskās operācijas veiktas Bērnu Klīniskās Universitātes Slimnīcas Bērnu Ķirurģijas klīnikā bērnu ginekoloģes Ilonas Auziņas vadībā.

4.4. Pacientu raksturojums

Tabula 4-1.

Pacientu vispārīgs raksturojums.

Slimības forma	Skaitis	Procenti
Sālszaudes	29	54,7
Vienkārši virilizējošā	24	45,3
Kopā	53	100

Sālszaudes forma diagnosticēta 29 pacientiem, t.i. - 54.7% (CI 44.5% - 67.3%), bet vienkārši virilizējošā forma - 24 pacientiem, t.i. - 45.3% (CI 32.7% - 58.5%).

Tabula 4-2.

Statistiskās neatkarības noteikšana.

Slimības forma		Dzimums		Kopā
		Zēns	Meitene	
Sālszaudes	Skaits*	12	17	29
	%*	40,0%	73,9%	54,7%
Vienkārši virilizējošā	Skaits	18	6	24
	%	60,0%	26,1%	45,3%
Kopā	Skaits	30	23	53
	%	100,0%	100,0%	100,0%

* Skaits - empīriskais attiecīgās pazīmes novērojumu skaits.; % - procentuālais attiecīgās pazīmes sadalījums rindā.

IVGH sālszaudes forma konstatēta 54,7% gadījumu, bet vienkārši virilizējošā forma - 45,3% gadījumu. Abu IVGH formu biežumam ir dzimuma difference - sālszaudes forma diagnosticēta 40% zēnu un 73,9% meiteņu, bet vienkārši virilizējošā forma - 60% zēnu un 26,1% meiteņu.

Izolēta sālszaude diagnosticēta 15 pacientiem - 28.3% (CI 18 - 41.6%), no tiem - 3 meitenēm - 13.0% no visām meitenēm un 12 zēniem - 40% no zēniem (OR = 4.44; 95% CI -27% (-46.6% - -2.4%); $p = 0.03$; $\chi^2 = 4.67$).

Sālszaude ar neskaidru dzimumu diagnosticēta 14 pacientiem - 26.4% (CI 16.4 - 39.6%), visas 14 - meitenes - 60.9% no visām meitenēm (CI 37.8 - 77.8%); $p < 0.01$; $\chi^2 = 24.82$).

Vienkārši virilizējošā forma, kad pases dzimums atbilda ģenētiskajam, konstatēta 20 pacientiem - 37.7% (CI 25.9 - 51.2%), no tiem - 6 meitenes (26.14% no visām meitenēm) un 14 zēni (46.7% no zēniem) (OR = 2.5; 95% CI - 20.6% (-42.5 līdz +5.6%); $p = 0.13$; $\chi^2 = 2.35$).

Vienkārši virilizējošā forma, kad pases dzimums nesakrīt ar ģenētisko, konstatēta 4 pacientiem - 7.5% (CI 3.0 - 17.9%), no tiem - 4 jeb 13.3% no zēniem (95% CI - 13.3%, no -29.7 līdz +3.1%); $p = 0.07$; $\chi^2 = 3.32$).

Kopā analizētas 23 meitenes - 43.4% (CI 31.0 - 56.7%) un 30 zēni - 56.6% (CI 43.3 - 69.0%). Pēc pases dzimuma zēniem - 4 ģenētiskais dzimums - meitene - 13.3% (95% CI 5.3 - 29.7%).

4.4.1. Pacientu raksturojums pēc gestācijas un dzimšanas parametriem, saistībā ar IVGH diagnosticēšanas vecumu

Zemāk statistiski apstrādāti izpētē iegūtie dati (skat. Pielikumu 6) par pacientu gestācijas laika un dzimšanas svara saistību ar IVGH diagnosticēšanas vecumu.

Tabula 4-3.

Pacientu dzimšanas laika un svara saistība ar IVGH diagnosticēšanas vecumu.

Kritērijs	N*	Min*	Max*	Vidējais*	SDS*
Gestācijas nedēļa	53	28,5	41,5	38,6	2,34
Dzimšanas svars (g)	53	1300	4450	3340,9	671,03
Diagnosticēšanas vecums (mēneši)	53	0,17	156,00	18,4	33,65

* N - pacientu skaits; Min - $X_{\min}$; Max - $X_{\max}$; Vidējais - aritmētiskais vidējais $\bar{X}$;
SDS - standartklūda $S_{\bar{X}}$.

Tabulā 4-4 redzams, ka izpētē iekļautajiem IVGH slimniekiem gestācija ilgusi vidēji 38,6 nedēļas, dzimšanas svars bijis vidēji 3340,9 g un ka IVGH diagnosticēta vidēji 18,4 mēnešu vecumā.

Tabula 4-4.

Grupu statistika.

Kritērijs	Dzimums	N*	Vidējais*	SD*	SDS*
Gestācijas nedēļa	Zēns	30	38,5	2,22	0,40
	Meitene	23	38,7	2,54	0,53
Dzimšanas svars (g)	Zēns	30	3267,0	582,70	106,39
	Meitene	23	3437,4	774,30	161,45
Diagnosticēšanas vecums (mēnešos)	Zēns	30	15,4	24,11	4,40
	Meitene	23	22,3	43,39	9,05

* N - pacientu skaits; Vidējais - kritērija aritmētiski vidējā vērtība; SD - standartdeviācija; SDS - standartklūda.

No tabulā redzamajiem izpētes datiem var spriest, ka gestācijas laiks IVGH-slimiem zēniem un meitenēm neatšķiras, dzimšanas svars ir lielāks meitenēm ($p=0,05$), bet IVGH diagnosticēta agrāk zēniem (vidēji - 15,4 mēnešu vecumā) nekā meitenēm (vidēji - 22,3 mēnešu vecumā).

Tabula 4-5.

Regresijas koeficientu tabula.

Dzimums	Modelis		Nestandardizētie koeficienti		Standartizētie koeficienti		
			B	Std. klūda	Beta	t	P
Zēns	1	(Konstante)	5161,54	1061,2		4,86	0,001
		Gestācijas nedēļa	218,45	27,46	0,83	7,95	0,001
Meitene	1	(Konstante)	5114,99	1787,3		2,86	0,009
		Gestācijas nedēļa	220,77	46,04	0,72	4,79	0,001

a Atkarīgais mainīgais: Dzimšanas svars, g.

Tabula 4-6.

Divu neatkarīgu izlašu vidējo pārbaude ar testu pārbaudes rīku.

Kritērijs	Testu pārbaudes rīks	Izlases vid. un ģenerālkopas vid. starpība		Vidējās starpības 95% ticamība	
	P vērtība	Vidējā difference	Std. kļūdas difference	Apakšējā robeža	Augšējā robeža
Gestācijas nedēļa	0,81	-0,16	0,65	-1,47	1,16
Dzimšanas svars (g)	0,37	-170,39	186,27	-544,34	203,56
Diagnosticēšanas vecums (mēnešos)	0,46	-6,94	9,37	-25,75	11,87

* Hipotēzes par divu neatkarīgu izlašu vidējiem pārbauda ar testu pārbaudes rīku.

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.

Tā kā p vērtība ir lielāka par 0.05, tad arī būtiskuma līmeni alfa = 0.05 nulles hipotēzi noraidīt nevar.

4.4.2. Pacientu raksturojums pēc virilizācijas pakāpes

Tabula 4-7.

Pacientu virilizācijas vispārīgs raksturojums.

Virilizācijas pakāpe	Skaits	Procenti
0	29	54,7
I	3	5,7
II	3	5,7
III	5	9,4
IV	6	11,3
V	7	13,2
Kopā	53	

Tabulā 4-8 redzamie pētījuma dati rāda, vairāk nekā pusei slimnieku (54,7%), diagnosticējot IVGH, virilizācija nav konstatēta un ka salīdzinoši maz slimniekiem (11,4% - slimnieku skaitu ar I un II virilizācijas pakāpi kopā ņemot) atklāta vieglā formā esoša virilizācija.

Tabula 4-8.

IVGH pacienta dzimuma saistība ar virilizācijas pakāpi.

Virilizācijas pakāpe		Dzimums		Kopā
		Zēns	Meitene	
0	skaits*	26	3	29
	% *	86,7%	13,0%	54,7%
I	skaits	2	1	3
	%	6,7%	4,3%	5,7%
II	skaits	2	1	3
	%	6,7%	4,3%	5,7%
III	skaits		5	5
	%		21,7%	9,4%
IV	skaits		6	6
	%		26,1%	11,3%
V	skaits		7	7
	%		30,4%	13,2%
Kopā		30	23	53

* Skaits - empīriskais attiecīgās pazīmes novērojumu skaits.; % - procentuālais attiecīgās pazīmes sadalījums rindā.

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.

Tabula 4-9.

Chi - square tests datiem 'dzimuma saistība ar virilizācijas pakāpi.

Pazīmju neatkarība pēc χ^2 kritērija	χ^2 vērtība	df*	P vērtība
Pearson Chi-Square	36,62	5	0,00
Likelihood Ratio	45,62	5	0,00
Linear-by-Linear Association	33,37	1	0,00
Derīgo novērojumu skaits	53		

df - brīvības pakāpju skaits.

Tabula 4-10.

Diagnosticēšanas vecums (mēnešos) saistībā ar virilizācijas pakāpi.

Virilizācijas pakāpe	Sl-ku sk.	Vidējais diagn. vecums (mēn.)	Std Devi-ācija	Std kļūda	Vidējās starpības 95% ticamība		Min	Max
					Apakš. robeža	Augš. robeža		
0	29	13,1	23,45	4,35	4,16	21,99	0,30	108,00
I	3	28,3	24,41	14,10	-32,33	88,99	1,00	48,00
II	3	1,0	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00
III	5	34,3	68,19	30,50	-50,37	118,97	1,00	156,00
IV	6	19,2	43,53	17,77	-26,51	64,85	0,50	108,00
V	7	31,7	40,20	15,19	-5,51	68,85	0,17	96,00
Kopā	53	18,4	33,65	4,62	9,13	27,68	0,17	156,00

Dispersijas analīzes p-vērtība = $0.57 > 0.05$ un līdz ar to ar varbūtību 95% var apgalvot, ka diagnosticēšanas vecums mēnešos atkarībā no virilizācijas pakāpes būtiski neatšķiras.

Tabula 4-11.

Virilizācijas pakāpes saistība ar IVGH klīnisko formu.

Virilizācijas pakāpe	Slimības forma		Kopā
	Sālszaudes	Vienkārši virilizējošā	
0	15	14	29
	51,7%	58,3%	54,7%
1	1	2	3
	3,4%	8,3%	5,7%
2	1	2	3
	3,4%	8,3%	5,7%
3	3	2	5
	10,3%	8,3%	9,4%
4	5	1	6
	17,2%	4,2%	11,3%
5	4	3	7
	13,8%	12,5%	13,2%
Kopā	29	24	53

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. Izteikta (III - V pakāpes) virilizācija ir atrasta 40% sālszaudes formas slimnieku un 25% vienkārši virilizējošās formas slimnieku.

4.4.3. HLA lokusu atradne IVGH pacientiem

Tabula 4-12.

IVGH pacientu HLA lokusu atradnes kopsavilkums.

HLA lokusi	Sl-ku skaits	Atradne (%)
A1	5	9,4
A3	10	18,9
B14	8	15,1
B60	10	18,9
Bn47	8	15,1
Bn51	1	1,9
Bw51	10	18,9
Cw4	1	1,9
Kopā	53	100,0

Tabulā 4-13 ievietoti dati par IVGH slimnieku saistību ar noteiktiem HLA lokusiem neatkarīgi no tā, kāda ir IVGH klīniskā forma. Tie ļauj spriest, 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).

Tabula 4-13.

IVGH pacientu HLA lokusu atradnes saistība ar dzimumu.

HLA lokusi		Dzimums		Kopā
		Zēns	Meitene	
A1	skaits*	1	4	5
	%*	3,3%	17,4%	9,4%
A3	skaits	5	5	10
	%	16,7%	21,7%	18,9%
B14	skaits	5	3	8
	%	16,7%	13,0%	15,1%
B60	skaits	4	6	10
	%	13,3%	26,1%	18,9%
Bn47	skaits	3	5	8
	%	10,0%	21,7%	15,1%
Bn51	skaits	1		1
	%	3,3%		1,9%
Bw51	skaits	10		10
	%	33,3%		18,9%
Cw4	skaits	1		1
	%	3,3%		1,9%
Kopā		30	23	53

- * Skaitis - empīriskais attiecīgās pazīmes novērojumu skaits.; % - procentuālais attiecīgās pazīmes sadalījums rindā.

Tabulā 4-14 ievietotā kopējā HLA lokusu atradne pētījumā iekļautajiem IVGH pacientiem saistīta ar slimnieka dzimumu; redzams, ka šīm meitenēm biežāk sastopams B60 (26,1%), Bn47 (21,7%) un A3 (21,7%) lokusi, kamēr šiem zēniem dominē Bw51 (33,3%) un B14 (16,7%) lokusi.

Tabula 4-14.

Chi-Square tests.

Pazīmju neatkarība pēc χ^2 kritērija	χ^2 vērtība	df*	P vērtība
Pearson Chi-Square	14,53	7	0,04
Likelihood Ratio	19,05	7	0,01
Derīgo novērojumu skaits	53		

- * df - brīvības pakāpju skaits.

Tabula 4-15.

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

HLA lokusi		Slimības forma		Kopā
		Sālszaudes	Vienkārši virilizējošā	
A1	skaits*	4	1	5
	% *	13,8%	4,2%	9,4%
A3	skaits	6	4	10
	%	20,7%	16,7%	18,9%
B14	skaits		8	8
	%		33,3%	15,1%
B60	skaits	10		10
	%	34,5%		18,9%
Bn47	skaits	8		8
	%	27,6%		15,1%
Bn51	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
Bw51	skaits		10	10
	%		41,7%	18,9%
Cw4	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
Kopā	skaits	29	24	53

- * Skaitis - empīriskais attiecīgās pazīmes novērojumu skaits.; % - procentuālais attiecīgās pazīmes sadalījums rindā.

Tabulā 4-16 ievietoti IVGH slimnieku HLA lokusu atradnes dati saistībā ar IVGH klīniskās formas klātbūtni; redzams, ka ar sālszaudes formu vairāk saistās B60 (34,5%) un Bn47 (27,6%) lokusi, bet ar vienkārši virilizējošo formu - Bw51 (41,7%) un B14 (33,3%) lokusi. Ar lokusu A3 saistās gan sālszaudes (20,7%), gan vienkārši virilizējošās (16,7%) formas klātbūtne.

Kontroles grupā analizētajos paraugos IVGH raksturīgie HLA lokusi netiek konstatēti.

4.4.4. Atrasto *CYP21* gēna mutāciju raksturojums IVGH pacientiem

4.4.4.1. Konstatēto *CYP21* gēna mutāciju vispārīgs raksturojums

Tabula 4-16.

IVGH pacientiem konstatēto *CYP21* gēna mutāciju kopsavilkums.

Mutācijas	Skaitis	Atradne (%)
0	1	1,9
con/E6cluster	1	1,9
conv/conv	1	1,9
conv/Q318X	1	1,9
del/conv	1	1,9
del/del	2	3,8
del/E38bp	1	1,9
del/I172N-F306+t	3	5,7
del/P30L	1	1,9
del/Q318X	1	1,9
del/R356W	2	3,8
del/V281L	1	1,9
E6cluster/R356W	1	1,9
I172N-R356W/V281L	1	1,9
I172N/318X	1	1,9
I172N/conv	1	1,9
I172N/del	4	7,5
I172N/E38bp	2	3,8
I172N/I172N	1	1,9
I172N/I2G	3	5,7
I172N/Q318X	1	1,9
I172N/R356W	4	7,5
I2G/del	4	7,5
I2G/E38bp	1	1,9
I2G/I2G	5	9,4
I2G/Q318X	1	1,9
I2G/R356W	2	3,8

I2G/V281L	1	1,9
Q318X/Q318X	1	1,9
Q318X/R356W	1	1,9
R356W/R356W	2	3,8
Kopā	53	100,0

Tabulā 4-17 ievietoti *CYP21* gēna mutāciju atradnes kopējie dati; redzams, ka visbiežāk atrastas 12G/12G mutācijas intronā 2 (9,4%), 12G/del (7,5%) un ar Ile172Asn saistītās mutācijas (I172N/del - 7,5%, I172N/R356W - 7,5%, I172N12G - 5,7%, del/I172N-F306+t - 5,7% un vēl dažas citas). Atrastas arī citos pētījumos biežāk sastopamās *CYP21* gēna mutācijas - 8-bp delēcijas eksonā 3 (del/E38bp - 1,9%, I172N/E38bp - 3,8%, 12G/E38bp - 1,9%), Pro30Leu (del/P30L - 1,9%) un Val281Leu (del/V281L - 1,9%, I172N-R356W/V281L - 1,9%, 12G/V281L - 1,9%) mutācijas.

Kontroles grupā analizēti 20 veselu bērnu asins paraugi - *CYP21* gēna mutācijas nav atrastas, arī netiek konstatēti heterozigoti IVGH.

4.4.4.2. Konstatēto *CYP21* gēna mutāciju saistība ar IVGH fenotipu

Tabula 4-17.

IVGH pacientiem konstatēto *CYP21* gēna mutāciju saistība ar IVGH klīnisko formu.

Mutācijas		Slimības forma		Kopā
		Sālszaudes	Vienkārši virilizējošā	
0	skaits*		1	1
	%*		4,2%	1,9%
E6cluster/R356W	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
I172N-R356W/ V281L	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
I172N/318X	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
I172N/E38bp	skaits		2	2
	%		8,3%	3,8%
I172N/I172N	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
I172N/I2G	skaits		3	3
	%		12,5%	5,7%
I172N/Q318X	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%

I172N/R356W	skaits		4	4
	%		16,7%	7,5%
I172N/conv	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
I172N/del	skaits		4	4
	%		16,7%	7,5%
I2G/E38bp	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
I2G/I2G	skaits	4	1	5
	%	13,8%	4,2%	9,4%
I2G/Q318X	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
I2G/R356W	skaits	2		2
	%	6,9%		3,8%
I2G/V281L	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
I2G/del	skaits	3	1	4
	%	10,3%	4,2%	7,5%
Q318X/Q318X	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
Q318X/R356W	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
R356W/R356W	skaits	2		2
	%	6,9%		3,8%
con/E6cluster	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
conv/Q318X	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
conv/conv	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
del/E38bp	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
del/I172N-F306+t	skaits	3		3
	%	10,3%		5,7%
del/P30L	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
del/Q318X	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
del/R356W	skaits	2		2
	%	6,9%		3,8%

del/V281L	skaits		1	1
	%		4,2%	1,9%
del/conv	skaits	1		1
	%	3,4%		1,9%
del/del	skaits	2		2
	%	6,9%		3,8%
Kopā	skaits	29	24	53
	%	100%	100%	100%

* Skaits - empīriskais attiecīgās pazīmes novērojumu skaits; % - procentuālais attiecīgās pazīmes sadalījums rindā.

Tabulā 4-18 atspoguļota *CYP21* gēna mutāciju atradne saistībā ar IVGH klīnisko formu; redzams, ka visbiežāk izpētē iekļautajiem slimniekiem atrastās 12G/12G mutācijas intronā 2 vairāk saistās ar IVGH sālszaudes (13,8%) nekā vienkārši virilizētās (4,2%) formas attīstību. Arī 12G/del mutācija biežāk saistās ar sālszaudes (10,3%) nekā vienkārši virilizējošās (4,2%) formas klātbūtni, bet del/I172N-F306+t un del/E38bp mutācijas atrastas tikai pie IVGH sālszaudes formas. Ile172Asn mutācijas saistās galvenokārt ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību (I172N/del - 16,7%, I172N/R356W - 16,7%, I172N/12G - 12,5%). Arī del/P30L (4,2%) un del/V281L (4,2%) mutācijas pētījumā iekļautajiem slimniekiem saistās tikai ar IVGH vienkārši virilizējošās formas klātbūtni.

4.4.4.3. Konstatēto *CYP21* gēna mutāciju saistība ar virilizāciju

Tabula 4-18.

IVGH pacientiem konstatēto *CYP21* gēna mutāciju saistība ar virilizācijas pakāpi.

Mutācijas	Virilizācijas pakāpe						Kopā
	0	1	2	3	4	5	
0	1						1
	3,4%						1,9%
E6cluster/R356W	1						1
	3,4%						1,9%
I172N-R356W/V281L	1						1
	3,4%						1,9%
I172N/318X	1						1
	3,4%						1,9%
I172N/E38bp	1				1		2
	3,4%				16,7%		3,8%
I172N/I172N	1						1
	3,4%						1,9%

I172N/I2G	1		1			1	3
	3,4%		33,3%			14,3%	5,7%
I172N/Q318X						1	1
						14,3%	1,9%
I172N/R356W	2			1		1	4
	6,9%			20,0%		14,3%	7,5%
I172N/conv			1				1
			33,3%				1,9%
I172N/del	2	1		1			4
	6,9%	33,3%		20,0%			7,5%
I2G/E38bp				1			1
				20,0%			1,9%
I2G/I2G	1	2			1	1	5
	3,4%	66,7%			16,7%	14,3%	9,4%
I2G/Q318X	1						1
	3,4%						1,9%
I2G/R356W				1	1		2
				20,0%	16,7%		3,8%
I2G/V281L	1						1
	3,4%						1,9%
I2G/del	2				1	1	4
	6,9%				16,7%	14,3%	7,5%
Q318X/Q318X	1						1
	3,4%						1,9%
Q318X/R356W	1						1
	3,4%						1,9%
R356W/R356W	1			1			2
	3,4%			20,0%			3,8%
con/E6cluster	1						1
	3,4%						1,9%
conv/Q318X					1		1
					16,7%		1,9%
conv/conv	1						1
	3,4%						1,9%
del/E38bp	1						1
	3,4%						1,9%
del/I172N-F306+t	1		1			1	3
	3,4%		33,3%			14,3%	5,7%
del/P30L	1						1
	3,4%						1,9%

del/Q318X	1						1
	3,4%						1,9%
del/R356W	1				1		2
	3,4%				16,7%		3,8%
del/V281L	1						1
	3,4%						1,9%
del/conv						1	1
						14,3%	1,9%
del/del	2						2
	6,9%						3,8%
Kopā	29	3	3	5	6	7	53

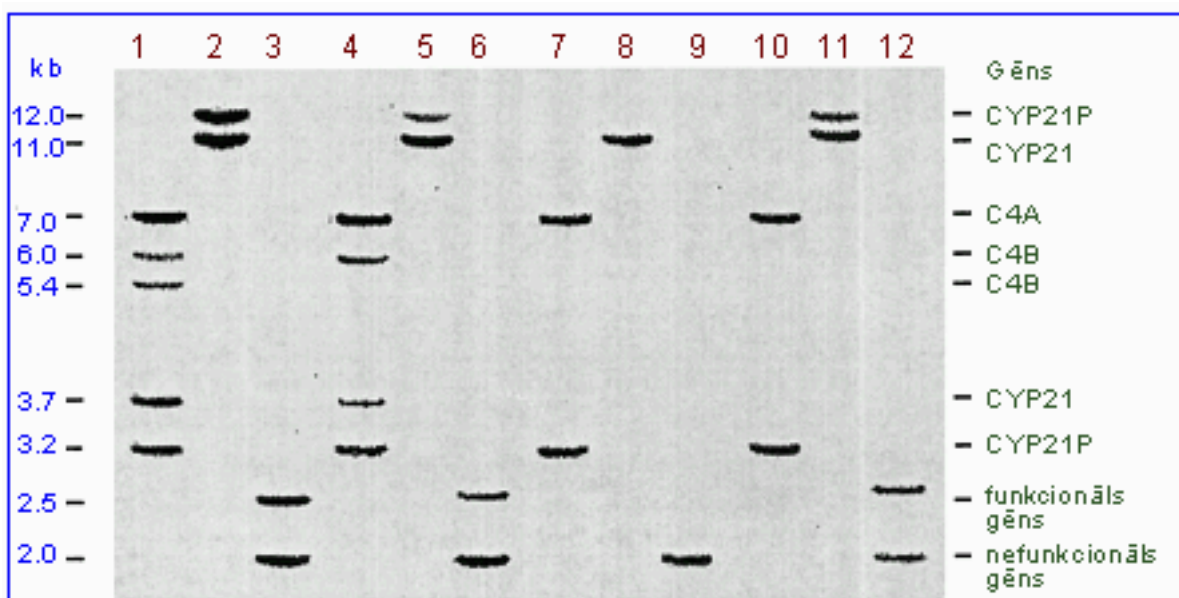
* Analizējot klīnisko pazīmju atšķirības mutāciju grupās - $\chi^2 = 43.69$; $p < 0.01$

Tabulā 4-19 ievietoti *CYP21* gēna mutāciju atradne saistībā ar virilizācijas pakāpi; redzams, ka visbiežāk izpētē iekļautajiem slimniekiem atrastās 12G/12G mutācijas intronā 2 vairāk saistās ar vidēji izteiktu virilizāciju (virilizācijas 2. pakāpe konstatēta 66,7% gadījumu) nekā ar vieglām (virilizācijas I pakāpe konstatēta 3,4% gadījumu) vai smagām (virilizācijas V pakāpe konstatēta 14,3% gadījumu) virilizācijas formām. I172N/del un citas Ile172Asn mutācijas saistās ar samērā izteiktu visu virilizācijas pakāpju klātbūtni, bet del/E38bp, del/P30L un del/V281L mutācijas - ar retāk sastopamu virilizāciju vieglā formā.

4.5. Laboratoro metožu iegūto rezultātu piemēri

Attēls 4-18.

Southern blot gēnu frakcionēšanas rezultātu piemērs (agarozes gēla fotogrāfija).



1. - 3. joslas demonstrē divu *CYP21* gēnu klātbūtni; 4. - 6. paraugi ir ņemti no IVGH slimnieka, kuram, saskaņā ar šī izmeklējuma datiem, iztrūkst viens no *CYP21* gēniem, par ko liecina 3.7-kb un 6.0-kb *Taq* I fragmentu, 12-kb *Bgl*II fragmenta un 2.5-kb *Eco*RI/*Bgl*II fragmenta samazinātā intensitāte; 7. - 9. joslas, savukārt, norāda uz *CYP21* gēna abu alēļu delēciju, jo tajās iztrūkst 3.7-kb *Taq* I, 12-kb *Bgl*II un 2.5-kb *Eco*RI/*Bgl*II fragmenti (homozigotas lielā gēna konversijas gadījumā *Taq* I un *Eco*RI/*Bgl*II apstrādes rezultāti ir līdzīgi - šie fragmenti arī iztrūkst, bet ir saglabāta *Bgl*II fragmenta klātbūtne); 10. - 12. joslai atbilstošie paraugi pieder IVGH pacientam ar vienkāršo virilizējošo formu, uz kuras esamību norāda 3.7-kb *Taq* I fragmenta iztrūkums.

Attēls 4-19.

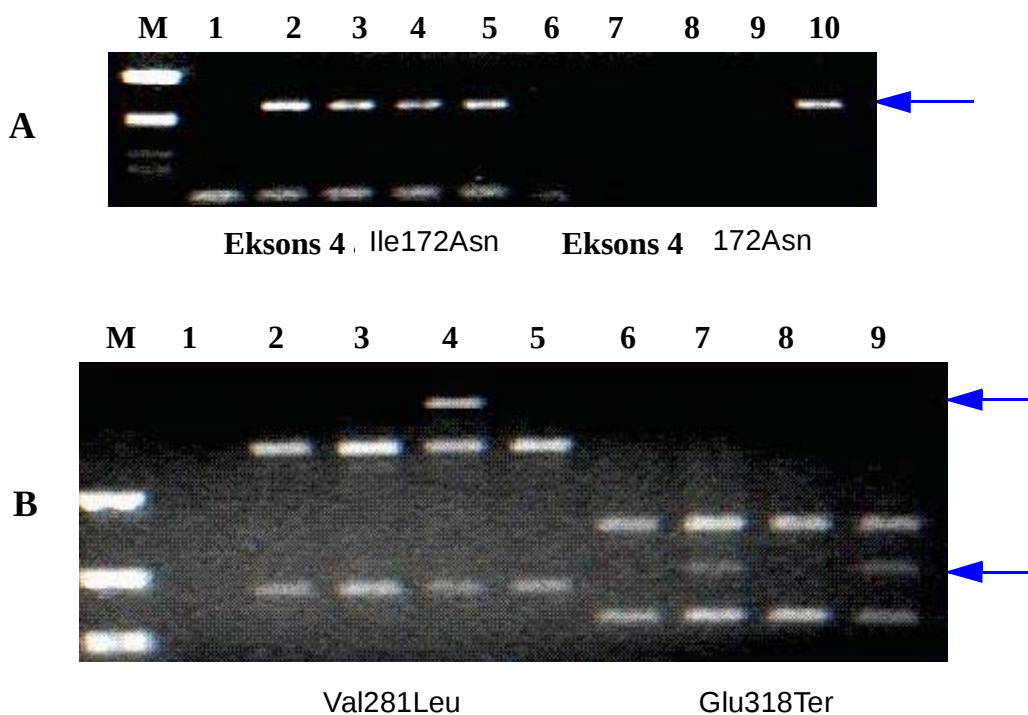
The schematic diagram illustrates the CYP21 gene locus on chromosome 6p21.3, showing four exons: C4A, CYP21P, C4B, and CYP21. The CYP21P and CYP21 exons are separated by a 21-OH cDNA paralog. The Taq I restriction sites are indicated by red boxes below the exons. The distances between the sites are 3.2 Kb (between CYP21P and C4B) and 2.4 Kb (between C4B and CYP21). The Taq I sites are located 3.7 Kb upstream of the CYP21P exon and 2.6 Kb upstream of the CYP21 exon.

The gel electrophoresis results show the PCR products of the CYP21 gene locus. The lanes are numbered 1 through 8. The bands are labeled with their sizes: 3.7 Kb, 3.2 Kb, 2.5 Kb, and 2.4 Kb. The bands are present in lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8, indicating the presence of the CYP21 gene locus in all samples.

Norma atbilst vertikālai attēla joslai zem skaitļa “1”; visas pārējās šādas joslas atbilst IVGH slimniekiem un demonstrē ierobežoto informāciju, ko var iegūt, lietojot šo metodi izolēti. Tikai josla zem skaitļa “2” skaidri norāda, ka šim slimniekam ir homozigota delēcija 21-H lokusā; pārējās joslas vai nu nepārlicinoši liecina par 21-H defektu, vai arī to neuzrāda. Tā, piemēram, 4. joslas 3.7 Kb fragments sasniedz pusi no normālā augstuma, kas var liecināt par *CYP21* gēna delēciju vai konversiju, 6. joslas 3.2Kb fragments, savukārt, ir izteikti intensīvāks, kas var liecināt par *CYP21P* pseidogēna dubultu kopiju, bet 5., 7. un 8. joslas izskatās normālas.

Attēls 4-20.

Tiešās *CYP21* gēna mutāciju analīzes piemērs Nr.1.



Attēls 4-20-A (eksona 4 analīze ar alēļspecifisko *PCR*).

M - marķeris.

1, 6 - homozigotas mutācijas.

2 - 5 - heterozigotas mutācijas 172 T>A.

7 - 9 - negatīvā kontrole.

10 - normāla alēļu secība.

Attēls 4-20-B.

M - marķeris.

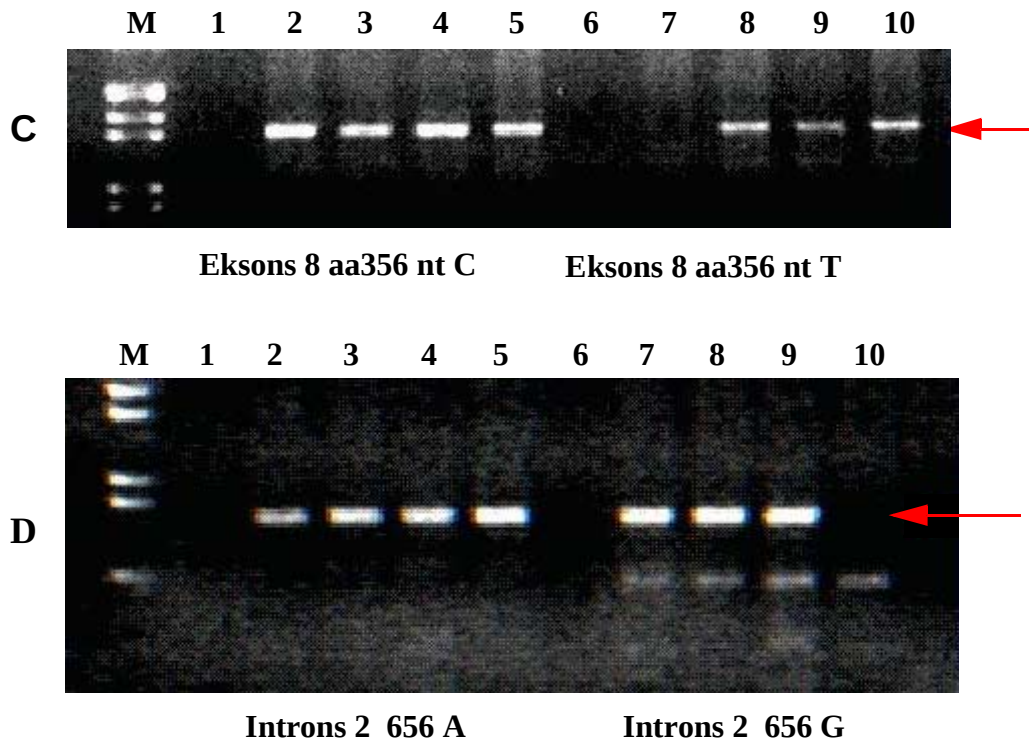
1 - negatīvā kontrole.

2 - 5 - mutācijas Val2181Leu.

6 - 9 - mutācijas Glu318Ter.

Attēls 4-21.

Tiešās CYPR21 gēna mutāciju analīzes piemērs Nr.2.



Attēls 4-21-C (eksona 8 analīze ar alēļspecifisko *PCR*).

M - marķeris.

1, 6, 7 - negatīvās kontroles.

2 - 5 - mutācijas Arg356Trp nēsātāji.

8 - 10 - 356Trp normas variants.

Attēls 4-21-D (introna 2 analīze 656. pozīcijā).

M - marķeris.

1, 6 - negatīvās kontroles.

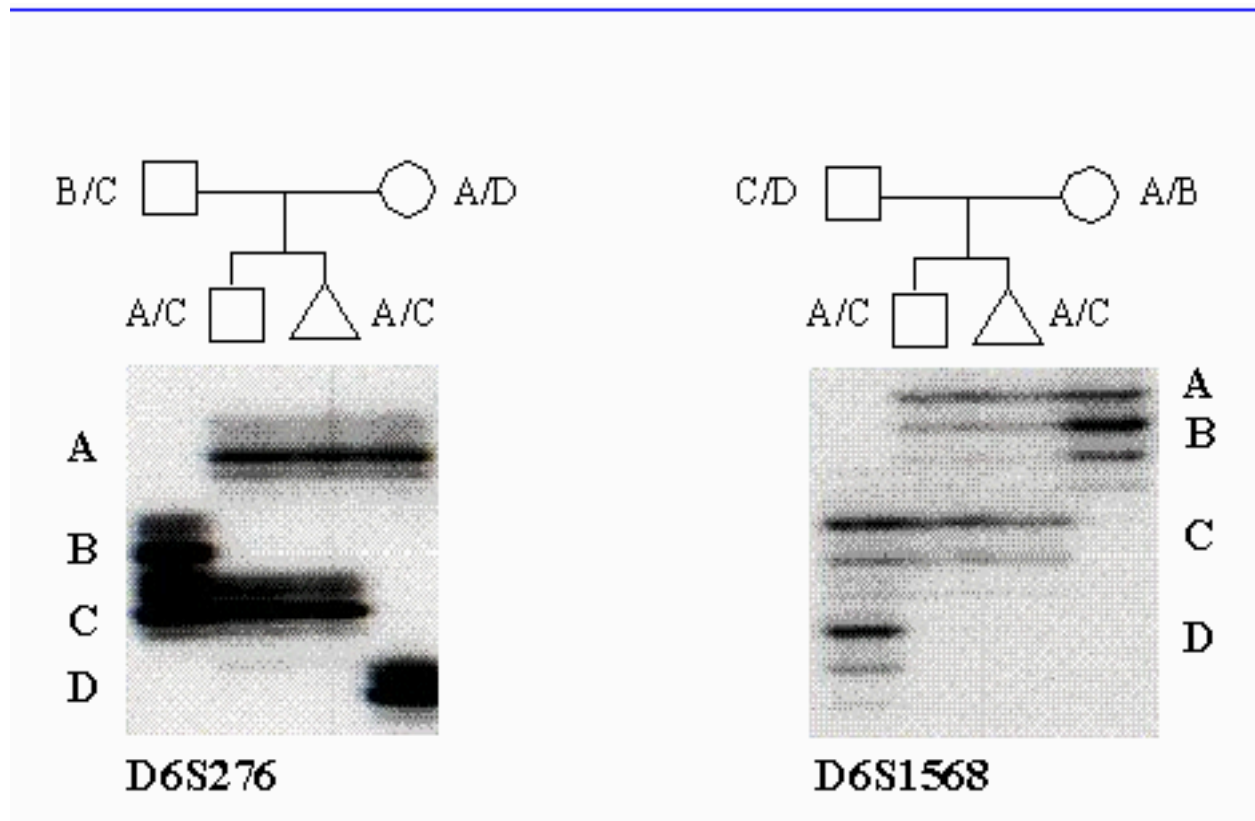
2 - 5 - A/A.

7- 9 - A/G.

10 - G/G.

Attēls 4-22.

Gēnu saistības analīzes piemērs.



Attēlā 4-22 redzamajā gadījumā probands ir pārmantojis A-alēli no mātes un C-alēli no tēva gan pozīcijā D6S276, gan arī - pozīcijā D6S1568.

4.6. Klīniskā materiāla molekulāri ģenētiskā analīze

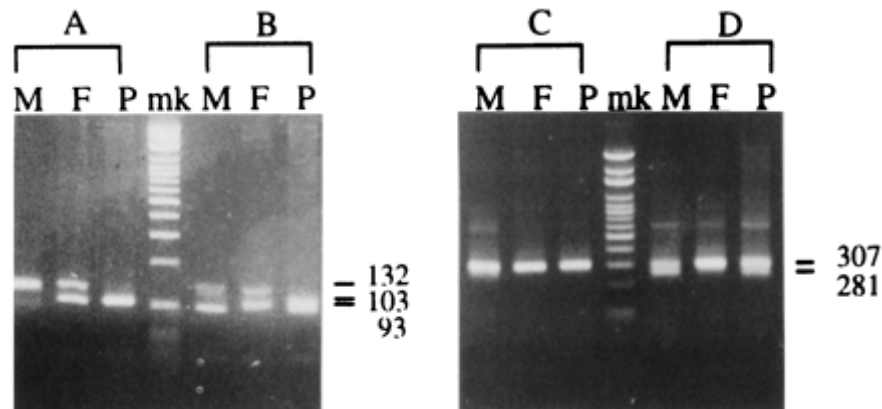
Darba gaitā no pacientu asinīm tika izdalīta hromosomālā DNS, tad tika veikta *CYP21A2* gēna amplifikācija ar *PCR* metodi, sekvenēts *CYP21A2* gēns un analizēti sekvenēšanas rezultāti.

1) Attēlā 4-23 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 marķeris.

Attēls 4-23.

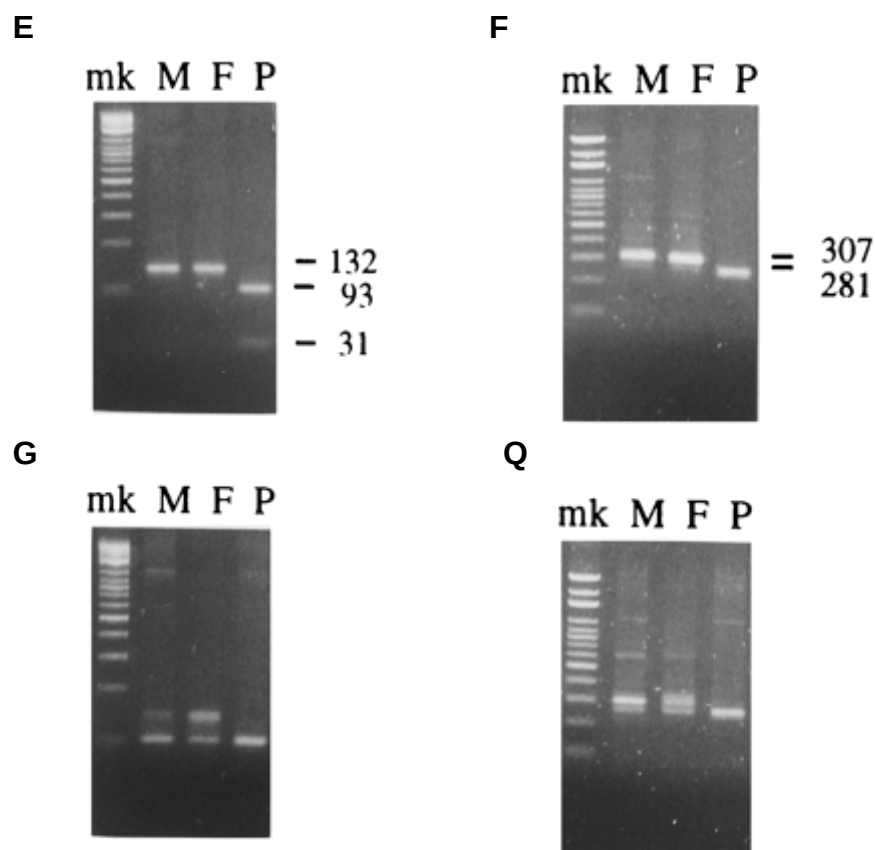
CYP 21P/CYP21 gēnu analīze pēc sekundārā *PCR* produkta (ar viena veida praimeriem.)



2) Attēlā 4-24 dots *CYP21* gēna "izmēru-atšķirīgās" analīzes piemērs.

Attēls 4-24.

CYP21P/CYP21 gēnu analīze pēc sekundārā *PCR* produkta (ar atšķirīgiem praimeriem).

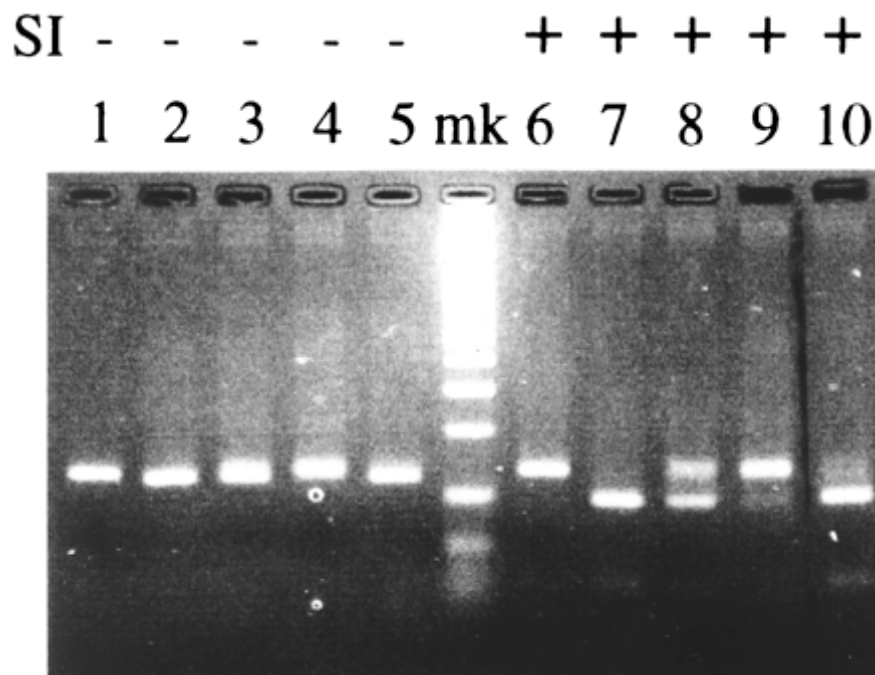


E, G - *CYP21P/CYP21* molekula analizēta pēc sekundārā *PCR* produkta (132-bp) amplifikācijas ar praimeriem C3B/C4, izmantojot *SacI* restrikcijas enzīmu. F, H - *PCR* produkti amplificēti ar sekundārās *PCR* praimeriem B1/2HP/IN3R. Praimeri B1/IN3R un 2HP/IN3R sekundārā *PCR* amplifikācijā atklāj 307- un 281-bp fragmentus. Kolonna "mk" - 100-bp molekulārais marķeris. *PCR* izmantots 1.5% agarozes gēls.

3) Attēlā 4-25 parādīta introna 2 aberantā *splicing* segmenta noteikšana (alēles analīze ar koncentrācijas titrāciju).

Attēls 4-25.

CYP21/CYP21 gēnu analīzes piemērs lietojot gēnu šablonus.

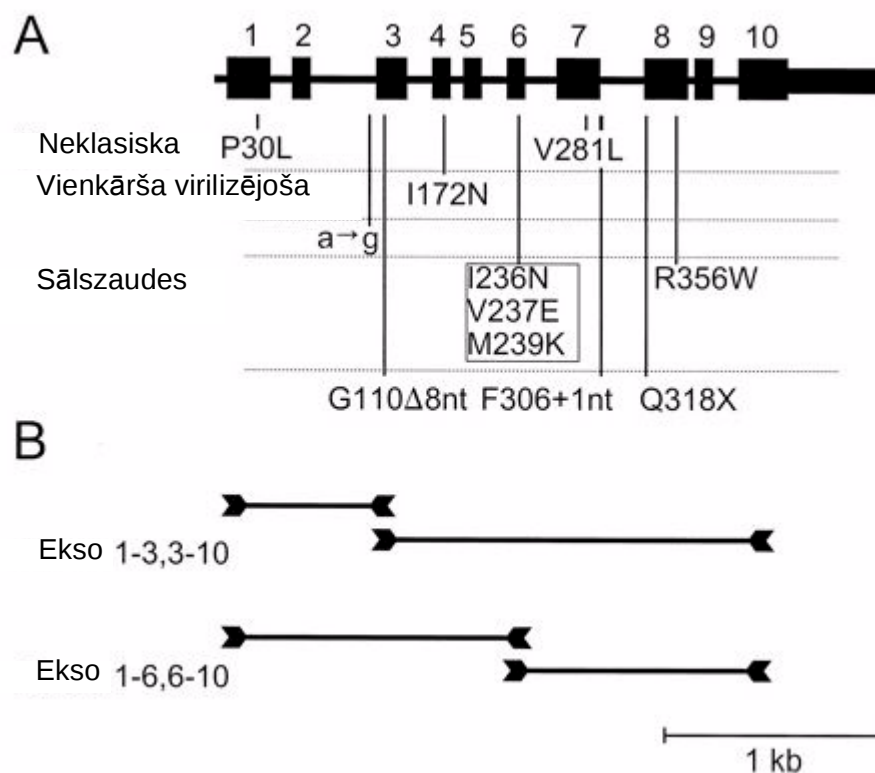


CYP21 un *CYP21P* attiecība ir 1:0 (kolonnas 1 un 6), 0:1 (kolonnas 2 un 7), 1:1 (kolonnas 3 un 8), 5:1 (kolonnas 4 un 9) un 1:5 (kolonnas 5 un 10). Kolonnas 1-5 un 6-10 tika analizētas ar (+) vai bez (-) *SacI* (*SI*) restrikcijas enzīma klātbūtnes. Kolonnā "mk" - 100-bp molekulārais marķeris.

4.6.1. *CYP21A2* gēna amplifikācija

Lai izvairītos no paralēlas pseidogēna *CYP21A2P* amplifikācijas, izmantota *PCR* stratēģija, ko publicējusi A. Wedell 1992. gadā (155). Tika sintezēti divi praimeru pāri, kas lokalizējas nekomplementārajā 3 eksona rajonā, tā garantējot tikai *CYP21A2* gēna amplificēšanu. *PCR* rezultātā ieguva divus 847bp (P1+P48) un 2508bp (P55+P4) garus fragmentus, kas tālāk, pēc to attīrīšanas, izmantoti sekvenēšanai.

Gēna *CYP21A2* amplifikācijas principiāla shēma [155].



Attēlā 4-26 redzama gēna *CYP21A2* amplifikācijas shēma. (A) izplatītāko mutāciju novietojums gēnā *CYP21A2*. (B) divi gēna *CYP21A2* amplifikācijas varianti: eksoni 1-3, 3-10, eksoni 1-6, 6-10.

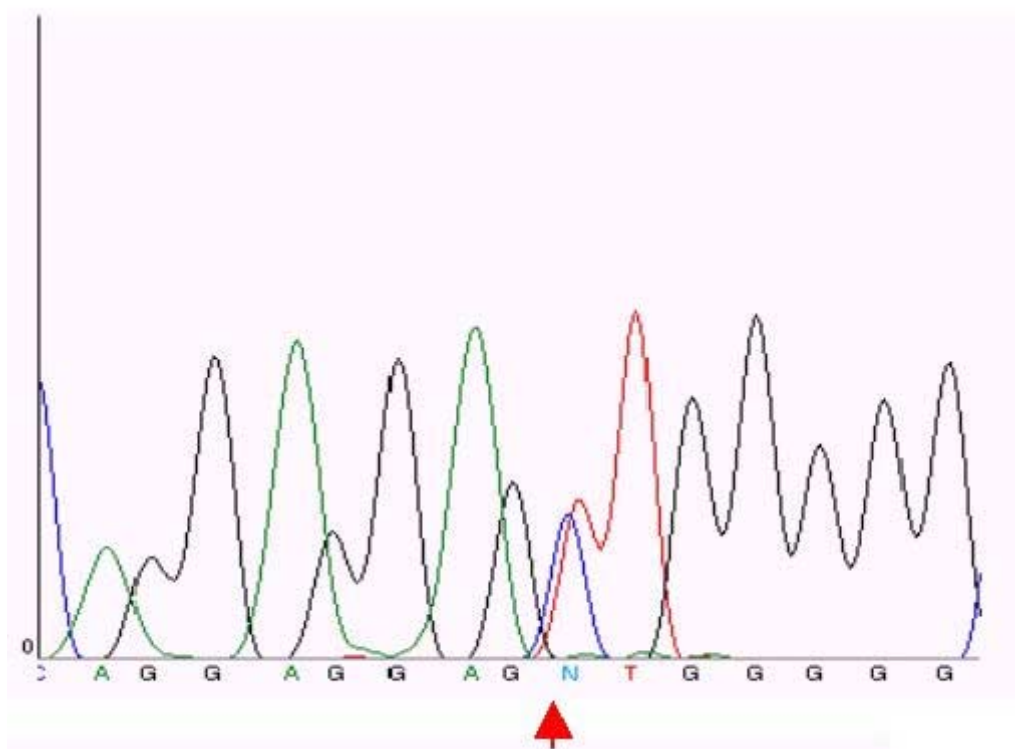
4.6.2. *CYP21A2* gēna sekvenēšana un iegūtie rezultāti

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 pārlicecinoši, 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. Attēlā 4-27 redzams gēna *CYP21A2* atrastās sekvences piemērs.

CYP21A2 gēna fragmenta sekvenču piemērs.



Ar bultiņu norādīta mutācija G>T, T<G

4.6.3. HLA lokusu atradne IVGH pacientiem

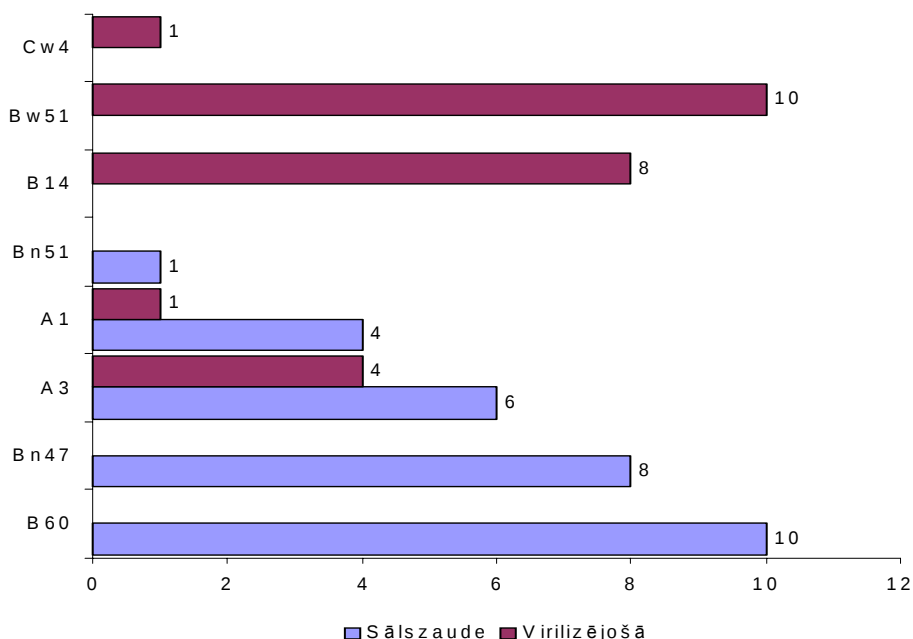
Izpētes atradne liecina par HLA lokusu A1, Bn47 un B60 saistību ar IVGH sālszaudes formas attīstību, bet HLA lokusi B14 un Bw51, savukārt, saistās ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību. HLA lokuss A3 ir saistīts gan ar IVGH sālszaudes, gan vienkārši virilizējošās formas attīstību (skat Attēlu 4-28 un Attēlu 4-29).

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 (skat. Attēlu 4-29).

HLA lokuss A1 saistās ar, galvenokārt, IVGH sālszaudes formu, bet HLA lokuss A3 - ar abām IVGH klīniskajām formām. Zināmu saistību ar IVGH virilizējošo formu nevar izslēgt arī lokusam Cw4. HLA lokuss A3 saistās gan ar sālszaudes, gan vienkārši virilizējošo formu. (skat. Attēlu 4-29, Attēlu 4-30 un Attēlu 4-32).

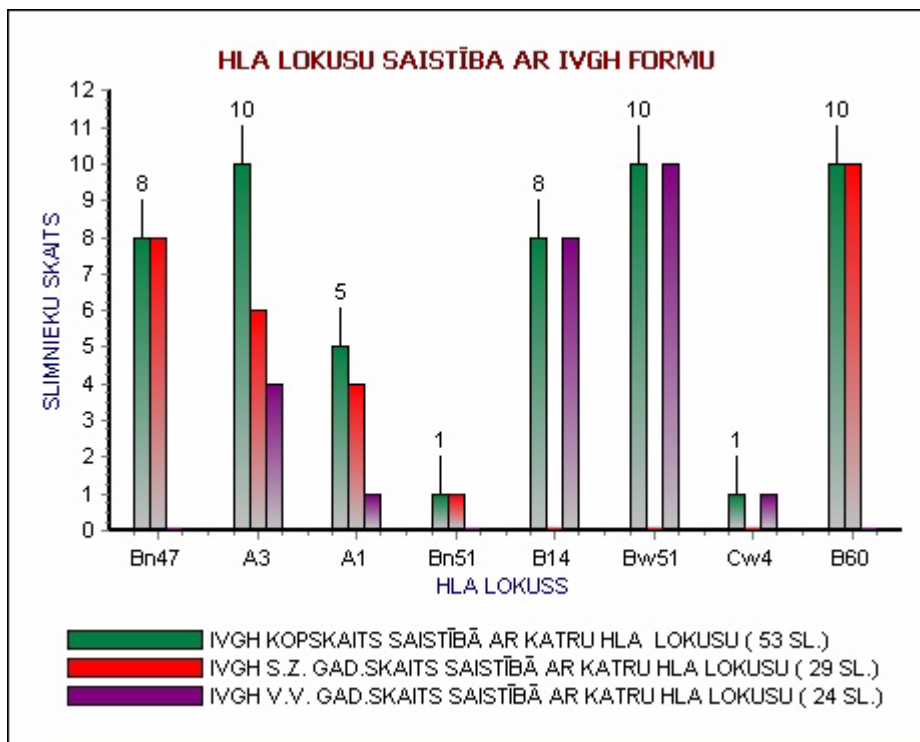
Attēls 4-28.

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



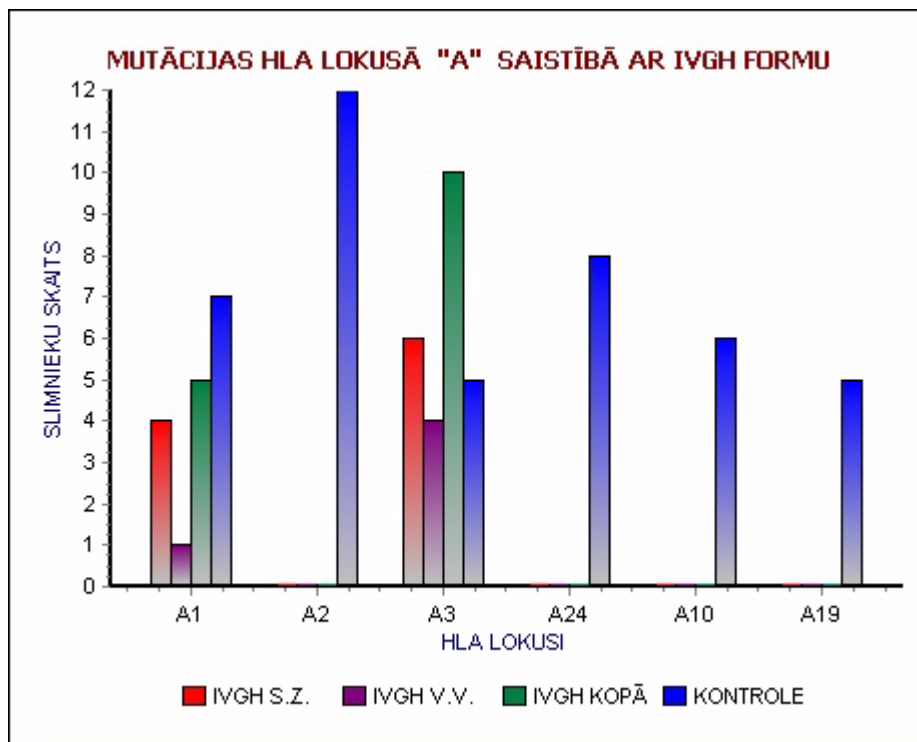
Attēls 4-29.

HLA lokusu saistība ar IVGH formu.



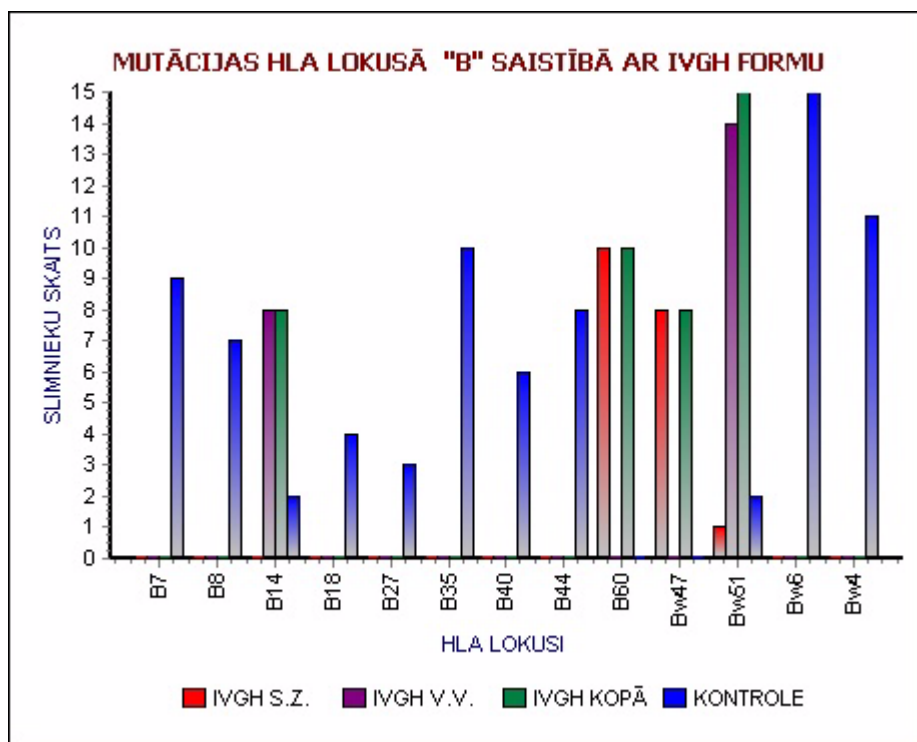
Attēls 4-30.

Mutācijas HLA lokusā "A" saistībā ar IVGH klīnisko formu.



Attēls 4-31.

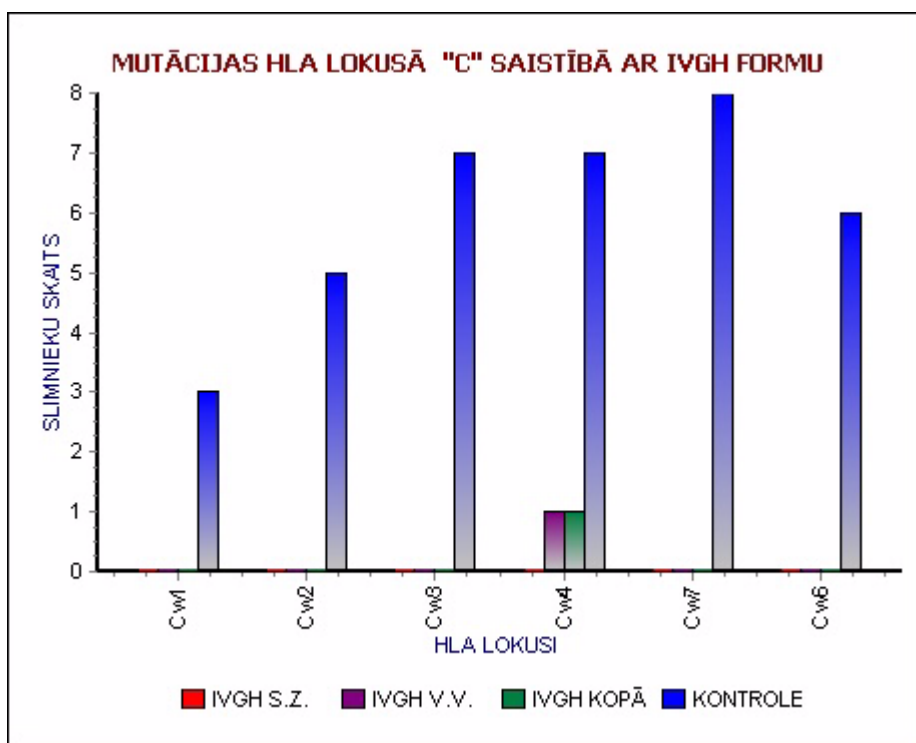
Mutācijas HLA lokusā "B" saistībā ar IVGH klīnisko formu.



HLA lokuss B14 un Bw51 saistās ar IVGH vienkārši virilizējošo formu, bet HLA lokuss B60 un Bw47 - ar IVGH sālszaudes formu (skat. Attēlu 4-31).

Attēls 4-32.

Mutācijas HLA lokusā "C" saistībā ar IVGH klīnisko formu.



HLA lokuss Cw4 demonstrē saistību ar IVGH virilizējošo formu (skat. Attēlu 4-32).

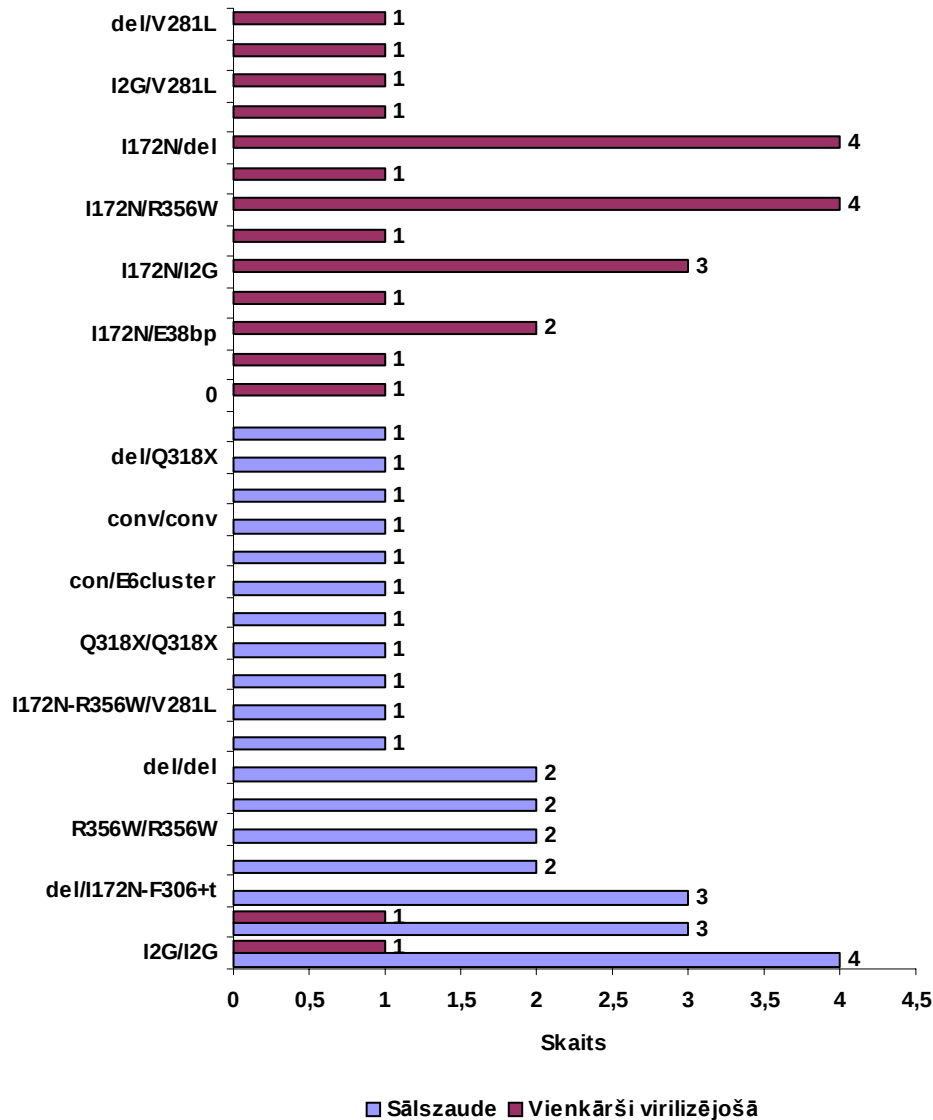
4.6.4. Atrasto *CYP21* gēna mutāciju raksturojums IVGH pacientiem

4.6.4.1. Konstatēto *CYP21* gēna mutāciju vispārīgs raksturojums

Izpētē iekļautajiem IVGH slimniekiem visvairāk atrastas *CYP21* gēna 12G/12G mutācijas intronā 2, kā arī - ar Ile172Asn un 8-bp delēciju eksonā 3 (skat. Attēlu 4-33).

Attēls 4-33.

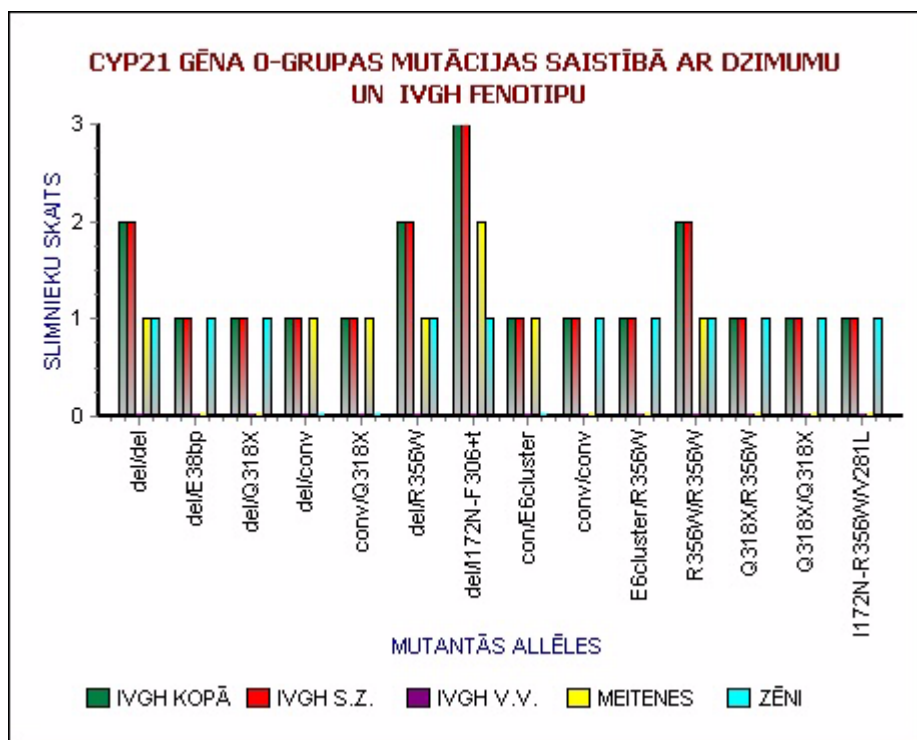
IVGH pacientiem konstatēto *CYP21* gēna mutāciju kopsavilkums.



4.6.4.2. Konstatēto CYP21 gēna mutāciju saistība ar dzimumu un fenotipu

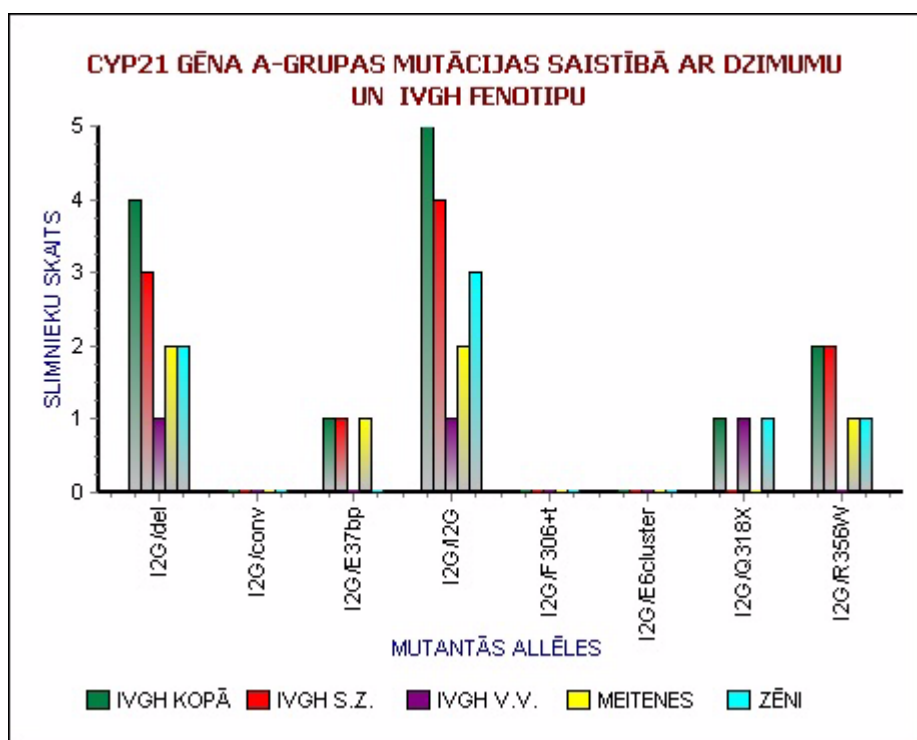
Attēls 4-34.

CYP21 gēna nulltās-grupas mutācijas saistībā ar dzimumu un IVGH fenotipu.



Attēls 4-35.

CYP21 gēna A-grupas mutācijas saistībā ar dzimumu un IVGH fenotipu.

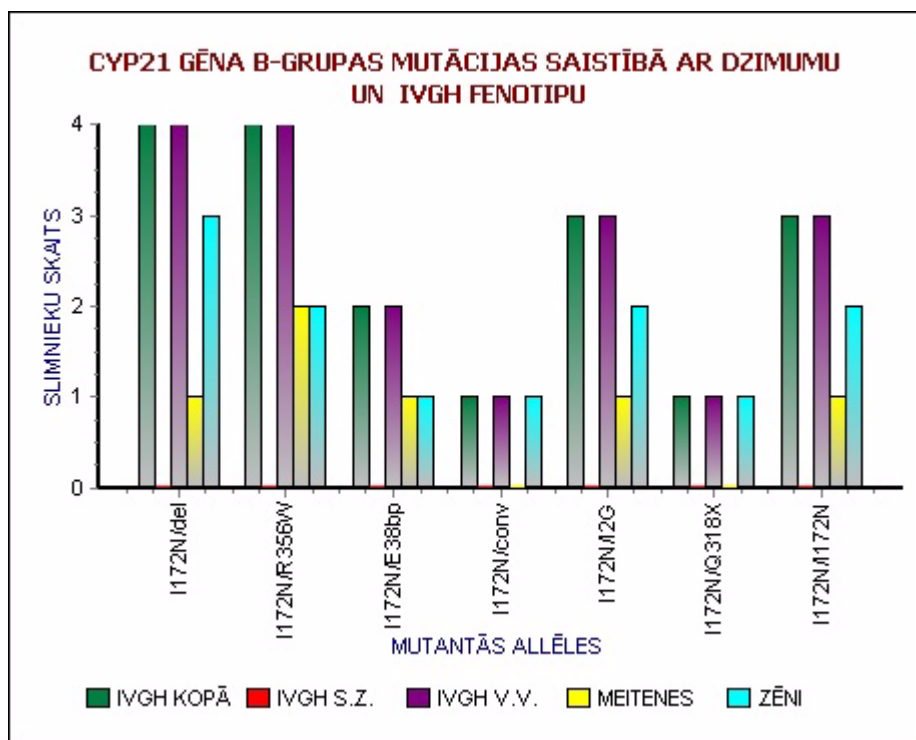


No *CYP21* gēna nulltās grupas mutācijām pētījumā iekļautajiem slimniekiem vairāk atrastas del/I172N-F306 +T mutācijas, kuras (kā to parāda Attēls 4-34) saistās ar IVGH sālszaudes formas attīstību un ir sastopamas vairāk meitenēm.

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 (skat. Attēlu 4-35).

Attēls 4-36.

CYP21 gēna B-grupas mutācijas saistībā ar dzimumu un IVGH fenotipu.



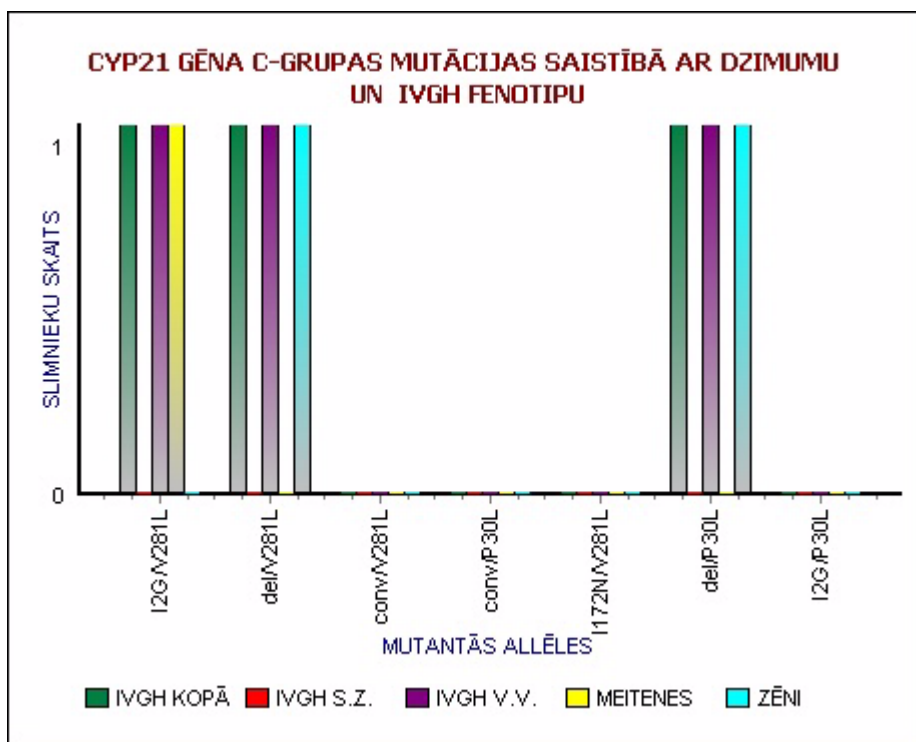
CYP21 gēna ar Ile172Asn saistītās mutācijas (I172N/del, I172N/E38bp, I172N/12G I172N/R356W) izteikti saistās ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību; vairāk zēniem nekā meitenēm (skat. Attēlu 4-36).

Savukārt, *CYP21* gēna ar Val281Leu saistītās un Pro30Leu *CYP21* gēna mutācijas pārliecinoši saistās ar IVGH vienkārši virilizējošās formas attīstību (skat. Attēlu 4-37).

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

Attēls 4-37.

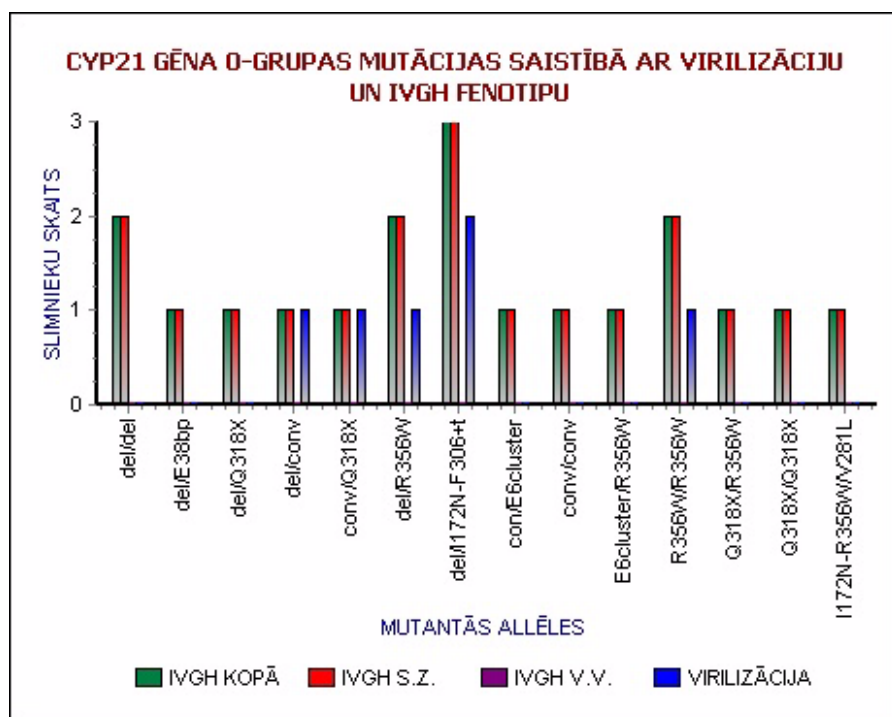
CYP21 gēna C-grupas mutācijas saistībā ar dzimumu un IVGH fenotipu.



4.6.4.3. Konstatēto CYP21 gēna mutāciju saistība ar virilizāciju

Attēls 4-38.

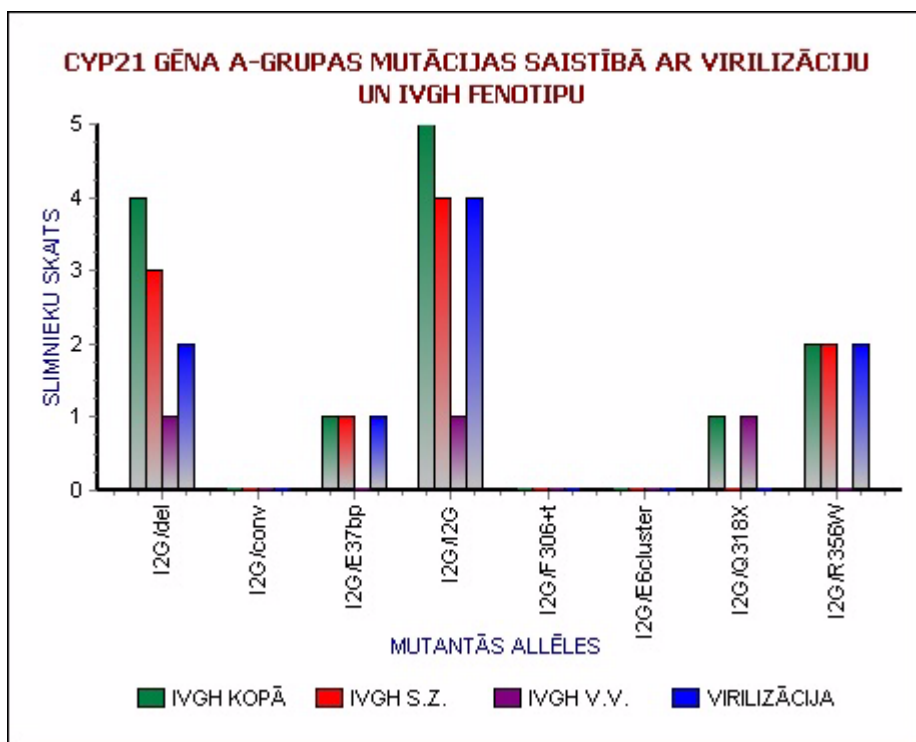
CYP21 gēna nulltās grupas mutācijas saistībā ar virilizāciju un IVGH fenotipu.



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

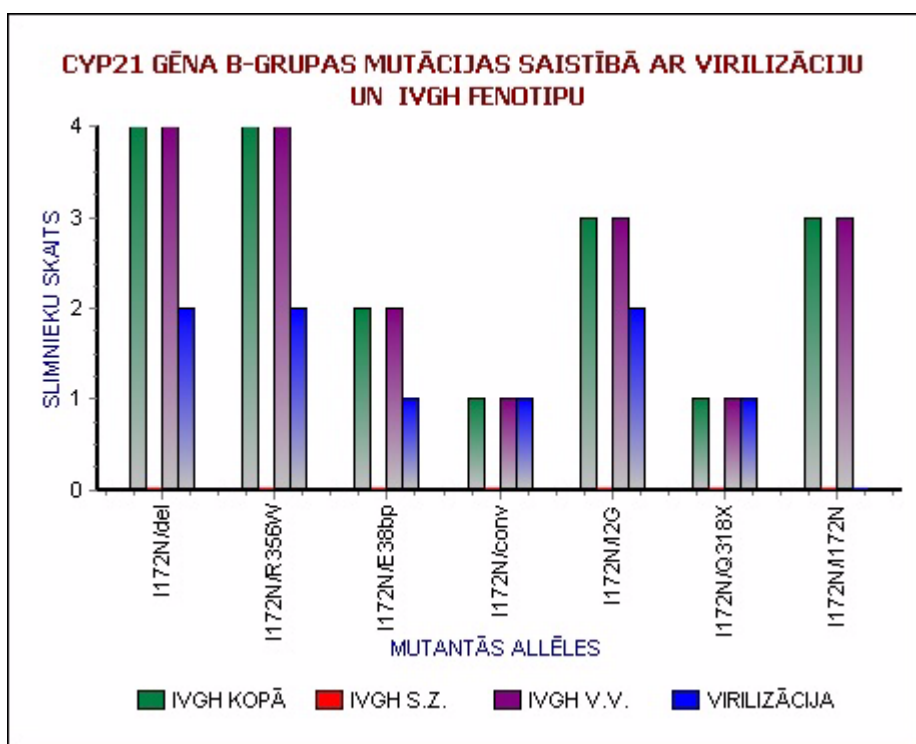
Attēls 4-39.

CYP21 gēna A-grupas mutācijas saistībā ar virilizāciju un IVGH fenotipu.

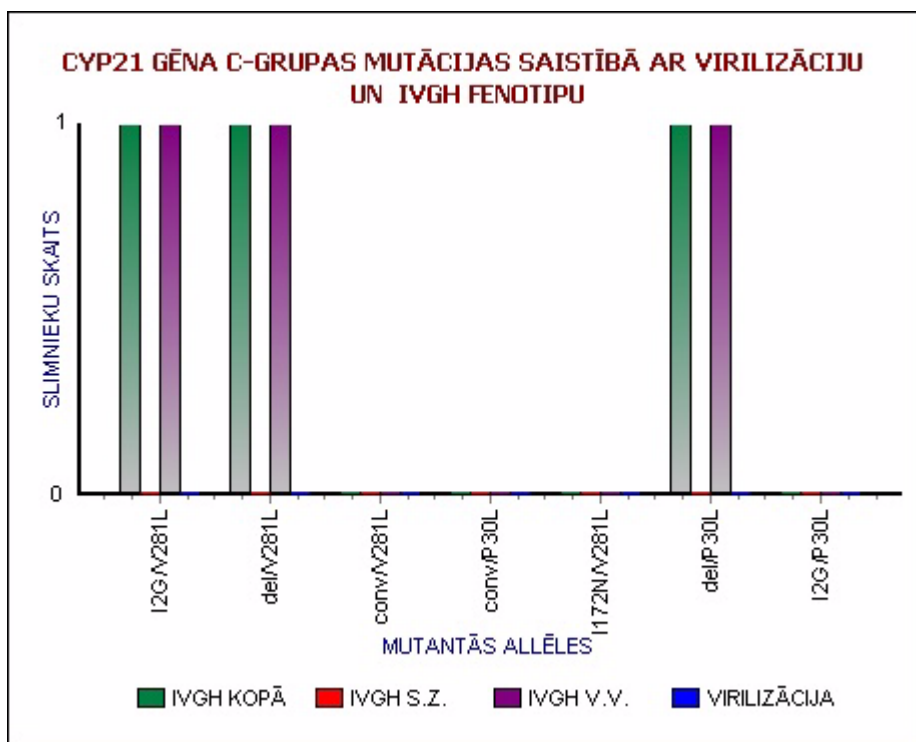


Attēls 4-40.

CYP21 gēna B-grupas mutācijas saistībā ar virilizāciju un IVGH fenotipu.



CYP21 gēna C-grupas mutācijas saistībā ar virilizāciju un IVGH fenotipu.



12G/del, 12G/12G un 12G/R356W mutācijas saistās ar virilizāciju gan pie IVGH sālszaudes, gan vienkārši virilizējošās formas (skat. Attēlu 4-39).

Savukārt, CYP21 gēna I172N/del, I172N/R356W un I172N/E38bp mutācijas saistās ar virilizāciju pie IVGH vienkārši virilizējošās formas (skat. Attēlu 4-40).

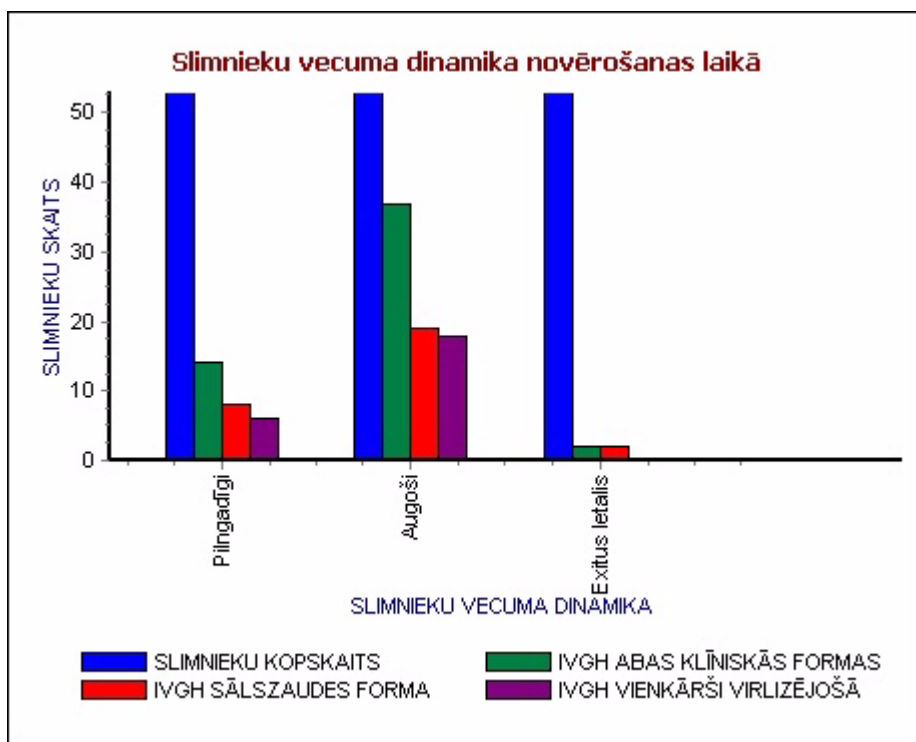
CYP21 gēna del/V281L un del/P30L mutācijas pēc pētījumā iegūtajiem datiem nesaistās ar izteiktu virilizāciju pie IVGH vienkārši virilizējošās formas (skat. Attēlu 4-41).

4.7. 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* (skat. Attēlu 4-42).

Slimnieku vecuma dinamika novērošanas laikā.



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

- -1.9 ± 0.4 SDS meitenes (no tām – -1.7 ± 0.4 SDS patientes ar sālszaudes formu un – -2.0 ± 0.4 SDS patientes ar vienkārši virilizējošo formu),
- -1.7 ± 0.3 SDS zēni (no tiem – -1.5 ± 0.2 SDS patienti ar sālszaudes formu un – -1.9 ± 0.2 SDS patienti 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.

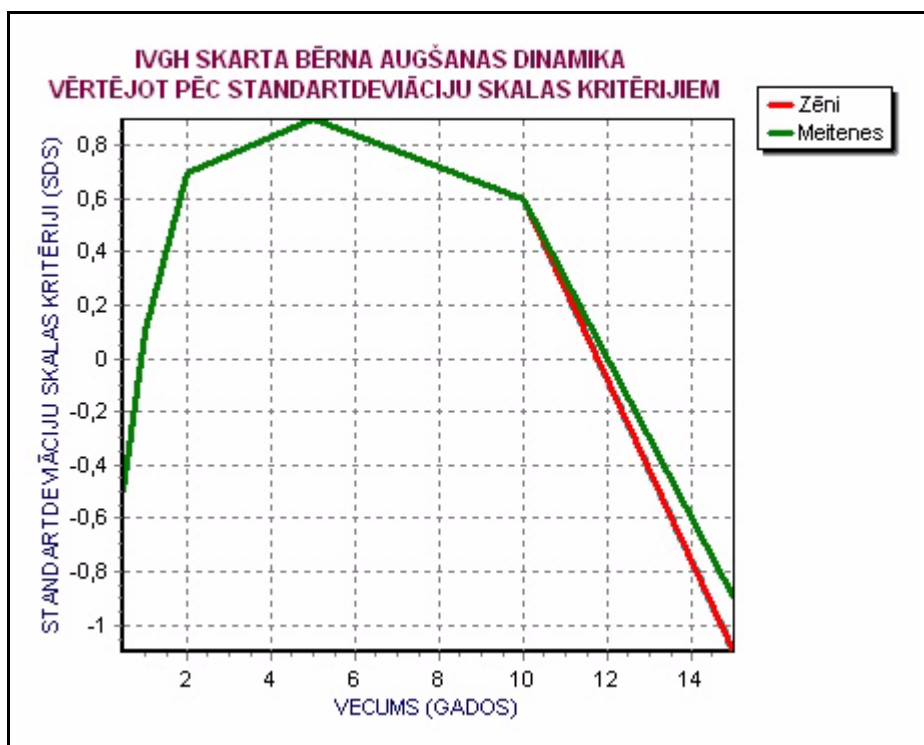
39 pacientu augšanas dinamiskā analīzē tika konstatēta sekojoša augšanas dinamika atkarībā no bērna vecuma (skat. Attēlu 4-43):

- līdz 6 mēnešu vecumam: -0.5 ± 0.3 SDS
- no 6 m.v. līdz 1 gada vecumam: 0.1 ± 0.2 SDS
- no 1 g.v. līdz 2 gadu vecumam: 0.7 ± 0.4 SDS
- no 2 g.v. līdz 5 gadu vecumam: 0.9 ± 0.3 SDS
- no 5 g.v. līdz 10 gadu vecumam: 0.6 ± 0.4 SDS

- no 10 g.v. līdz 15 gadu vecumam zēniem: -1.1 ± 0.5 SDS, meitenēm: -0.9 ± 0.4 SDS.

Attēls 4-43.

Augšanas dinamika pētījumā novērotajiem bērniem ar IVGH.



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.

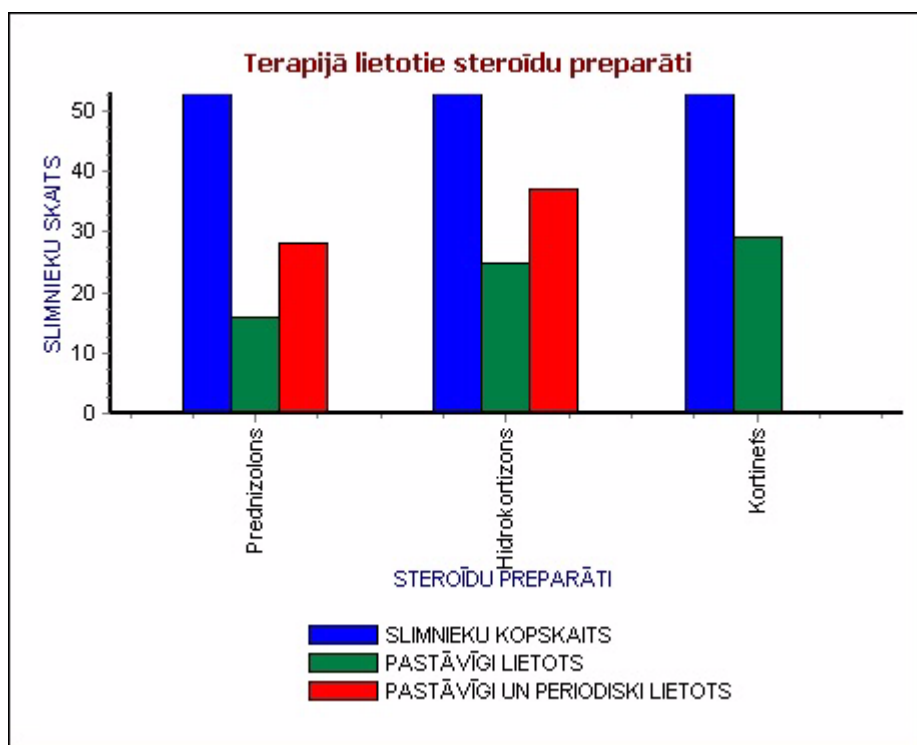
17α OHPg līmenis asinīs kā IVGH diagnostiskais kritērijs izmantots 45 pacientiem, t.i. 85% pacientu. 8 pacientiem diagnosticēšanas brīdī noteikts 17 – ketosteroīdu līmenis urīnā. 17α OHPg līmenis diagnosticēšanas brīdī svārstās no 15.9 ng/ml līdz 200.7 ng/ml, vidēji – 40.08 ng/ml ($n=45$, $p<0.05$).

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 4-44).

Attēls 4-44.

IVGH terapijā lietotie glikokortikoīdu un mineralokortikoīdu preparāti.



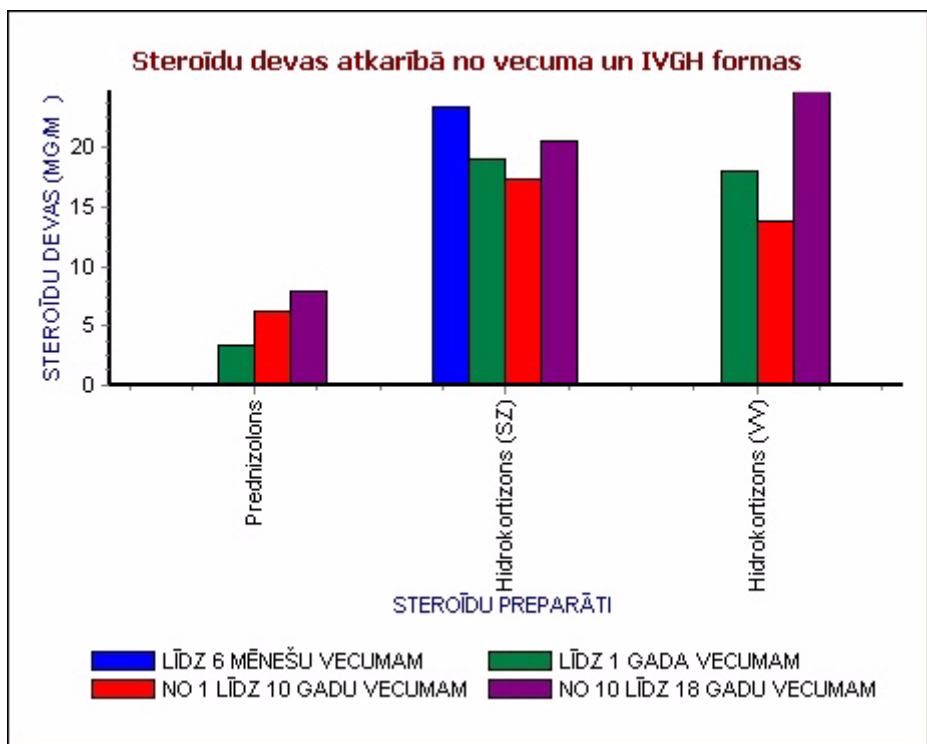
Neatkarīgi no IVGH formas, visi pacienti saņēmuši glikokortikoīdu preparātus trīs reizes dienā (skat. Attēlu 4-45) :

- 16 pacienti – 30.2% pastāvīgi un 12 pacienti periodiski lietojuši *Prednisolone* sekojošās devās, neatkarīgi no slimības formas:
 - * līdz 1 gada vecumam 3.4 ± 1.2 mg/m²,
 - * no 1 gada līdz 10 gadu vecumam – 6.2 ± 1.3 mg/m²,
 - * no 10 līdz 18 gadu vecumam – 7.9 ± 1.2 mg/m².
- 25 pacienti – 47.2% pastāvīgi un 12 pacienti periodiski lietojuši *Hydrocortisonum* 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 mineralokortikoidus - *9 α fludrocortisonum* reizi dienā sekojošās devās:
 - līdz 3 mēnešu vecumam – $150 \text{ }\mu\text{g/m}^2$, no 3 mēnešu līdz 1 gada vecumam – $100 \text{ }\mu\text{g/m}^2$, no 1 gada līdz 2 gadu vecumam – $50 - 100 \text{ }\mu\text{g/m}^2$, pēc 2 gadu vecuma – $50 \text{ }\mu\text{g/m}^2$.
 - visi 29 sālszaudes formas pacienti līdz 1 gada vecumam lietojuši papildus $1 - 2 \text{ g/}$ dienā NaCl.

Attēls 4-45.

Prednizolona un hidrokortizona devas atkarībā no vecuma un IVGH formas.



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.

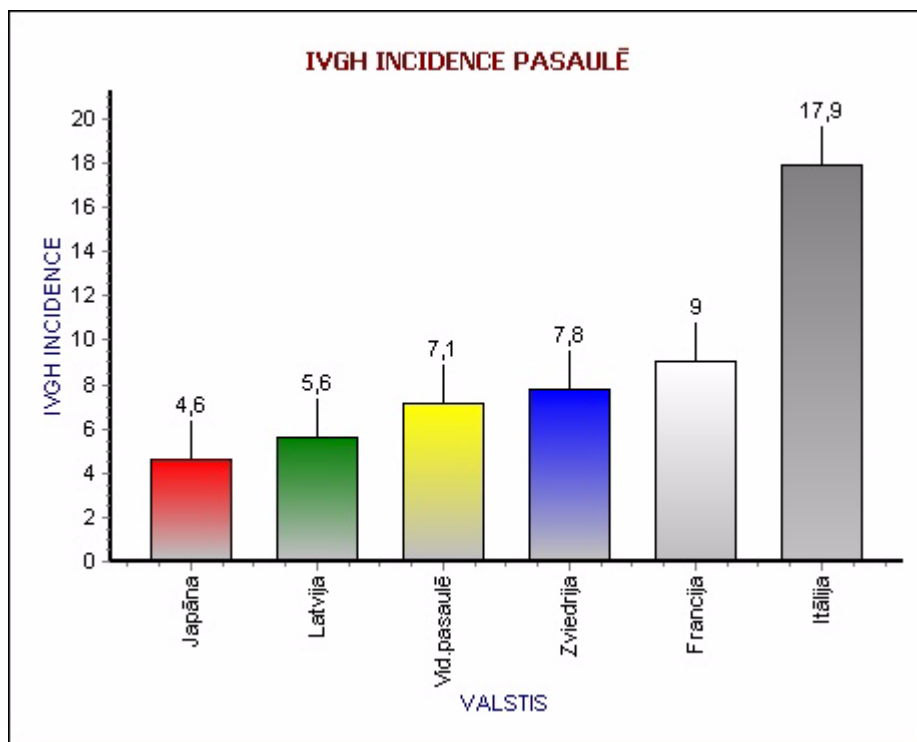
5. Diskusija

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 5-1). 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] (skat. Pielikumu 1 un Pielikumu 2). Tomēr, analizējot pētījumā iegūtos datus kopumā, jāsecina, ka Latvijā ir IVGH hipodiagnostika un IVGH slimnieku skaits mūsu valstī varētu būt lielāks.

Attēls 5-1.

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 ģemta 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 prenatāla 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 sāls-zaudes, gan uz vienkārši virilizējošo formu. Zinot, ka vienkārši virilizējošās 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 (skat. Pielikums) veido 30 zēni un 23 meitenes; no šiem zēniem 4 ir ģenētiskas meitenes ar izteiktu virilizāciju; tātad - 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 pārlicība, 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 polarizācija. 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 3. - 5. 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 klīniskās 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 prenatālu klitora hipertrofiju, Val281Leu - ar vieglu virilizācijas pakāpi, bet Ile172Asn - ar izteiktu prenatālu 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 dinamiskā 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 $17\alpha\text{OHPg}$ 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, 92, 93].

Datu analīzi un kopēju secinājumu izdarīšanu apgrūtināja vairāki apstākļi – no 1989. līdz 1992.gadam nebija pieejama $17\alpha\text{OHPg}$ līmeņa noteikšana, *Hydrocortisonum* kļuva pieejams Latvijā tikai ap 1993.gadu, taču ar pārtraukumiem piegādē un ilgstoši netika iekļauts kompensējamā 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 hiperandrogenēmijas 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 vēlīnu 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 gon du 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, gon du androgēnu sekrēciju un kortizola farmakokinētikas izmaiņām pubertātes vecumā, palielinoties tā kl rensam [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 apst kl s un novēloti uzsākot parenter lu glikokortikoīdu ievadi, ko ietekmēja nepietiekama vecāku apmācība kritiskās situācijās un bērna stāvokļa smaguma nenov rt jums. 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 medikamentoza 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 detektējamas 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 genitālijām (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:

- ledzimta virsnieru garozas hiperplāzija, kas manifestējas jaundzimušo periodā (Pielikums 23) un
- ledzimta virsnieru garozas hiperplāzija, kas manifestējas pēc jaundzimušo perioda (Pielikums 24).

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

6. 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.

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.

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.

7. Rezultātu novītāte

1. Pirmo reizi apkopoti un dinamikā 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. Pirmo reizi Latvijā veikta bērnu ar IVGH klasisko formu slimības gaitas dinamiskās novērošanas piecu gadu periodā datu analīze.

8. Darba anotācija

Darbā, apkopojot IVGH slimnieku epidemioloģiskos datus, analizējot viņu klīniskos rādītājus, nosakot imunoģenētiskos parametrus (ar *PCR* metodi) un statistiski apstrādājot iegūtos rezultātus noskaidrots, ka:

- IVGH saslimstība Latvijā ir zemāka nekā Ziemeļeiropas valstīs konstatētā,
- IVGH attīstības riska faktori Latvijā būtiski neatšķiras no tādiem Eiropā un tie saistās ar HLA-B14;DR1 haplotipu un HLA-A3;Bw47;DR7 haplotipu,
- IVGH sāls zaudes formas slimniekiem Latvijā dominē *CYP21* gēna lielās delēcijas un konversijas, kā arī punktveida mutācijas (A / C par G) intronā 2,
- IVGH vienkāršās virilizējošās formas slimniekiem Latvijā dominē *Ile-172 par Asn* mutācijas.

9. 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;178:1145-1152
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-Voutetakis 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 cytochrome P450 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, Brenilha 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;11:1-16
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 JI, 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 allelespecific 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 P450scc (20,22 desmolase) and P450c17 (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, P450scc, 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, P450scc: 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 P450scc 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 Pediatr 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 lipid 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. Soardi FC, Lemos-Marini SH, Coeli FB, Maturana VG, Silva MD, Bernardi RD, Justo GZ, de-Mello MP. Heterozygosis for CYP21A2 mutation considered as 21-hydroxylase deficiency in neonatal screening. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Nov;52(8):1388-92
225. Haghi Ashtiani MT, Rabbani A, Mostafavi F, Monajemzadeh M, Ranjbar Kermani F, Soltaninia J. HLA typing of patients with 21-hydroxylase deficiency in Iranian children with congenital adrenal hyperplasia. *Biochem Genet*. 2008;46(11-12):712-9
226. Ferraz-de-Souza B, Achermann JC. Disorders of adrenal development. *Endocr Dev*. 2008;13:19-32
227. Kashimada K, Ono M, Onishi T, Koyama S, Toyoura T, Imai K, Saisho S, Mizutani S. Clinical course of patients with nonclassical 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) diagnosed in infancy and childhood. *Endocr J*. 2008;55(2):397-404
228. Speiser PW. Prenatal and neonatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res*. 2007;68 Suppl 5:90-2
229. Kelestimur F. Non-classic congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2006;3 Suppl 3:451-4
230. Liivak K, Tobi S, Schlecht H, Tillmann V. Incidence of classical 21-hydroxylase deficiency and distribution of CYP21A2 mutations in Estonia. *Horm Res*. 2008;69(4):227-32
231. Ferraz-de-Souza B, Achermann JC. Disorders of adrenal development. *Endocr Dev*. 2008;13:19-32
232. Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(4):349-63
233. Goncalves J, Friaes A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(11):1-23

234. Bachelot A, Chakhtoura Z, Rouxel A, Dulon J, Touraine P. Hormonal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2007;68(4):274-80
235. Prader Von, A. Der genitalbefund beim Pseudohermaproditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms. Morphologie, Häufigkeit, Entwicklung und Vererbung der verschiedenen Genitalformen. *Helv. Pediatr. Acta* 1954;9: 231-248
236. WHO Multicentre growth reference study group. WHO Child growth standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr*, 2006; Suppl 450: 76 – 85
237. Tanner J.M. Growth of the human at the time of adolescence. *Lect.Sci.Basis Med*. 1953, 1: 308 – 63
238. 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
239. 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
240. Jaaskelainen J, Voutilainen R. Long-term outcome of classical 21-hydroxylase deficiency: diagnosis, complications and quality of life. 2000, *Acta Paediatr* 89: 183 – 87
241. Hindmarsh PC. Management of the child with congenital adrenal hyperplasia. 2009, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 193 – 208
242. Forest MG. Adrenal Function Tests. In Ranke MB (ed): *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*. Basel, Karger, 2003, 372 – 426

10. Pielikumi

Pielikums 1. IVGH epidemioloģiskie dati.

Gads	Sālszaudes forma (SZ)	Vienkāršā virilizējošā forma(VV)	Kopā	Iedzīvotāju skaits Latvijā	Bērnu skaits 0 - 17 g.v.	Dzimušo skaits
1984	1	2	3	2554063	638111	39153
1985	1	0	1	2570030	645531	40712
1986	1	0	1	2587716	653213	38954
1987	1	1	2	2612068	663457	42135
1988	0	1	1	2641097	674617	41154
1989	0	1	1	2665770	681408	39918
1990	1	0	1	2668140	682351	37919
1991	3	1	4	2658161	680312	30816
1992	2	1	3	2643000	672534	22506
1993	1	0	1	2585675	653306	23816
1994	1	1	2	2540904	635261	24256
1995	1	0	1	2500580	619185	21595
1996	0	3	3	2469531	604255	19782
1997	2	1	3	2444912	588655	18830
1998	1	4	5	2420789	572017	18410
1999	2	2	4	2399248	554665	19396
2000	4	3	7	2381715	538829	20248
2001	4	2	6	2364254	521509	19664
2001	3	1	4	2345768	502509	20020
Kopā	29	24	53			

Pielikums 2. IVGH incidence pasaulē.

IVGH incidence pasaulē				
	Biežums	Skaits	Incidence	Incidence
Japāna	1 / 20892	20892	0,000048	4,8
Latvija		17795	0,000056	5,6
Vid.pasaulē	1 / 14000	14000	0,000071	7,1
Zviedrija	1 / 12758	12758	0,000078	7,8
Francija	1 / 11090	11090	0,000090	9,0
Itālija	1 / 5600	5600	0,000179	17,9

Pielikums 3. IVGH pacientu sadalījums Latvijas rajonos.

IVGH pacientu sadalījums Latvijas rajonos			
	Meitenes	Zēni	Kopā
Rīga	7	8	15
Tukuma rajons		1	1
Bauskas rajons	2	1	3
Gulbenes rajons	1		1
Liepājas rajons	2	2	4
Jūrmala	1	2	3
Daugavpils	4	3	7
Limbažu rajons		1	1
Ogres rajons	1	1	2
Cēsu rajons		2	2
Kuldīgas rajons	2		2
Valmieras rajons	1	2	3
Rēzeknes rajons	1	3	4
Saldus rajons		1	1
Jelgavas rajons	1	2	3
Aizkraukles rajons		1	1

Pielikums 4. IVGH pacientu sadalījums Latvijas reģionos.

Rīga	15
Vidzeme	11
Kurzeme	8
Latgale	12
Zemgale	7
Kopā	53

Pielikums 5. Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas pacientu klasifikācija.

Iedzimtas virsnieru garozas hiperplāzijas pacientu klasifikācija			
Klīniskā forma	Pacientu skaits	Meitenes	Zēni
Tikai sālszaude	15	3	12
Sālszaude ar intersex	14	14	0
Vienkārši virilizējošā forma			
pases dzimums atbilst ģenētiskajam	20	6	14
pases dzimums neatbilst ģenētiskajam	4	0	4
Kopā	53	23	30
		(4 zēniem ģenētiskais dzimums - meitene)	

Pielikums 6. Izpētē novēroto pacientu pārskats (1).

nr	gestācijas laiks (nedēļās)	dzimšanas svars (g)	grūtniecība (kārtas skaits)	sl-bas forma	diagn.vecums (mēnešos)	virilizācijas pakāpe
1	41,5	4450	I	2	72,0	V
2	41,0	3500	I	2	12,0	III
3	40,0	3750	I	2	108,0	IV
4	38,5	2580	I	2	36,0	I
5	39,5	3750	II	2	48,0	I
6	40,0	3290	I	2	1,0	II
7	39,5	4200	II	2	156,0	III
8	40,0	3800	I	2	60,0	0
9	39,5	3750	II	2	108,0	0
10	39,0	2950	II	2	2,0	0
11	40,0	3700	I	2	1,0	II
12	41,0	3900	I	2	48,0	V
13	39,5	3450	II	2	96,0	V
14	38,5	3150	II	2	3,0	0
15	38,0	3000	I	2	18,0	0
16	38,5	2950	II	2	10,0	0
17	39,0	3250	I	2	32,0	0
18	39,5	3380	II	2	4,0	0
19	40,5	4100	II	2	8,0	0
20	39,0	3520	I	2	48,0	0
21	39,0	3280	I	2	24,0	0
22	38,5	3150	II	2	8,0	0
23	39,5	4240	III	2	20,0	0
24	38,0	2890	I	2	13,0	0
25	39,5	3800	I	1	1,0	IV
26	38,5	3790	II	1	1,0	0
27	39,5	3800	I	1	3,0	0
28	41,5	3970	I	1	1,0	0
29	41,0	3500	I	1	1,0	III
30	28,5	1350	I	1	1,5	0
31	38,0	4370	II	1	0,5	V
32	30,0	1300	I	1	2,0	0
33	41,5	3450	IV	1	0,5	0
34	37,5	1490	I	1	1,0	I
35	39,5	3850	II	1	1,0	0
36	38,5	3700	II	1	3,0	0
37	37,0	3100	I	1	1,3	0
38	38,5	3400	III	1	3,0	V
39	39,5	3850	I	1	1,0	II
40	40,0	3150	IV	1	2,0	0
41	38,0	3250	II	1	0,5	IV
42	36,5	3320	I	1	1,0	0
43	39,5	3200	I	1	1,0	0
44	33,5	2150	I	1	2,0	0
45	39,0	3800	II	1	3,0	IV
46	39,0	3750	I	1	0,5	IV
47	40,0	3130	V	1	2,0	V
48	37,0	2450	I	1	0,2	V
49	39,0	3780	III	1	2,0	IV
50	38,5	3120	II	1	1,5	III
51	38,0	3200	I	1	0,3	0

* stabiņā 'sl-bas forma' : 1 - sālszaudes forma, 2 - vienkārši virilizējošā forma

Pielikums 7. Izpētē novēroto pacientu pārskats (2).

nr	dzimums	virilizācijas pakāpe	grūtniecība	HLA	mutācijas
1	2	V	I	A1	I172N/I2G
2	2	III	I	B14	I172N/del
3	2	IV	I	A3	I172N/E38bp
4	1	I	I	Bw51	I172N/del
5	1	I	II	B14	I2G/I2G
6	1	II	I	Bw51	I172N/conv
7	2	III	II	A3	I172N/R356W
8	1	0	I	Cw4	I2G/Q318X
9	1	0	II	B14	I172N/del
10	1	0	II	Bw51	I172N/E38bp
11	1	II	I	A3	I172N/I2G
12	2	V	I	B14	I172N/Q318X
13	2	V	II	B14	I172N/R356W
14	1	0	II	Bw51	I172N/I172N
15	1	0	I	A3	I172N/del
16	1	0	II	B14	del/V281L
17	1	0	II	Bw51	I2G/del
18	1	0	II	Bw51	I172N/I2G
19	1	0	II	B14	del/P30L
20	1	0	I	Bw51	I172N/R356W
21	1	0	I	Bw51	I2G/V281L
22	1	0	II	Bw51	I172N/318X
23	1	0	III	Bw51	0
24	1	0	I	B14	I172N/R356W
25	2			A1	I2G/del
26	2			Bn47	del/del
27	1		I	Bn47	del/E38bp
28	1		II	Bn51	del/I172N-F306+t
29	2		III	Bn47	I2G/E38bp
30	2			A1	I2G/I2G
31	2			B60	I2G/del
32	1			B60	del/del
33	1			Bn47	I2G/del
34	2			B60	I2G/I2G
35	2			A3	con/E6cluster
36	1			A3	E6cluster/R356W
37	1			A1	conv/conv
38	2			B60	del/I172N-F306+t
39	2			B60	del/I172N-F306+t
40	1			Bn47	Q318X/R356W
41	2			A3	del/R356W
42	1			B60	R356W/R356W
43	1			A3	del/R356W
44	1			B60	Q318X/Q318X
45	2			A1	conv/Q318X

* stabiņā 'dzimums' : 1 - zēns, 2 - meitene

Pielikums 8. IVGH virilizējošās formas pacientu perinatālo parametru raksturojums (1).

IVGH virilizējošās formas pacientu perinatālo parametru raksturojums					
	dzimšanas	grūtniecība	gestācijas	diagnosticēšanas	virilizācijas
	svars		nedēļa	vecums	pakāpe
	(gramos)				
1	4450	I	41/42	6 gadi	V
2	3500	I	41	1 gads	III
3	3750	I	40	9 gadi	IV
4	2580	I	38/39	3 gadi	I
5	3750	II	39/40	4 gadi	I
6	3290	I	40	1 mēnesis	II
7	4200	II	39/40	13 gadi	III
8	3800	I	40	5 gadi	
9	3750	II	39/40	9 gadi	
10	2950	II	39	2 mēneši	
11	3700	I	40	1 mēnesis	II
12	3900	I	41	4 gadi	V
13	3450	II	39/40	8 gadi	V
14	3150	II	38/39	3 mēneši	
15	3000	I	38	1 gads 6 mēneši	
16	2950	II	38/39	10 mēneši	
17	3250	I	39	2 gadi 8 mēneši	
18	3380	II	39/40	4 mēneši	
19	4100	II	40/41	8 mēneši	
20	3520	I	39	4 gadi	
21	3280	I	39	2 gadi	
22	3150	II	38/39	8 mēneši	
23	4240	III	39/40	1 gads 8 mēneši	
24	2890	I	38	1 gads 1 mēnesis	

Pielikums 9. IVGH virilizējošās formas pacientu perinatālo parametru raksturojums (2).

IVGH virilizējošās formas pacientu perinatālo parametru raksturojums			
	gestācijas	dzimšanas	grūtniecība
	nedēļa	svars	
		(gramos)	
1	41,5	4450	I
2	41,0	3500	I
3	40,0	3750	I
4	38,5	2580	I
5	39,5	3750	II
6	40,0	3290	I
7	39,5	4200	II
8	40,0	3800	I
9	39,5	3750	II
10	39,0	2950	II
11	40,0	3700	I
12	41,0	3900	I
13	39,5	3450	II
14	38,5	3150	II
15	38,0	3000	I
16	38,5	2950	II
17	39,0	3250	I
18	39,5	3380	II
19	40,5	4100	II
20	39,0	3520	I
21	39,0	3280	I
22	38,5	3150	II
23	39,5	4240	III
24	38,0	2890	I
	Vidējais	3499	
	SD	479	

Pielikums 10. IVGH virilizējošās formas pacientu perinatālo parametru raksturojums (3).

IVGH virilizējošās formas pacientu perinatālo parametru raksturojums					
	diagnosticēšanas	virilizācijas	diagnosticēšanas	virilizācijas	grūtniecība
	vecums	pakāpe	vecums	pakāpe	
			(mēneši)		
1	6 gadi	V	72	V	I
2	1 gads	III	12	III	I
3	9 gadi	IV	108	IV	I
4	3 gadi	I	36	I	I
5	4 gadi	I	48	I	II
6	1 mēnesis	II	1	II	I
7	13 gadi	III	156	III	II
8	5 gadi		60	0	I
9	9 gadi		108	0	II
10	2 mēneši		2	0	II
11	1 mēnesis	II	1	II	I
12	4 gadi	V	48	V	I
13	8 gadi	V	96	V	II
14	3 mēneši		3	0	II
15	1 gads 6 mēneši		18	0	I
16	10 mēneši		10	0	II
17	2 gadi 8 mēneši		32	0	I
18	4 mēneši		4	0	II
19	8 mēneši		8	0	II
20	4 gadi		48	0	I
21	2 gadi		24	0	I
22	8 mēneši		8	0	II
23	1 gads 8 mēneši		20	0	III
24	1 gads 1 mēnesis		13	0	I

Pielikums 11. IVGH sālszaudes formas pacientu perinatālo parametru raksturojums.

IVGH sālszaudes formas pacientu perinatālo parametru raksturojums					
	dzimšanas	grūtniecība	gestācijas	diagnosticēšanas	virilizācijas
	svars		nedēļa	vecums	pakāpe
	(gramos)				
1	3800	I	39/40	1 mēnesis	IV
2	3790	II	38/39	1 mēnesis	
3	3800	I	39/40	3 mēneši	
4	3970	I	41/42	1 mēnesis	
5	3500	I	41	1 mēnesis	III
6	1350	I	28/29	1,5 mēneši	
7	4370	II	38	2 nedēļas	V
8	1300	I	30	2 mēneši	
9	3450	IV	41/42	2 nedēļas	
10	1490	I	37/38	1 mēnesis	I
11	3850	II	39/40	1 mēnesis	
12	3700	II	38/39	3 mēneši	
13	3100	I	37	1 mēnesis 1 ned	
14	3400	III	38/39	3 mēneši	V
15	3850	I	39/40	1 mēnesis	II
16	3150	IV	40	2 mēneši	
17	3250	II	38	2 nedēļas	IV
18	3320	I	36/37	1 mēnesis	
19	3200	I	39/40	1 mēnesis	
20	2150	I	33/34	2 mēneši	
21	3800	II	39	3 mēneši	IV
22	3750	I	39	2 nedēļas	IV
23	3130	V	40	2 mēneši	V
24	2450	I	37	5 dienas	V
25	3780	III	39	2 mēneši	IV
26	3120	II	38/39	1,5 mēneši	III
27	3200	I	38	11 dienas	
28	3130	II	37/38	1 mēnesis	III
29	2940	III	37/38	3 nedēļas	

Pielikums 12. IVGH manifestācijas klīnika dažādās genotipa grupās.

IVGH manifestācijas klīnika dažādās genotipa grupās							
Mutāciju grupa	Pacientu skaits	Sālszaudes klīniskie simptomi		Seruma Na (mmol/l)		Seruma K (mmol/l)	
		jā	nē	125-134	<125	5-7	>7
Nulles	19	19	0	11	8	6	13
A	13	10	3	4	6	3	7
B	18	0	18	17	1	10	8
C	3	0	3	3	0	2	1

Pielikums 13. Prader virilizācijas pakāpes atkarībā no CYP21 gēna mutāciju grupas.

Prader virilizācijas pakāpes atkarībā no CYP21 gēna mutāciju grupas			
Mutāciju grupa	Pacientu skaits	Prader virilizācijas pakāpe	
		vidējā	diapazons
Nulles	2	IV	III - V
A	9	IV	II - V
B	11	III	II - V
C	2	0	0 - III

Pielikums 14. Plastisko operāciju biežums un izdarīšanas vecums meitenēm ar IVGH.

Plastisko operāciju biežums un izdarīšanas vecums meitenēm ar IVGH							
Operācijas nosaukums	Vecums (gados)	Gadījumu skaits	Relat				
			No grupas	vec*gr.	No visiem		
Vaginoplastika	1	2	0,222	0,222	0,057	0,06	0,06
	1,5	7	0,778	1,167	0,200	0,30	0,45
				1,389		0,00	0,00
Klitorektomija	2	6	0,261	0,522	0,171	0,34	0,69
	3	7	0,304	0,913	0,200	0,60	1,80
	4	10	0,435	1,739	0,286	1,14	4,57
				3,174		0,00	0,00
Ģenētiskā dzimuma maiņa						0,00	0,00
	8	1	0,333	2,667	0,029	0,23	1,83
(virilizētas meitenes pārveide par zēnu)	9	1	0,333	3,000	0,029	0,26	2,31
	10	1	0,333	3,333	0,029	0,29	2,86
Kopā		35				3,21	14,56
			vidējais vec.		standartnovirze		1,79

Pielikums 15. HLA a.g. biežums bērniem ar IVGH salīdzinājumā ar kontroles grupu.

HLA a.g. biežums bērniem ar IVGH salīdzinājumā ar kontroles grupu				
Antigēni	SZ	VV	Kopā	Kontrole (200 bērni)
Lokuss A				
A1	4	1	5	7
A2	0	0	0	12
A3	6	4	10	5
A24	0	0	0	8
A10	0	0	0	6
A19	0	0	0	5
Lokuss C				
Cw1	0	0	0	3
Cw2	0	0	0	5
Cw3	0	0	0	7
Cw4	0	1	1	7
Cw7	0	0	0	8
Cw6	0	0	0	6
Lokuss B				
B7	0	0	0	9
B8	0	0	0	7
B14	0	8	8	2
B18	0	0	0	4
B27	0	0	0	3
B35	0	0	0	10
B40	0	0	0	6
B44	0	0	0	8
B60	10	0	10	0
Bw47	8	0	8	0
Bw51	1	14	15	2
Bw6	0	0	0	15
Bw4	0	0	0	11

Pielikums 16. CYP21 gēna mutāciju ietekme uz IVGH klīnisko formu attīstību.

Mutācijas	Slimības forma		KOPĀ
	Sālszaude	Vienkārši virilizējošā	
I2G/I2G	4	1	5
I2G/del	3	1	4
del/I172N-F306+t	3		3
I2G/R356W	2		2
R356W/R356W	2		2
del/R356W	2		2
del/del	2		2
E6cluster/R356W	1		1
I172N-R356W/V281L	1		1
I2G/E38bp	1		1
Q318X/Q318X	1		1
Q318X/R356W	1		1
con/E6cluster	1		1
conv/Q318X	1		1
conv/conv	1		1
del/E38bp	1		1
del/Q318X	1		1
del/conv	1		1
0		1	1
I172N/318X		1	1
I172N/E38bp		2	2
I172N/I172N		1	1
I172N/I2G		3	3
I172N/Q318X		1	1
I172N/R356W		4	4
I172N/conv		1	1
I172N/del		4	4
I2G/Q318X		1	1
I2G/V281L		1	1
del/P30L		1	1
del/V281L		1	1
	29	24	53

Pielikums 17. Mutāciju biežums alēlēs

Mutāciju biežums alēlēs			
Mutācija	Allēļu skaits		
	SZ	VV	Kopā
Del	14	6	20
Lielā gēnu konversija	3	1	4
Mazā konversija	1	0	1
P30L	2	9	11
R483GG	1	0	1
I2G	19	9	28
R483X	0	1	1
E38bp	1	1	2
I172N	8	15	23
E6cluster	2	0	2
V281L	1	5	6
V281G	0	2	2
F306+t	1	0	1
Q318X	2	1	3
R356W	4	2	6
P453S	0	3	3
I7	0	1	1
Nediferencētās allēles	2	4	6
Kopā	61	59	121

Pielikums 18. Genotipu kategorijas IVGH pacientu mutāciju grupās.

kategorijas IVGH pacientu mutāciju grupās						
Mutāciju grupa	Genotips	Pacientu skaits		Kopā	Dzimums	
		SZ	VV		Meitenes	Zēni
Nulles	del/del	2	0	2	1	1
	del/E38bp	1	0	1	0	1
	del/Q318X	1	0	1	0	1
	del/conv	1	0	1	1	0
	conv/Q318X	1	0	1	1	0
	del/R356W	3	0	3	2	1
	del/I172N-F306+t	4	0	4	2	2
	conv/E6cluster	1	0	1	1	0
	conv/conv	1	0	1	0	1
	E6cluster/R356W	1	0	1	0	1
	R356W/R356W	2	0	2	1	1
	Q318X/R356W	1	0	1	0	1
	Q318X/Q318X	1	0	1	0	1
	I172N-R356W/V281L	2	0	2	1	1
	Kopā	19	0	19	10	12
A	I2G/del	3	1	4	2	2
	I2G/conv	0	0	0	0	0
	I2G/E37bp	1	0	1	1	0
	I2G/I2G	4	1	5	2	3
	I2G/F306+t	0	0	0	0	0
	I2G/E6cluster	0	0	0	0	0
	I2G/Q318X	0	1	1	0	1
	I2G/R356W	2	0	2	1	1
	Kopā	10	3	13	6	7
B	I172N/del	0	4	4	1	3
	I172N/R356W	0	4	4	2	2
	I172N/E38bp	0	2	2	1	1
	I172N/conv	0	1	1	0	1
	I172N/I2G	0	3	3	1	2
	I172N/Q318X	0	1	1	0	1
	I172N/I172N	0	3	3	1	2
	Kopā	0	18	18	6	12
C	I2G/V281L	0	1	1	1	0
	del/V281L	0	1	1	0	1
	conv/V281L	0	0	0	0	0
	conv/P30L	0	0	0	0	0
	I172N/V281L	0	0	0	0	0
	del/P30L	0	1	1	0	1
	I2G/P30L	0	0	0	0	0
	Kopā	0	3	3	1	2
Kontroles grupā analizēti 20 paraugi - CYP gēna mutācijas nav atrastas.						

Pielikums 19. Piekrišana molekulāri ģenētiskam pētījumam.

Vārds, uzvārds:

Identifikācijas numurs:

Par šo pētījumu esmu informēts. Informāciju, kas man dota par šo pētījumu esmu sapratis.

- Es piekrītu, ka mans bērns nodod asinis DNS izdalīšanai molekulāri ģenētiskiem pētījumiem
- Es saprotu, ka asiņu nodošana nerada risku mana bērna veselībai, kas man ir izskaidrots
- Es piekrītu, ka ar mana bērna DNS veiks molekulāri ģenētiskus pētījumus pēc pētnieku ieskatiem, saglabājot pilnīgu mana bērna datu konfidencialitāti
- Es saprotu, ka jebkura manu bērna identificējoša informācija būs konfidenciāla un ka visi mana bērna DNS paraugi būs kodēti
- Es piekrītu, ka mans bērns brīvprātīgi piedalās pētījumā un apzinos, ka es jebkurā brīdī bez jebkādiem paskaidrojumiem varu pārtraukt mana bērna piedalīšanos šajā pētījumā zinot, ka tas neietekmēs mana bērna turpmāko ārstēšanos

(datums)

(izmeklējamās personas vecāku paraksts;
paraksts atšifrējams ar drukātiem burtiem)

Apstiprinu, ka esmu informējis izmeklējamās personas vecākus par šo pētījumu un ka izmeklējamās personas vecāki ir saņēmuši un izlasījuši "Informāciju izmeklējamai personai".

(datums)

(izpēti veicošās personas paraksts;
paraksts atšifrējams ar drukātiem burtiem)

Pielikums 20. Informācija izmeklējamās personas vecākiem.

Lūdzam Jūsu bērnu piedalīties pētījumā, kurā tiks analizēta izmeklējamās personas (Jūsu bērna) DNS.

Izmeklēšanas gaitā DNS izdalīs no leukocītiem, tādēļ Jūsu bērnam no vēnas būs jāpaņem 5 ml asinis.

Izdalītais un attīrītais DNS materiāls ar mūsdienu molekulāri-bioloģiskām metodēm tiks izmeklēts uz specifiskām izmaiņām (mutācijām) DNS molekulā, kuras varētu būt Jūsu bērna vai kāda Jūsu ģimenes locekļa slimības iemesls.

DNS analīzes rezultātā iegūtā informācija ir ļoti precīza un viennozīmīgi interpretējama. Kļūdu iespējamība (tāda pastāv arī vislabākajās laboratorijās) ir aptuveni 1 uz 1000 analīzēm. Tomēr jāatzīmē, ka daļu slimību var izraisīt vairākas vai pat – ļoti daudzas mutācijas, no kurām patreiz vēl nebūt ne visas ir zināmas. Praktiski ar situāciju, kad kādu noteiktu (slimību izraisīšu) mutāciju noteikt neizdodas un paliek kādas nezināmas mutācijas iespējamība, sastopas reti. Šādā gadījumā Jūs saņemsiet visu iespējamo informāciju un skaidrojumu.

DNS analīzei ir ļoti svarīga nozīme Jūsu bērna slimības diagnozes precizēšanai, slimības gaitas izvērtēšanai un prognozēšanai, kā arī šīs slimības riska apsvērumiem attiecībā uz citiem Jūsu ģimenes locekļiem.

Slimību izraisīto mutācijas atklāšanas gadījumā Jūsu bērna DNS molekulā, Jums tiks piedāvāta speciālista konsultācija, kuras laikā Jums izskaidros šīs analīzes rezultātus un to nozīmi gan Jūsu bērnam, gan arī citiem Jūsu ģimenes locekļiem.

Jūsu bērna piedalīšanās pētījumā ir pilnīgi brīvprātīga un Jūs to varat brīvi un jebkurā laikā pārtraukt, šādu savu rīcību nemotivējot. Jūsu lēmums par izstāšanos no pētījuma ne-kādā ziņā neietekmēs Jūsu bērna turpmāko ārstēšanos. Šādā gadījumā Jūsu bērna DNS paraugs tiks iznīcināts.

Analīzes rezultāti tiks ierakstīti pētījuma žurnālā un būs pieejami tikai pētījumā iesaistītajiem speciālistiem. Nevienam citam, bez Jūsu piekrišanas, Jūsu bērna DNS analīzes dati netiks izpausti.

Visos gadījumos, kad Jums rodas ar DNS analīzi saistīti jautājumi, lūdzam zvanīt Dr. Dzīvītei pa telefonu 7064436.

Informācija izmeklējamai personai ir parakstāma 2 eksemplāros, no kuriem viens glabāsies pie izpētes veicēja, bet otrs – pie izmeklējamās personas.

(datums)

(izmeklējamās personas vecāku paraksts;
paraksts atšifrējams ar drukātiem burtiem)

Apstiprinu, ka esmu informējis izmeklējamās personas vecākus par šo pētījumu un ka izmeklējamās personas vecāki ir saņēmuši un izlasījuši "Informāciju izmeklējamai personai".

(datums)

(izpēti veicošās personas paraksts;
paraksts atšifrējams ar drukātiem burtiem)

Pielikums 21. Sākotnējā informācija par IVGH slimnieku.

1. lpp

Sākotnējā medicīniskā informācija par IVGH slimnieku

Datums _____

IVGH sl-ka kartes N. _____

Uzvārds, vārds _____

Dzimums

Kā dzimums noteikts (apvilkt)

H – noteikts kariotips T – atrastas testes C – ar citu metodi (kādu ?) _____

Gestācijas vecums _____ nedēļas Dzimšanas svars _____ g Kura grūtniecība ? _____

IVGH klīniskā forma (apvilkt) - sāls zaudes - vienkāršā virilizējošā

Kādu IVGH kritēriju klātbūtne klīniskās formas diagnozi (vai aizdomas par to) pamato:

I. Ārējo dzimumorgānu izvērtējums (virilizācijas pakāpes pēc Prader skalas)

VIRILIZĀCIJAS PAK.
NOTEIKŠANA PĒC
PRADER SKALAS



IVGH ārējo dzimumorgānu veidošanos ietekmē plašā spektrā – sākot no normālu ārējo genitāliju veidošanos meitenei (attēla kreisajā pusē) vai zēnam (attēla labajā pusē) līdz pat pilnai femīna pseudohermafroditisma simptomātikai.

I pakāpes virilizācija raksturojas ar nelielu klitora hiperplāziju; sākot no **II pakāpes** novēro lielo kaunuma lūpu saplūšanu, kas **IV pakāpes** gadījumā veido urogenitālo sīnusu; pie **V pakāpes** ir izveidojusies penila uretra.

OBJEKTĪVĀ ATRADNE
UN OPERATĪVAS
TERAPIJAS APSVĒRUMI

Klitora/penis garums _____ mm

Genit. pigmentācija

Urogenitālais sīnuss (apvilkt)

Kaunuma lūpas saplūdušas par (apvilkt)

Vai urogenitālā plastika būs nepieciešama ? (apvilkt)

II. Laboratorie izmeklējumi

- Kariotips
- Hormonālās un bioķīmiskās raudzes

17-(OH)-P (sērumā) ng/dl DHEA ng/dl Nātrijs mmol/l
 Kortizols ng/dl Androstendions ng/dl Kālijs mmol/l
 Testosterons ng/dl
 Testosterons ng/dl

- ACTH stimulācija: 17-(OH)-P (izeja) ng/dl 17-(OH)-P (60 min.) ng/dl

III. Sākotnējā terapija

		PREPARĀTS	DNN DEVA	SHĒMA	IEVAD.VEIDS
GLIKO	Cortinef				
KORTIKOĪDI	Citi				
MINERALO-	Florinef				
KORTIKOĪDI	Citi				

CITI MEDIKAMENTI

..... IEMESLI	PREPARĀTS	DNN DEVA	SHĒMA	IEVAD.VEIDS
.....				
.....				

IV. Klīniskā simptomātika

(apvilkt esošos simptomus vai ierakstīt papildus un tad arī apvilkt)

Neskaidra dzimuma	Slikti ēd	Dehidratācija	Citi simptomi (ierakstīt)
ārējās genitālijas	Slikti pieņemamas svarā	Hiperkālijēmija	
Vemšana	Apātija	Hiponātrijēmija	
Caureja			

V. Hospitalizācija

Datums Datums
 Iemesls Iemesls

Konsultējošais bērnu endokrinologs

Pielikums 22. Aktuāla informācija par IVGH slimnieku.

Aktuāla medicīniskā informācija par IVGH slimnieku

Uzvārds, vārds

Dzimšanas datums IVGH sl-ka kartes N.

IVGH klīniskā ☐ SZ Sālszaudes ☐ VV Vienkāršā virilizējošā ☐ NK Neklasiskā
forma (apvilkt) ☐ NS Neskaidra ☐ C Ne-21-hidroksilāzes
deficīts

Apmekl. datums Augums cm SD Svars kg SD

Jauns radinieks (apvilkt) ☐ Jā ☐ Nē ... dzimums ☐ S ☐ V ... slimo ar IVGH ☐ Jā ☐ Nē

I. Genitāliju statuss

- Patreizēja virilizācijas pakāpe pēc Prader
- Patreizēja pubertātes stadija pēc Tanner (apvilkt) ☐ I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐ V
- Nesena urogenitāla plastika ☐ Jā ☐ Nē Ķirurģs
- o Operācijas datums un īss apraksts

II. Laboratoro izmeklējumu dati

17-(OH)-P (sērūmā) ng/dl DHEA ng/dl Nātrijs mmol/l
Kortizols ng/dl Androstendions ng/dl Kālijs mmol/l
Testosterons ng/dl

ACTH stimulācija: 17-(OH)-P (izeja) ng/dl 17-(OH)-P (60 min.) ng/dl

III. Šajā apmeklējumā nozīmētie medikamenti

	PREPARĀTS	DNN DEVA	SHĒMA	IEVAD.VEIDS
GLIKO-	☐ Cortinef			
KORTIKOĪDI	☐ Citi			
MINERALO-	☐ Florinef			
KORTIKOĪDI	☐ Citi			

CITI MEDIKAMENTI

IEMESLI	PREPARĀTS	DNN DEVA	SHĒMA	IEVAD.VEIDS
.....				
.....				

I. Slimnieka un vecāku attieksme pret ārstēšanos

- Slimnieka un vecāku attieksme pret ārstēšanos ir (apvilkt):

Slikta Apmierinoša Laba

- Slimnieka un vecāku attieksme pret ārstēšanos kopš iepriekšējā apmeklējuma salīdzinoši ir (apvilkt):

Pasliktinājies Nav mainījies Uzlabojies

II. IVGH ārstēšanas kvalitāte

- Cik reizes medikamenti izlaisti ? Cik bieži vecāki ir mainījuši devu?

- IVGH kompensācija visumā ir (apvilkt):

Slikta Apmierinoša Laba

- IVGH kompensācija dinamikā kopš iepriekšējā apmeklējuma

salīdzinoši ir (apvilkt):

Pasliktinājies Nav mainījies Uzlabojies

III. Nesenas hospitalizācijas

Datums Iemesls

.....

.....

IV. Ārsta komentārs

.....

.....

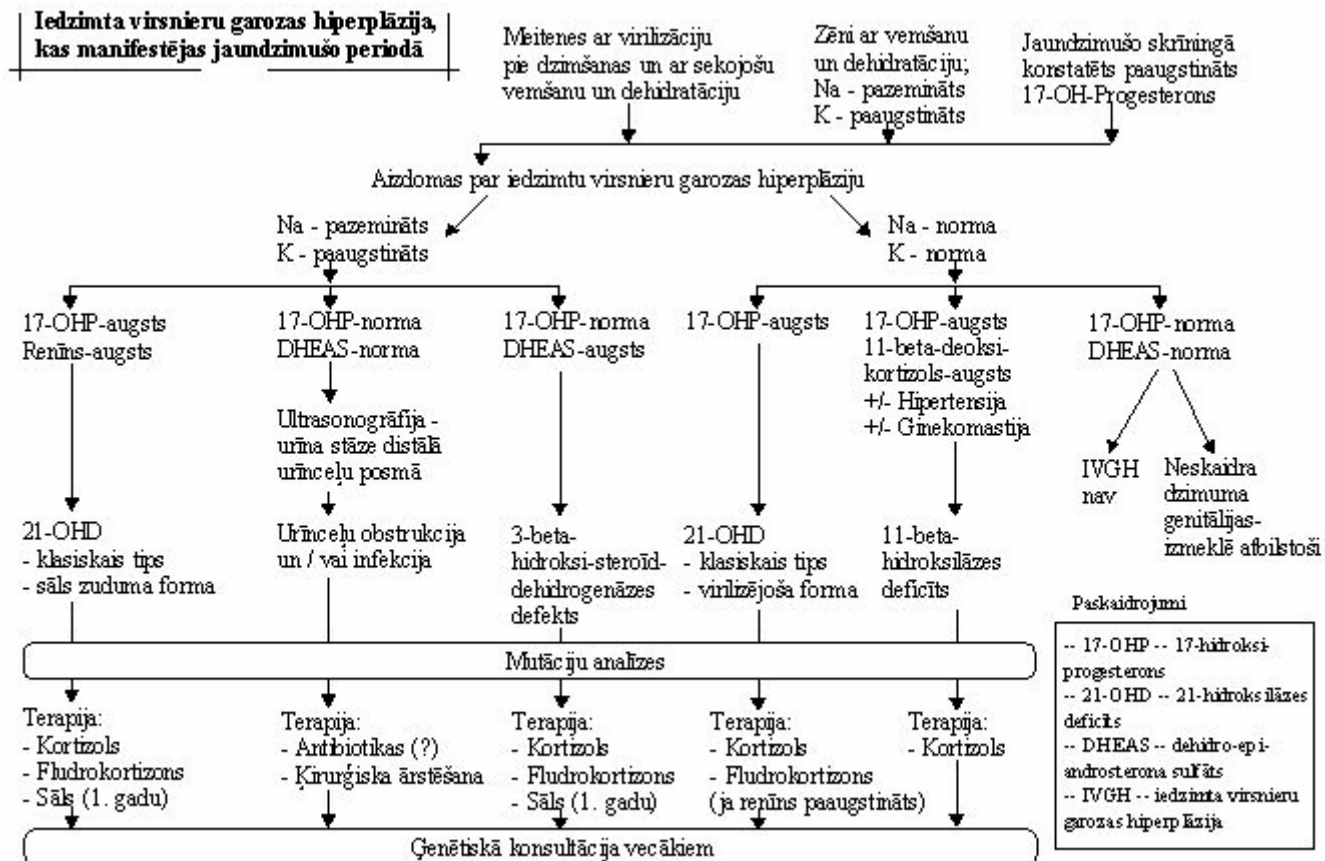
.....

.....

Konsultējošais bērnu endokrinologs

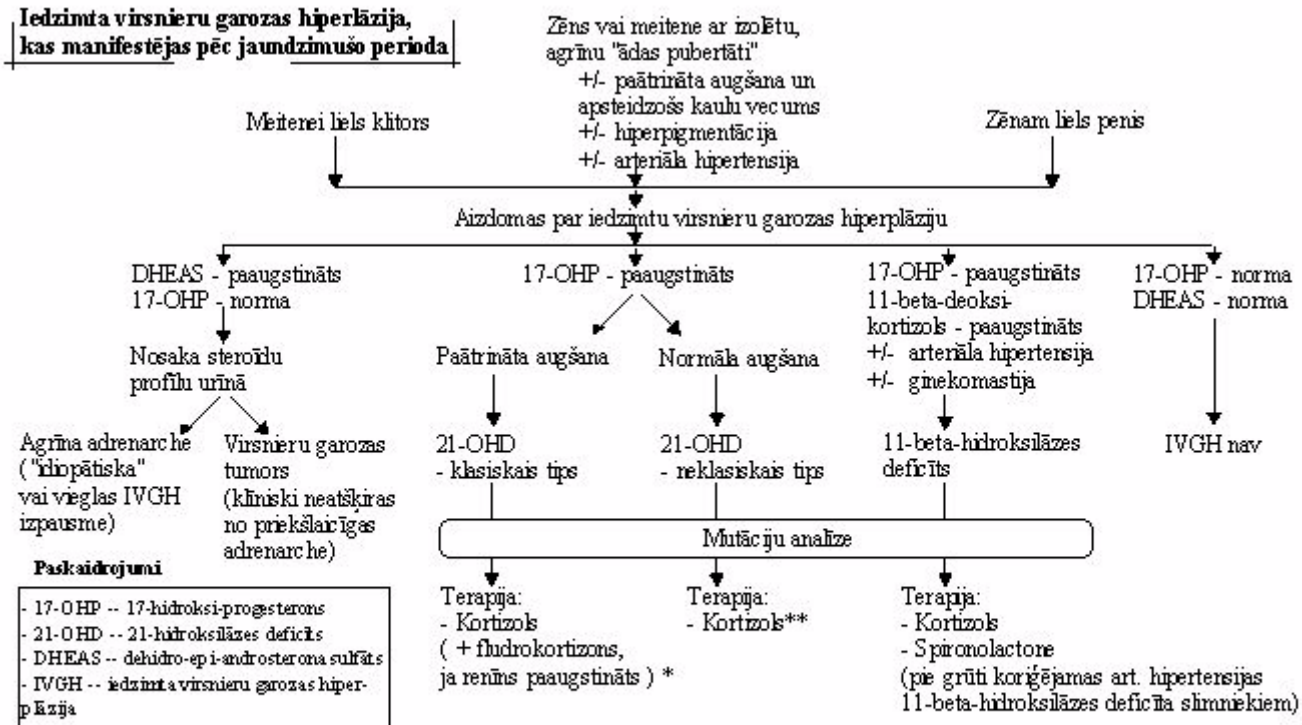
Datums

Pielikums 23. IVGH diagnostikas algoritms jaundzimušiem [222].



Pielikums 24. IVGH diagnostikas algoritms bērniem pēc jaundzimušo perioda [223].

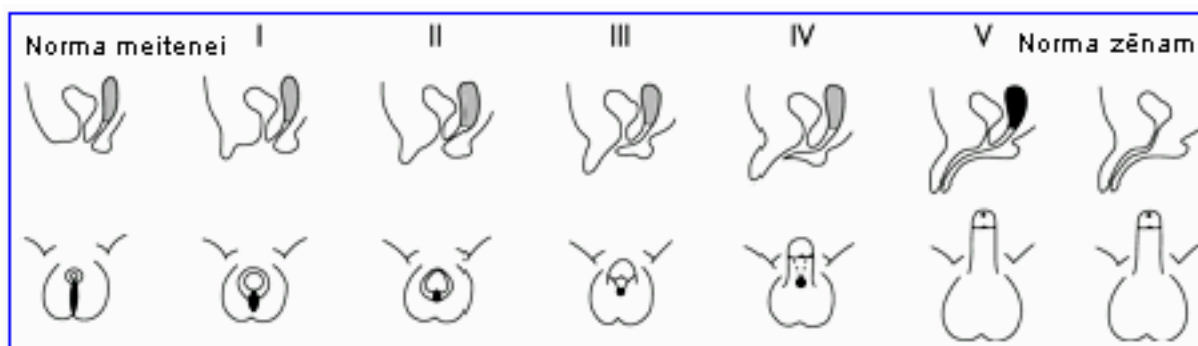
Iedzimta virsnieru garozas hiperlāzija, kas manifestējas pēc jaundzimušo perioda



* Pie vidēji smagas 21-OHD formas sāls zudums var notikt bez redzamām klīniskām pazīmēm. Paaugstinātais renāls līmenis norāda uz pārvājinātām mineralkortikoidu sintēzes iespējām. Fludrokortizons 0.05-0.1 mg/m²/dien kompensē mineralkortikoidu deficītu un ļauj samazināt glikokortikoidu devu.

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

Pielikums 25. *Prader* virilizācijas skala [235].



Prader 0: Normāli sievišķie ārējie dzimumorgāni.

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

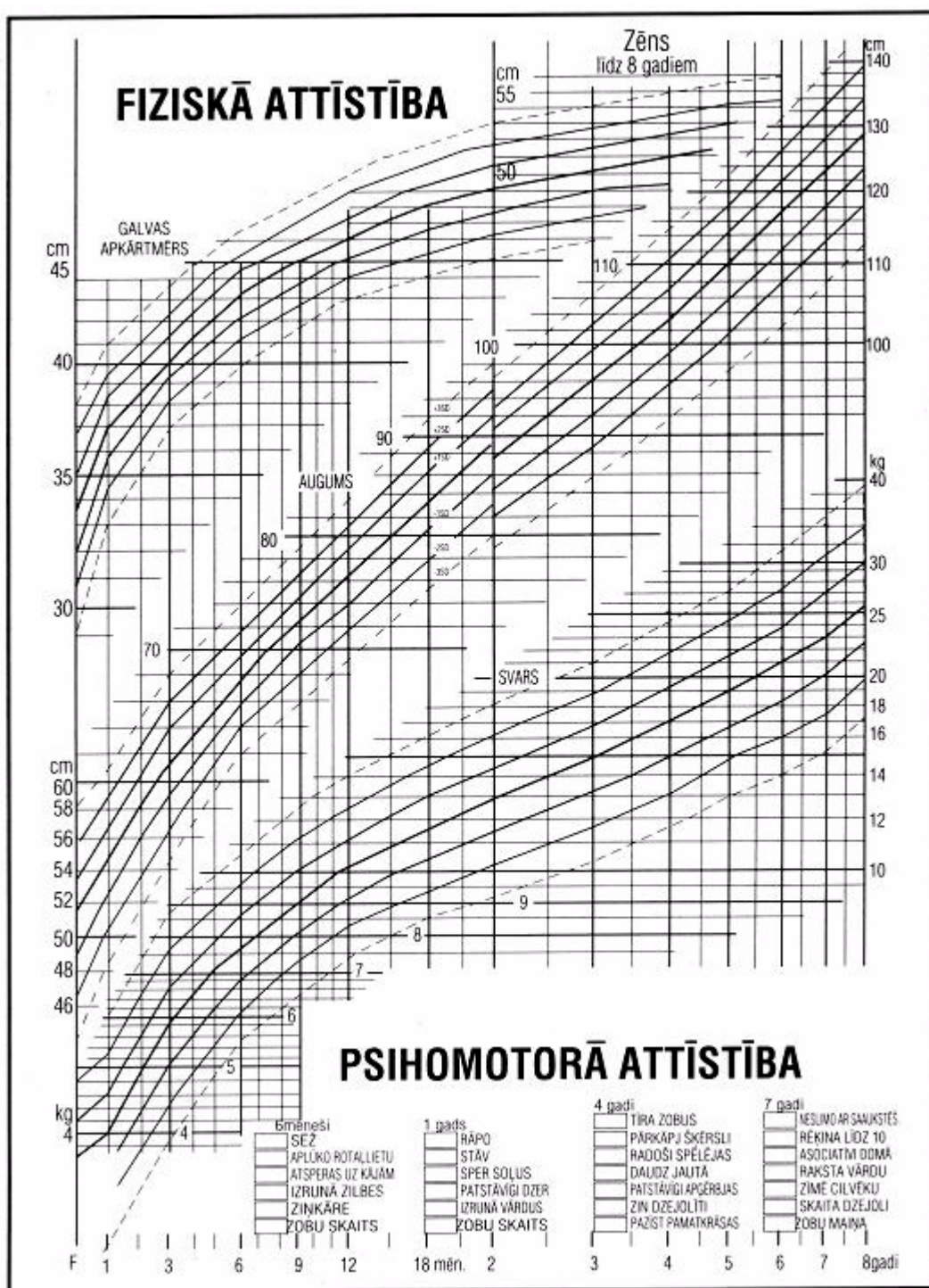
Prader II: Klitoromegālija ar daļēju kaunuma lūpu saplūšanu, kuras tādējādi veido piltuvveida urogenitālo sīnusu; maksts un uretra atveras uz šo piltuvveidīgo veidojumu.

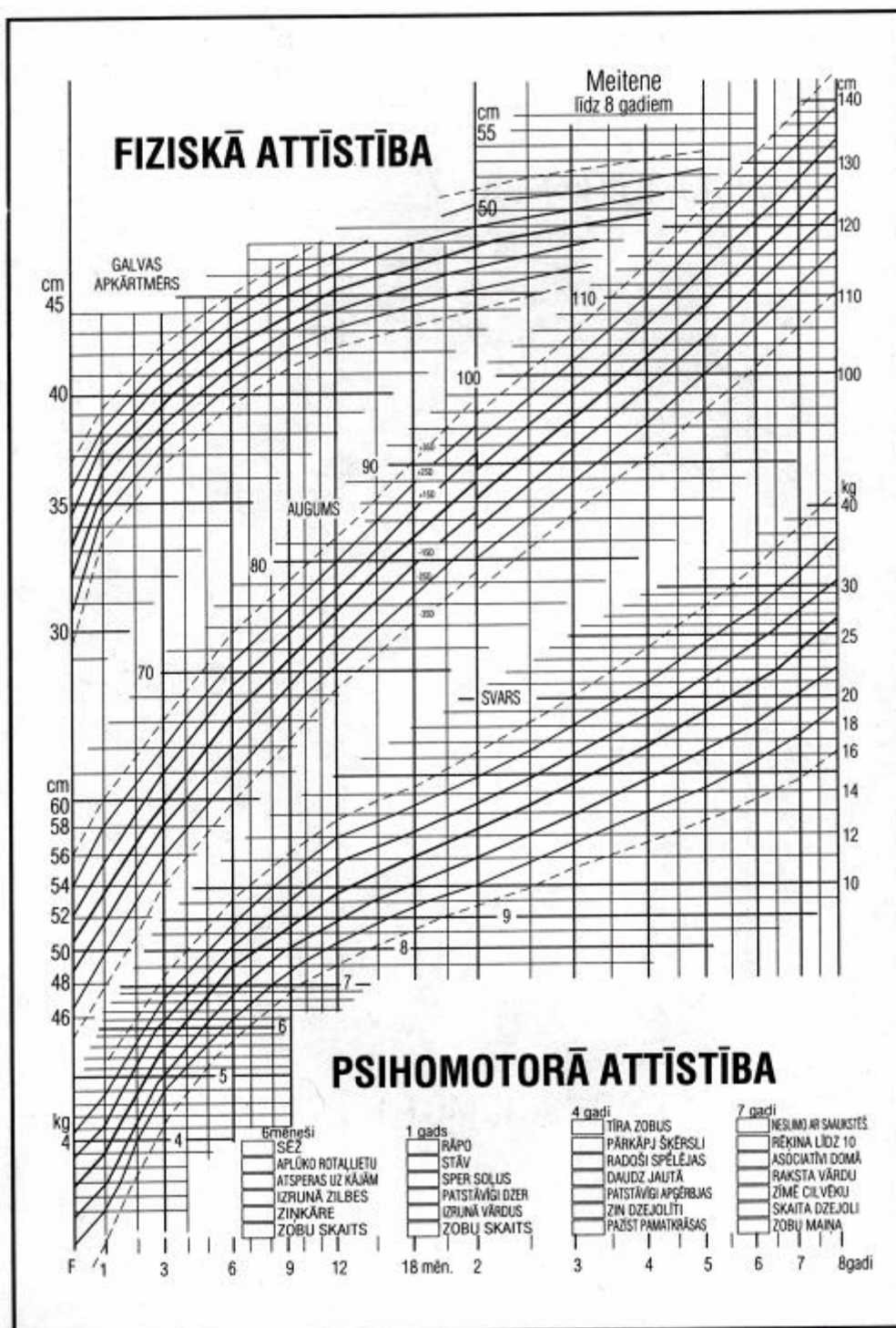
Prader III: Klitoromegālija sasniedz *phallus* apmērus; pilna kaunuma lūpu saplūšana, veidojot urogenitālo sīnusu uz kuru atveras maksts un uretra; urogenitālajam sīnusam ir viena ārējā atvere.

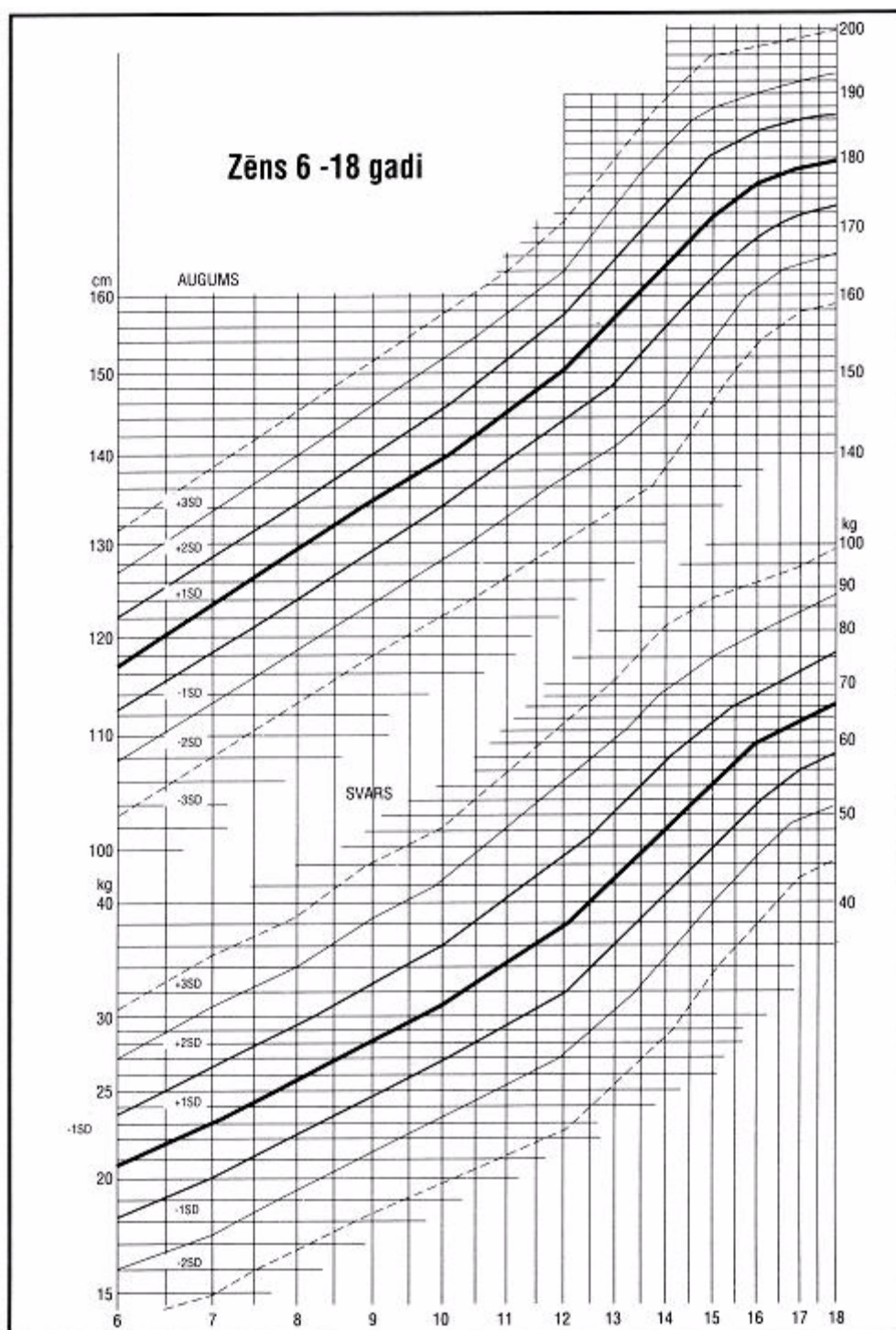
Prader IV: Ārējos dzimumorgānus veido *phallus* un pilnīgi saaugušas kaunuma lūpas, veidojot *scrotum* līdzīgu veidojumu; maksts un uretra atveras uz kopēju atveri *phallus* pamatnē.

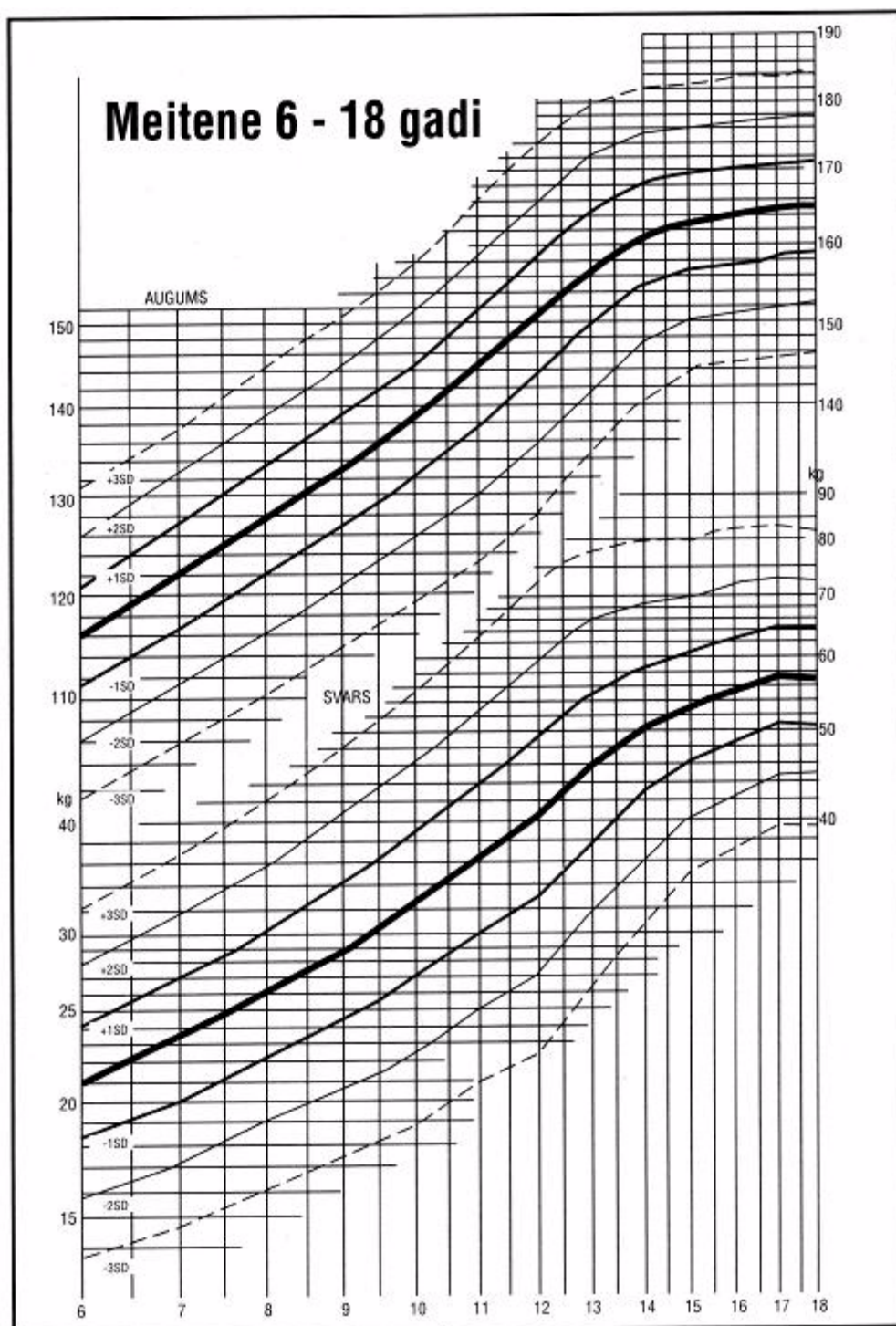
Prader V: Ārējie dzimumorgāni pēc izskata atgādina normālus vīrišķos ārējos dzimumorgānus; maksts un uretra atveras ar kopēju atveri *phallus* galā.

Pielikums 26. Augšanas līknes [236].









Pielikums 27. 17α OHPg līmeņa asinīs references rādītāji [241, 242].

0 – 5 mēnešu vecumam: 0.3 – 10.9 ng/ml

5 mēnešu – 7 gadu vecumam: 0.1 – 0.8 ng/ml

7 – 10 gadu vecumam: 0.3 – 0.9 ng/ml

Virs 10 gadu vecuma: 0.2 – 1.3 ng/ml