



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

FENOTİP VE GENOTİP İLİŞKİSİNİN 21-HİDROKSİLİZ
EKSİKLİĞİ OLAN OLGULARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ASMAR AGHAYEVA AHMADOVA

TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. OYA ERCAN

İSTANBUL – 2018

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlık sürecinde ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından ötürü değerli tez hocam, sayın Prof. Dr. Oya ERCAN'a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve desteklerini her zaman hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ahmet ARVAS ve tüm saygıdeğer ve kıymetli hocalarıma, uzman hekimlere, klinik-poliklinik hemşire ve çalışanlarına

Tez çalışmamda destek olan, yol gösteren ve sonuçların değerlendirilmesinde büyük emeği geçen Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ'e

Çalışma süresince yardımını esirgemeyen ve her zaman anlayış gösteren Endokrinoloji polikliniği ekibine

Dizi analizlerinin yapıldığı Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Munis Dünder ve biyolog Mustafa AKKUŞ'a

MLPA analizlerinin yapıldığı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda genetik sonuçların yorumlanmasında ve eksikliklerin tamamlanmasında yardımcı olan, destek ve anlayışını esirgemeyen Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER ve Dr. Güven TOKSOY'a

Genetik konusunda bilgilerinden faydalandığım, çok sevdiğim ablam Uzm. Dr. Nilay GÜNEŞ'e

Çocuk kliniğindeki asistanlık eğitimimin zor ve güzel anlarını paylaştığım değerleri doktor arkadaşlarıma,

Ve her şeyden önce

Hayatım boyunca bana destek olan ve bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim anneme, babama, abime ve tüm aile yakınlarıma

Anlayışı, desteği ve sabrı için eşime ve hayatımıza renk katan oğlum Kenan'a

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
SİMGELER-KISALTAMALAR	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Konjenita Adrenal Hiperplazi	2
2.2. Konjenital adrenal hiperplazide androjen fazlalığı	4
2.3. Pubertal gelişim.....	5
2.4. Fertilite	5
2.5. Adrenal medulla	5
2.6. Konjenital adrenal hiperplazide tuz kaybı.....	5
2.7. Non-klasik 21-hidroksilaz Eksikliği	6
2.8. Konjenital adrenal hiperplazide nörofizyoloji	7
2.9. Konjenital adrenal hiperplazide malignite	7
2.10. Yirmi bir hidroksilaz eksikliği tanısı.....	8
2.11. Kuşkulu genitaliyanın değerlendirilmesi.	8
2.12. Yenidoğan taraması.....	9
2.13. Moleküler genetik	10
2.14. 21-Hidroksilaz eksikliğine yol açan mutasyonlar	11
2.15. Genetik testler	15
2.16. Test sonuçlarının yorumlanması	16
2.17. Genotip-fenotip korelasyonu.....	16
2.18. Tedavi.....	19
2.18.1. Glukokortikoid tedavisi	19
2.18.2. Mineralokortikoid tedavisi	21
2.18.3. Diğer terapötik yaklaşımlar	21

2.18.4. Cerrahi tedavi	22
2.18.5. Puberte prekoks tedavisi.....	22
2.19. Prenatal tanı ve tedavi	22
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Olgular.....	24
3.2. Fenotip değerlendirilme	24
3.3. Genotip değerlendirme.....	24
3.4. Metod	27
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA.....	42
SONUÇLAR.....	49
7. KAYNAKLAR	51

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 1: Klasik ve non-klasik 21-OHE KAH-de klinik özellikler (Nimkarn S.ve Gangishetti P.K 2016'dan alınmıştır).	3
Tablo 2: 17-hidroksiprogesteron düzeyine dayalı 21-hidroksilaz eksikliği tanısı (Speicer ve ark. 2010).	8
Tablo 3: CYP21A geninde sık görülen mutasyonlar.	12
Tablo 4: Merkez I ve Merkez II'de çalışılan genetik testlerin karşılaştırılması	25
Tablo 5: Genetik testlerin çalışıldığı merkezler	25
Tablo 6: Dizi analizi ve MLPA testi sonuçlarının karşılaştırılması.....	28
Tablo 7: Tek merkezde çalışılan olgular.....	29
Tablo 8: Merkez I'de ve merkez II'de genetik sonuçları aynı saptanan olgular	29
Tablo 9: Merkez I'de CYP21A2 geni çoğaltılmayan ve merkez II'de delesyon ve konversiyon saptanan olgular	30
Tablo 10. Merkez I'de homozigot nokta mutasyon, merkez II'de ise delesyon saptanan hastalar	30
Tablo 11: Merkez II'de çalışılmayan mutasyonların saptandığı hastalar	31
Tablo 12: Genotipi belirlenemeyen olgular	32
13: Anne ve babada dizi analizi yapılan olgular	32
Tablo 14: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği tanılı hastaların klinik ve biyokimyasal verileri ve moleküler defektler	34
Tablo 15: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği olgularının hastalık tipi ve cinsiyete göre dağılımı	35
Tablo 16: Kardeş olan 21-hidroksilaz eksikliği tanılı hastalarımızın genotip ve fenotip özellikleri	36
Tablo 17: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği olan 37 hastanın 74 allelinde saptanan mutasyonların sıklığı.....	38
Tablo 18: Olgularımızda genotip-fenotip uyumu	41
Tablo 19: Çalışmamızda ve literatürdeki 9 en sık rastlanan mutasyon sıklıkları	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1: CYP21A geni lokalizasyonu ve genetik haritası.	11
Şekil 2: Tüm KAH-1 vakaların hastalık tipine göre dağılımı.	35
Şekil 3: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği olan XX ve XY vakalarının hastalık tipine göre dağılımı	36
Şekil 4: Otuz yedi hastada CYP21 geninde rastlanan allel sıklıkları	38
Şekil 5: Tuz kaybettiren formu 15 KAH hastasında rastlanan patojen allel sıklıkları ..	39
Şekil 6: Basit virilizan formu 15 KAH hastasında CYP21 geninde rastlanan patojen allel sıklıklar.	39
Şekil 7: Non-klasik formu 7 KAH hastasında CYP21 geninde saptanan patojen allel sıklıkları.	40

SİMGELER-KISALTAMALAR

ACTH	: Adrenocorticotropin Hormone
BV	: Basit Virilizan
CYP21	: CYTOCHROME P450, SUBFAMILY XXI
CYP21A2	: CYTOCHROME P450, SUBFAMILY XXI
CYP21B	: CYTOCHROME P450, SUBFAMILY XXI
CYP21P	: CYP21 psödogeni
CYP21PA1	: CYP21 psödogeni
CYP21PA	: CYP21 psödogeni
CRH	: Corticotropin-releasing hormone
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GnRH	: Gonadotropin-releasing hormone
HLA	: Human leukocyte antigen
KAH	: Konjenital Adrenal Hiperplazi
LH	: Lüteinizan hormon
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleksi
MLPA	: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
11-HSD	: 11- β hidrosisteroid dehidrogenaz
17-OHP	: 17 -OH Progesteron
21-OHE	: 21-Hidroksilaz Eksikliği

- PCR** : Polimerase Chain Reaction
- PPV** : Pozitif öngördürütçü değ r (positive predictive value)
- PRA** : Plazma renin aktivitesi
- RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism
- RNA** : Ribonükleik asit
- TK** : Tuz kaybettiren



ÖZET

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH), bozulmuş kortizol senteziyle karakterize otozomal çekinik geçişli endokrin bozukluklardan biridir ve en sık nedeni 21-hidroksilaz eksikliğidir.

Çalışmamızda 21-hidroksilaz eksikliğine bağlı klasik ve non-klasik konjenital adrenal hiperplazi hastalarında dizi analizi ve çoklu ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) teknikleriyle saptanan CYP21 geni mutasyonlarının varlığını ve sıklığını araştırmak, Türkiye’de ve yurtdışında yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırmak, varsa yeni mutasyonları saptamak ve mutasyon tipleri ile fenotip-genotip ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmaya, yaş aralığı gözetmeksizin, İ.Ü. Çerhpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji polikliniğinde 21-hidroksilaz eksikliği klinik tanısı ile takip ve tedavi edilen/edilmiş 40 olgu alınmıştır, bu olguların 37’sinde genotip belirlenmiştir. Bu 37 olgunun 73 allelinde mutasyon saptanmıştır.

En sık görülen mutasyonlar IVS2 (%28.3), I172N (%17,5) ve büyük gen delesyonları (%14.7) olmuştur. Ayrıca Türkiye’de daha önce saptanmamış olan Y59N mutasyonu bir allelde ve V281L mutasyonu Türkiye’de ve yurtdışındaki çalışmalara göre yüksek oranda (%10.8) bulunmuştur. Yeni mutasyon saptanmamıştır. Genotipler mutasyonların literatüre göre öngörülen tahmini enzim aktivitesine göre gruplandırılarak (grup 0, A, B ve C), klinik fenotiple karşılaştırılmıştır. Grup 0’da (her iki allelde enzim aktivitesini sıfırlayan mutasyonu olan hastalar) pozitif öngördürücü değer (ppv) %80, grup A’da (IVS2 mutasyonu için homozigot olan veya IVS2 ve sıfır mutasyonu için bileşik heterozigot olan hastalar) ppv %50, grup B’de (I172N mutasyonu için homozigot veya 0 ve A grupları ile bileşik heterozigot olan hastalar) ppv %85, grup C’de (V281L, P30L mutasyonu için homozigot veya 0, A veya B ile bileşik heterozigot olan hastalar) ppv %100 saptandı.

Sonuç olarak, basit virilizan tip KAH olgularında fenotipin tuz kaybettiren tip ve non-klasik tip KAH olgularına göre genotiple daha az uyumlu olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: CYP21A2, KAH, 21-hidroksilaz eksikliği, mutasyon, steroid.

ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is an autosomal recessive endocrine disorder characterized by impaired cortisol synthesis and the most common cause is 21-hydroxylase deficiency.

In our study we aimed to investigate in classic and non-classic congenital adrenal hyperplasia patients the presence of CYP21 gene mutations which detected by sequence analysis and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique, investigate the mutations frequency, compare it with other studies conducted in Turkey and abroad, to identify new mutations, and evaluate the types of mutations and genotype-phenotype relationship.

For this purpose, in our study, 40 cases, which were followed and treated with 21-hydroxylase deficiency clinical diagnosis in İ.U. Cerrahpasha Medical Faculty Pediatric Endocrinology Clinic, without regard to age range were included. Genotypes were determined in 37 of these cases. Mutations were detected in 73 alleles of these 37 cases.

The most common mutations were IVS2 (28.3%), I172N (17.5%) and large gene deletions (14.7%). In addition, Y59N mutation that has not been previously detected in Turkey and high rate (10.8%) V281L mutation allele according to studies in Turkey and abroad were found. Genotypic mutations were grouped (group 0, A, B and C) according to the predicted enzyme activity in the literature, and was compared with the clinical phenotype. In group 0 (patients with null mutation in both alleles) positive predictive value (ppv) was %80, in group A (homozygous for IVS2 mutation or compound heterozygous for null mutation) ppv was 50%, in group B (patients homozygous for I172N mutation or compound heterozygous for groups 0 and A) ppv was 85%, group C (homozygous for V281L, P30L mutation or compound heterozygous with 0, A or B) ppv was 100%.

In conclusion, in simple virilisation type CAH cases was found to be less genotype-phenotype correlation than salt waste and non-classical type of CAH.

Key words: CYP21A2, CAH, 21-hydroxylase deficiency, mutation, steroid hormones.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital adrenal hiperplazi, bozulmuş kortizol senteziyle karakterize otozomal çekinik geçişli endokrin bozukluklardan biridir. KAH olgularının %95'i 21-hidroksilaz (21OH) enziminde mutasyon sonucu aktivite kaybıyla oluşmaktadır.

Konjenital adrenal hiperplaziye neden olan 100'den fazla mutasyon bulunmaktadır. CYP21A2'in delesyonları (%20), CYP21A1P'deki zararlı mutasyonları CYP21A2'ye transfer eden büyük gen konversiyonları (%3-15), duplikasyon (%2-9) ve nokta mutasyonları (%38-86) görülmektedir. KAH'ın klinik ekspresyonunun mutant allele korrele olduğu bildirilmektedir. Bu şekilde belli bir genotip için hangi formun gözlenebileceği öngörülerek hormonal tanının mümkün olmadığı KAH'ın prenatal tanısında yararlı olabilir. Ayrıca genotip verileri CYP21A2 mutasyonu için heterozigot olan ebeveynlerde normal hamilelik ya da tüp bebek uygulamaları öncesi genetik danışmada önem taşıyabilir.

Biz de bu çalışmada, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalından takipli 21-hidroksilaz eksikliğine bağlı konjenital adrenal hiperplazi tanısı almış olgularımızda CYP21 geni için sık rastlanan mutasyonların varlığını ve sıklığını araştırmak, Türkiye'de ve yurtdışında yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırmak, varsa yeni mutasyonları saptamak ve mutasyon tipleri ile fenotip-genotip ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Konjenita Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH), bozulmuş kortizol senteziyle karakterize otozomal çekinik geçişli endokrin bozukluklardan biridir ve kortizol ve aldosteron biyosentezi için gerekli enzimlerden birinin aktivitesinin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Bu enzim, KAH vakalarının %95'inde 21-hidroksilazdır (21-OH) ve aktivite eksikliği, 21-hidroksilaz genindeki (CYP21) mutasyonlara bağlıdır (1,2).

KAH, ilk olarak, 19. yüzyıl ortasında İtalyan patoloğu Luigi De Crecchio tarafından tanımlanmış, ancak 20. yüzyılın ortalarına kadar genetik özelliklerin çekinik olması ve hormonal anormalliklerin tanımlanmasıyla bu hastalık iyice anlaşılmaya başlamıştır (3).

Dünya çapında farklı popülasyonlarda toplam 6,5 milyon yenidoğan tarama verilerinin analizi, 21-OHE'nin klasik formu için 1: 15.000 canlı doğum insidansını göstermiştir (4). En çok izlendiği topluluk ise Alaskalı Yupik Eskimoları olup buradaki sıklık 300 canlı doğumda 1'e ulaşmaktadır (5). KAH'ın klasik tipi Akdeniz ülkelerinde her canlı doğum için ortalama 1/10.866 sıklıkta görülmektedir. Klasik olmayan KAH hastalarının prevalansı genel popülasyonda yaklaşık 1/1.000'dir, ancak Eskenazi Yahudileri ve İspanyollar gibi belirli etnik gruplarda daha sık görülmektedir (6).

KAH hastalığında 21-hidroksilaz eksikliğinden kaynaklanan temel kusur kortizolün yeterince sentezlenememesidir. Hem kortizol, hem de aldosteron sentezi için 21-hidroksilasyon gerektiğinden, hastalığın daha ağır tuz kaybettiren formunda her iki hormon da eksiktir. Kortizol ve aldosteron eksikliği belirtileri ve bulguları progresif kilo kaybı, iştahsızlık, kusma, dehidratasyon, halsizlik, hipotansiyon, hiponatremi ve hiperkalemidir. Bu sorunlar etkilenen bebeklerde yaklaşık postnatal 10-14. günler arasında gelişir. Tedavi olmadıkları takdirde, gün veya hafta içinde şok, kardiyak arrest ve ölüm ortaya çıkabilir (2).

Kortizol sentezinin azalması, hipofizer adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve hipotalamik kortikotropin salgılatıcı hormonu (CRH) yükselterek adrenal korteks hiperplazisine ve normalden yüzlerce kat yüksek olabilen steroid öncül düzeylerine neden olabilir. 21-hidroksilaz eksikliği durumunda, bu prekürsörler 17-

hidroksiprogesteron (17-OHP) ve progesterondur. Progesteron ve diğer metabolitleri mineralokortikoid reseptörlerinin antagonisti olarak etki eder ve bu nedenle tedavi edilmemiş hastalarda aldosteron eksikliği bulgularının şiddetini artırabilir (2).

KAH fenotipi, 21-hidroksilaz aktivitesinin ne kadar bozulduğuna bağlı olarak geniş ölçüde değişir. Hastalık klasik ve non-klasik olarak sınıflandırılır. Klasik tip aldosteron eksikliğinin derecesine göre tuz kaybı ve basit virilizan tip olarak ikiye ayrılır (Tablo 1).

Yirmi bir hidroksilaz eksikliğinde adrenal bezlerde 21-hidroksilasyona ihtiyaç duymayan seks hormonu öncülleri aşırı üretilir. Bu hormonlar testosteron ve dihidrotestosterona, daha az miktarda estron ve estradiole metabolize olur. Androjen artışı kızların prenatal virilizasyonu ve her iki cinsiyette hızlı somatik büyüme ile sonuçlanır. Hastaların yaklaşık 3/4'ü sodyum dengesini korumak için yeterli aldosteron sentez edemez ve "tuz kaybeden tip" olarak tanımlanırlar. Bu hastalarda yaşamı tehdit eden hiponatremik dehidratasyon gelişmesine yatkınlık olmaktadır. Yeterli aldosteron üretimi olan ve hiç tuz kaybı olmayan hastalarda prenatal virilizasyon ve 21-hidroksilaz hormonal öncülerinde (örneğin 17-OHP) belirgin artış olur ve "basit virilizan tip"(hastaların %25) adlandırılır. Non-klasik hastalığa sahip olanlarda ise nispeten hafif androjen yüksekliği vardır ve postnatal olarak androjen fazlalığı bulguları olabilmektedir.

Klasik formun her iki tipinde de doğumda dişi psödohermafrodit bulguları gözlenirken non-klasik formda klinik bulgular genellikle ergenlik ve sonrasında ortaya çıkar ve hirsutizm, adet düzensizliği ve infertiliteye neden olur (2).

Tablo 1: Klasik ve non-klasik 21-OHE KAH-de klinik özellikler (Nimkarn S.ve Gangishetti P.K 2016'dan alınmıştır).

Özellikler	Klasik tip	Non-klasik tip
Prenatal virilizasyon	Sadece kızlarda	Yok
Postnatal virilizasyon	Kızlar ve erkeklerde	Değişken
Tuz kaybı	Hastaların %75-inde	Yok
Kortizol eksikliği	% 100	Nadiren

2.2. Konjenital adrenal hiperplazide androjen fazlalığı

Androjen öncüllerinin aşırı sekresyonu erkek fetusda cinsel farklılaşmayı önemli ölçüde etkilemez. Dişi fetusda ise, eksternal genital bölgeler maskülinize olabilir. Ürogenital sinüs septasyon sürecindeyken fetal adrenal bezlerde fazla androjen üretimi başlar ve bu vajinal ve üretral kanalların ayrı oluşumunu önler, klitorisin büyümesi ve kısmi veya tam labial füzyon ile kendini gösterir. Vajinanın üretra ile ortak açıklığı gelişebilir (ürogenital sinüs). Klitoris penise benzeyecek şekilde büyür ve üretra bu organın altına açıldığından, etkilenen bazı dişiler yanlışlıkla hipospadias ve kriptorşidizmi olan erkeklerle karıştırılabilir. İç genital organlar ise normaldir. Etkilenen dişilerin overleri normal olduğundan ve antimüllerian hormone (AMH) sekresyonu olmadığından iç genital organlar normaldir. Ancak ciddi etkilenen dişilerde tipik erkek iç genital yapıların geliştiği, bir kadın hastadada prostat doku karsinomu bildirilmiştir (7).

Virilizasyonun derecesi Prader tarafından geliştirilen 5 ölçekli skala ile tanımlanır (8). Tüm klasik KAH dişilerinde aynı derecede kuşkulu genitalya gelişmez. Bazı tahminler androjen fazlalığının fiziksel belirtilerinin sadece androjen prekürsörlerinin aşırı miktarda olmasına bağlı değil, aynı zamanda bazı hormonların periferik enzimler tarafından daha etkin maddelere dönüşmesine bağlı olduğunu göstermektedir (9). Ayrıca, androjen reseptörlerinin konsantrasyonu ve transkripsiyonel aktivitesi genital fenotipi belirlemede önemli olduğu bildirilmiştir (10,11).

Prenatal dönemde aşırı androjene maruz kalmanın bir başka öngörülen etkisi hem erkek hem de dişi bebeklerin boylarının doğumda ortalamadan daha uzun olmasıdır (12).

Androjen fazlalığı postnatal dönemde de tedavi edilmemiş veya yetersiz tedavi edilmiş hastalarda farklı problemlere neden olabilir. Erkeklerde hızlı somatik büyüme ve hızlanmış kemik matürasyonu görülür (13). Etkilenen çocukların çocukluk dönemlerinde boyları uzun iken, epifizlerin erken kapanması nedeniyle büyümeleri erken durur ve erişkin dönemde boyları kısa kalır. Kas gelişimi aşırı olabilir. Pubik ve aksiller kıllanma, akne, ses kalınlaşması ve apokrin vücut kokusu gelişir. Etkilenen erkek çocuklarda penis, skrotum ve prostat büyümesi olabilir, ancak orantısız olarak testisler genellikle prepubertal boyutta kalır. Kızlar benzer şekilde adolesan dönemde

klitor büyümesi gibi aşırı androjen bulguları gösterebilir. Kız hastalarda akne, hirsutizm ve over disfonksiyonu gelişebilir (2).

2.3. Pubertal gelişim.

Uygun glukokortikoid tedavisi ve aşırı adrenal androjen üretiminin baskılanmasıyla erkek ve kız KAH hastalarda, puberte gelişimi genellikle uygun kronolojik yaşta başlar. Yetersiz tedavi gören kızlarda ortalama menarş yaşı sağlıklı akranlarıyla karşılaştırıldığında geç başladığı bildirilmiştir (14). Ancak kadınların az bir kısmında menarş başlamaz ve 17-OHP yeterince baskılandığında bile progesteron düzeyi baskılanamaz (15). KAH tanılı kadınlarda meme gelişimi de baskılanır. Bu sorunlar androjen fazlalığı ve kortizol eksikliğinin kombine etkileri olup, tedavi ile düzeltilebilir (16, 17).

2.4. Fertilité

Yeterli tedavi edilen kadınlarda, menarş sonrası adet düzeni normaldir ve hamilelik mümkündür (18). Ancak, genel doğurganlık oranlarının düşük olduğu bildirilmiştir (19). Over disfonksiyonuna neden olan yüksek androjen düzeyi, kronik anovulasyon, yüksek progestin düzeyleri, anormal endometriyal implantasyon ve psikoseksüel davranışlar en sık görülen nedenler arasında yer almaktadır (20).

Erkeklerde, subfertilite nedeni, anormal adrenal dokudan kaynaklandığı düşünülen testis adrenal rest tümörleridir. Ayrıca, aşırı adrenal androjenler ve aromatisasyon ürünleri hipofiz tarafından luteinize edici hormone (LH) salgılanmasını baskılayarak hipogonadotropik hipogonadizme neden olabilir (21).

2.5. Adrenal medulla.

Klasik 21-OHE olan hastalarda kortizol eksikliği aynı zamanda adrenal medullanın gelişimini ve fonksiyonlarını etkileyerek, etkilenmemiş bireylere göre daha düşük epinefrin ve metanefrin konsantrasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (22).

2.6. Konjenital adrenal hiperplazide tuz kaybı

Klasik KAH hastaların yaklaşık 3/4'ü progesteronun 21-hidroksilasyonu bozulduğundan yeterli aldosteron sentezleyemez. Aldosteron sodyum homeostazında

önemli olup, eksikliğinde böbreklerden, barsaklardan ve ter bezlerinden Na kaybı gelişir (23). Ağır etkilenmiş hastalarda eşlik eden kortizol eksikliği aldosteron eksikliği bulgularını daha da ağırlaştırır. Glukokortikoidler kardiyak outputu, kontraktilitesini, kalp ve damarların katekolamin ve diğer pressor hormonların etkisine duyarlılığını ve iskelet kaslarının çalışma kapasitesini artırır (24). 21-hidroksilaz eksikliğinde hem kortizol, hem de aldosteron sentezi etkilendiğinden şok ve hiponatremi sadece aldosteron sentaz eksikliği ile kıyaslandığında daha sık görülür (25).

Konjenital adrenal hiperplazide katekolamin sentezi azaldığı bilinmektedir. 21-hidroksilaz eksikliği olan farelerde anormal adrenal medulla gelişimi ve azalmış katekolamin sentezi gösterilmiştir (26). Katekolamin eksikliği glukokortikoid ve mineralokortikoid eksikliğine bağlı gelişen şokun daha da ağır seyretmesine neden olur.

Tuz kaybı sendromu olan yenidoğan bebeklerde beslenme güçlüğü, kilo kaybı, gelişme geriliği, kusma, dehidratasyon ve hipotansiyon gibi non-spesifik bulgular gelişir. Hiponatremi, hiperkalemi ve hiperreninemi adrenal krize (azotemi, vaskular kollaps, şok ve ölüm) neden olur. Adrenal kriz, yaşamın ilk 4 haftasında ortaya çıkar ve erkek çocuklar daha risklidirler. Çünkü yenidoğan muayenesinde erkek bebeklerde dış genital yapı normal olduğundan tuz kaybı bulguları gözden kaçabilir. Kız çocuklarda ise kuşkulu dış genital yapı nedeniyle daha erken tanı konulabilir (27).

Kardeşler olsun ya da olmasın aynı mutasyonu taşıyan kişilerde tuz kaybı farklı derecelerde görülmüştür (28, 29). Bu gözlemlerle ilgili açıklamalar henüz tam belli olmasa da tuz kaybında hem genetik hem de genetik olmayan faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir. İn-vivo yapılan metabolik çalışmalarda ekstra-adrenal 21 hidroksilaz enzimi saptanmıştır (30). 21-hidroksilaz aktivitesi olan farklı enzimler tavşan karaciğerinde tespit edilmiş, ancak insanda tanımlanmamıştır (31).

2.7. Non-klasik 21-hidroksilaz Eksikliği

Non-klasik 21-hidroksilaz Eksikliği klasik formdan daha sık görülmektedir. Her yaşta izlenebilir ama, genellikle ileri yaşta ortaya çıkar ve hafif seyreder. Erken puberte ve kemik yaşı artışı gibi değişik hiperandrojenizm bulguları verebilir (2).

Non-klasik 21-OHE kız hastalarda kuşkulu genitalya gelişmez. Akne, adet düzensizliği, sekonder amenore, oligoamenore ve hirsutizm gibi klinik bulgular

verebilir. Non-klasik tip tanılı kadınların %60'ında hirsutizm, %54'ünde oligomenore ve %33'ünde akne görüldüğü bildirilmiştir (32). Non-klasik 21-OHE olan birçok kadında polikistik over sendromu gelişebilir. Hiperandrojenizmi olan kadınların %2,2-%10'unda non-klasik 21-OHE tespit edilmiştir (32,33,34). Tedavi edilmeyen kadınlar hastalarda doğurganlık oranı %50 olarak bildirilmiştir (35).

Non-klasik 21-OHE olan erkek hastalar hakkında çok az yayın vardır. Erkeklerde androjen artışı bulguları erken puberte, boy kısalığı ve fertilitede azalma şeklinde olabilir (36). Bu hastaların bir grubu tamamen asemptomatiktir ve ancak farklı nedenlerden dolayı incelendiklerinde tanı alırlar (2,6).

2.8. Konjenital adrenal hiperplazide nörofizyoloji

Beynin prenatal dönemde yüksek düzeyde androjene maruz kalması, etkilenen kızlarda ileri dönemde dimorfik cinsel davranışlara neden olabilir (37-39). Kızlar araba veya kamyonet gibi erkek oyuncakları ile ilgilenebilir ve sıklıkla da oyuncak bebeklere ilgileri azalmıştır (40-43). Etkilenen kızlarda eşcinsellik sıklığı artmıştır, ancak çoğu heteroseksüeldir (2). Tuz kaybeden tip KAH hastalarında hiponatermik dehidratasyon ve şok kalıcı beyin hasarına neden olabilmektedir (44-46). Korku ve saldırganlığı kontrol eden androjen duyarlı beyin merkezi olan amigdala, KAH'lı çocuklarda MRG ile daha küçük olduğu görülmüştür (47).

2.9. Konjenital adrenal hiperplazide malignite

KAH hastalarında adrenal kitle görülme insidansı genel popülasyona göre daha yüksek saptanmıştır. Histolojik olarak adenom, myelolipom ve hemanjiyom tipleri daha sık görülür (49-51). Steroid duyarlı hiperplastik adrenal nodüller daha önce tanı almamış hastalarda hayatın ileri döneminde saptanabilir ve virilize adrenal adenomlarla karıştırılmamalıdır (49,52,53). Nadiren de olsa KAH hastalarında virilize adrenal karsinom görülmüştür (54,55). KAH tanılı çocuklarda görülen adrenal kitlelerin çoğu iyi huyludur (56). Sıklıkla yetersiz tedavi alan hastalarda görülmesine rağmen, 21-hidroksilaz ekiskliğinin tuz kaybı formunda düzgün tedaviye rağmen de erkeklerde spermatogenez yetersizliği ile giden testiküler adrenal rest tümörü görülebilir (57,58,59). Bu tümörler genellikle iyi huylu olmasına rağmen, biyopsi ve bazen deorşiektomi gerektirir (60).

2.10. Yirmi bir hidroksilaz eksikliği tanısı

21-hidroksilaz eksikliği tanısı aşağıdaki laboratuvar bulgulara göre konulmaktadır:

-Yüksek serum 17-OHP düzeyi (Tablo2).

-Yüksek adrenal androjen düzeyi: Δ^4 -androstenedion, dehidroepiandrosteron (DHEA).

- Tuz kaybı olan 21-OHE KAH hastalarında yüksek plazma renin aktivitesi (PRA).

Tanı açısından şüpheli olgularda ACTH uyarı testi (250 μ g cosinotropin) yardımcı olabilir. Tanıyı desteklemek için genetik çalışma yararlı olabilir.

Non-klasik olgularda rastgele alınan kandaki 17-OHP düzeyleri normal olabilir. Bu durumda altın standart ACTH uyarı testidir. Bolus tarzında 250 μ g cosinotropin öncesi ve 1saat sonrasında 17-OHP düzeyi ölçülür. 17-OHP düzeyi 30 nmol/Lüzerine çıkarsa tanı kesinleştirilir. Taşıyıcı olgularda hafif yükselme(30 nmol/L'dendaha düşük) izlenebilir (5).

Tablo 2: 17-hidroksiprogesteron düzeyine dayalı 21-hidroksilaz eksikliği tanısı (Speicer ve ark. 2010).

	Klasik form	Non-klasik form	Sağlıklı
Basal 17-OHP düzeyi	>10,000 ng/dL veya 300 nmol/L	200-10,000 ng/dL veya 6-300 nmol/L	<200 ng/dLveya 6 nmol/L
ACTH stimülasyon sonrası 17-OHP düzeyi	>10,000 ng/dL veya 300 nmol/L	1,000-10,000 ng/dL veya 31-300 nmol/L	<1,000 ng/dL veya 50 nmol/L

2.11. Kuşku genitaliyanın değerlendirilmesi.

Fizik muayende üretral meatus değerlendirilmeli ve inguinal kanal, labialar ve skrotum dikkatli palpe edilmelidir. Fallus ve klitoris uzunluğu, üretral açıklığın yeri, labioskrotal füzyon, gonad palpasyonu ve perine muayinesi yapılmalıdır. Uterusun varlığını ya da yokluğunu göstermek için ultrason yararlı tekniktir ve gonadların yerini

lokalize edebilir. Bebeğin genetik cinsiyetini belirlemede hızlı bir karyotip analizi kullanılabilir. Dişi psödohermafroditizmde, ürogenital sinüse kontrast madde verilerek vajina ve uterus görüntülenir ve bu metod cerrahi tedavinin planlanması için gereklidir (2).

Standart tanı testi olarak bazal 17-OHP bakılmalıdır ancak kosinotropin (sentetik ACTH) stimülasyon öncesi ve sonrası adrenokortikal hormon profili bakılması daha üstündür. Bu değerlendirme hayatın ilk 24 saat sonrasına ertelenebilir. Tuz kaybettiren tip 21-hidroksilaz eksikliği kız psödohermafroditizmin en sık görülen nedenidir. Test tamamlandıktan sonra olabilecek adrenal kriz açısından hasta monitorize edilmelidir. Hayatın ilk 7 gününde tuz kaybı krizi nadiren rastgelinir, ancak birçok klinisyenler KAH'lı yenidoğanlarda ilk 7 günde hiponatremi ve hiperkalemi saptamışlar. PRA ve aldosteron sağlam yenidoğanlarda da ilk haftada yüksek olabileceğinden değerlendirilmesi uygun değildir (2).

İnisial testlerin sonucuna göre ileri düzey testler planlanmalıdır. Neonotolog, endokrinolog, urolog ve tecrübeli sosyal çalışan ve/ya çocuk psikiyatristi erken tanı verilerini değerlendirerek aileye cinsiyet yetiştirilmesi ve tıbbi ve cerrahi tedavi ile ilgili tavsiyede bulunmalıdır (2).

2.12. Yenidoğan taraması

Etkilenen erkeklerde 21-hidroksilaz eksikliği sıklıkla ağır adrenal yetersizlik gelişene kadar tanınmadığından, bu hastalık çoğu Amerikan eyaletinde ve birçok ülkede yenidoğan tarama programına alınmıştır. Böylelikle hem erkek ve kız bebeklerin ölümleri engellenmekte hem de erken tıbbi/cerrahi müdahale ile problemler, büyümeden düzeltilebilmektedir. Bu programlarda, topuktan alınan ve filtreli kağıt kartlara absorbe edilen kuru kanda 17-hidroksiprogesteron düzeyi analiz edilir. Potansiyel olarak etkilenen bebekler yaklaşık olarak 2 haftalıkken tetkikler (elektrolitler ve 17-OHP) için yeniden çağırılır. Tuz kaybettiren hastalığı olan bebeklerde bu dönemde sıklıkla elektrolit bozukluğu gelişmiştir, ancak genellikle hastanın çok ağır bir kliniği yoktur. Tarama programı non-klasik formunu saptamada güvenilir değildir, ancak bu tipte adrenal yetersizlik gelişmediğinden klinik olarak önemi azdır (61).

Avrupa ve Amerika Çocuk Endokrinoloji Toplulukları da Yenidoğan KAH Taraması yapılmasını önermektedirler. Akraba evliliklerinin sık olduğu Türkiyede de Yenidoğan KAH Taraması başlatılmıştır (62).

2.13. Moleküler genetik

Steroid 21-Hidroksilaz, CYP21 geni tarafından kodlanan bir mikrozomal sitokrom p450 enzimidir. CYP21enzimi 494 aminoasit rezidüsü içerir, moleküler kütlesi 52 kDa'dır ve endoplazmik retikulumda lokalize olur (63). 21-hidroksilaz enzimini kodlayan genin iki ayrı formu bulunmaktadır. Bunlar aktif gen CYP21 (CYP21A2 veya CYP21B) ve psödogen CYP21P (CYP21A1P, CYP21A)'dir.

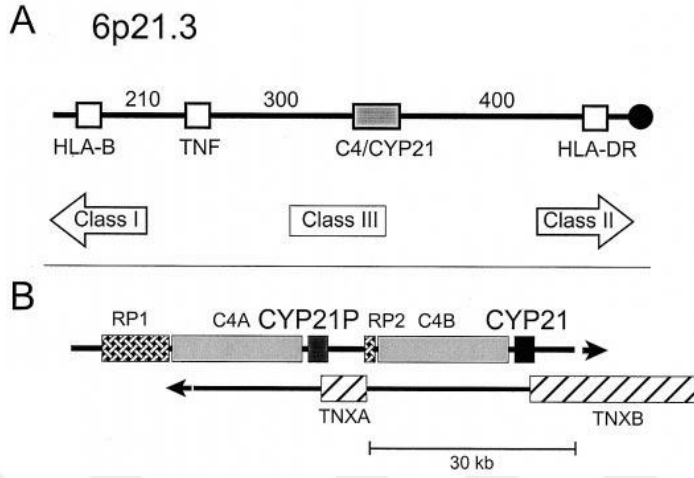
CYP21 geni 10 ekzon ve 9 introndan oluşan 3kb'lik bir gendir ve 6p21.3'de lokalizedir (63). CYP21 geni ve onun inaktif homologu olan CYP21P psödogeni HLA major histokompatibilite kompleksinin (MHC) grup III bölgesinde, kompleman sisteminin 4. komponentini kodlayan C4B ve C4A genlerinin hemen yanında, HLA-B ve HLA-DR arasında yer almaktadır (Şekil 1.) (64, 65). Aktif gen ile psödogen, ekzonlar açısından % 98, intron açısından % 96 oranında homoloji gösterir (66,67).

CYP21P psödogeni, içerdiği 15 farklı mutasyondan dolayı inaktif durumdadır (67). CYP21P'in tamamen kayıp olduğu ailelerde yapılan çalışmalar bu genin tümüyle fonksiyonsuz olduğunu kanıtlamıştır. CYP21 ve CYP21P'in yüksek dizi homolojisine sahip olması ve yaklaşık 30 kb'lık bir mesafede yerleşmelerinin sonucu olarak mayozda kromatidlerin yanlış eşleşmeleri ve "Unequal Crossing-over" olayları yaşanabilmektedir. Bunun sonucu olarak ya C4B ve CYP21 geninde delesyon ya da psödogende doğal olarak bulunan mutasyonların aktif gene aktarılması, yani konversiyon meydana gelebilmektedir (68,69,70).

CYP21 geni insandaki polimorfik genlerden birisidir ve 5 normal varyantı mevcuttur: insL9, K102R, D183E, S268T ve N493S (5).

21-Hidroksilaz eksikliği otozomal çekinik şekilde geçen bir monogenik hastalık olduğundan ve HLA kompleksi ile sıkı bağlantı içinde olduğundan 21-OHE olan kardeşler neredeyse her zaman aynı HLA yapısına sahiptirler (71,72). Tuz kaybettiren tip hastalık ile HLA-A3, HLA-Bw47 ve HLA -DR7 birlikteliği; non-klasik tip hastalık ile HLA-B14, HLA-DR1 birlikteliği saptanmıştır. HLA-A1, HLA-B8 ve HLA-DR3' de,

21-OHE ile negatif ilişkisi olan haplotiplerdir. CY21A2 geni klonlanmadan önce HLA göstergeleri 21 OHE prenatal tanısında önemli bir araçtı (2).



Şekil 1: CYP21A geni lokalizasyonu ve genetik haritası.

A, CYP21 geni, HLA majör histokomplite kompleksinde, kromosom 6p21.3’de yerleşimi. Bu bölgede yerleşen diğer genler gösterilmiş. Çizginin sağ ucundaki daire sentromerin yönünü gösteriyor. Rakamlar: genler arasındaki mesafe, kilobaz (kb). HLA-B transplantasyon antijeni kodlayan gen olup, Class I’de, HLA-DR ise CLASS II’de yerleşmektedir. Bu gen class’ları arasındaki bölge Class III adlandırılmaktadır. *TNF*, tümör nekroz faktör. C4/CYP21 bölgesi panel B’de gösterilmiştir. B, 21-hidroksilaz (CYP21) geni bölgesinin genetik haritası. Oklar, tasnkripsiyon yönünü işaret ediyor. *CYP21P*, 21-hidroksilaz psödogeni. *C4A* ve *C4B*, serum komplementinin 4. Komponentini kodlayan genlerdir. *RP1*, fonksiyonu belirlenemeyen nükleer protein kodlamaktadır. *RP2*, *RP1* geninin kesilmiş kopyasıdır. *TNXB*, tenaskin-X gen. *TNXA*, bu genin kopyası. 30-kb’lık mesafe, duplikasyona katılan bölgeyi gösteriyor.

2.14. 21-Hidroksilaz eksikliğine yol açan mutasyonlar

Konjenital adrenal hiperplaziye neden olan 100’den fazla mutasyon bulunmaktadır. C4B’nin ve CYP21A2’in delesyonları (%20), CYP21A1P’deki zararlı mutasyonları CYP21A2’ye transfer eden büyük gen konversiyonları (%3-15), duplikasyon (%2-9), noktamutasyonları (%38-86) görülmektedir (2).

Hastaların %1’inde spontan mutasyon saptanmaktadır (5). Hastaların büyük kısmı “compound” heterozigottur (1).

Moleküler çalışmalarda hasta ve taşıyıcı bireylerin %90-95’inde en sık 9 mutasyon ve gen delesyonu saptanmıştır. Bu mutasyonlar tam ya da parsiyel 21OH eksikliğine neden olmaktadır. *In vitro* çalışmalara dayanarak CYP21’deki mutasyonlar

enzimatik aktivitenin seviyesine göre sınıflandırılmıştır (2, 73). CYP21 geninde sık görülen mutasyonlar Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3: CYP21A geninde sık görülen mutasyonlar.

Enzim aktivitesi	Fenotip	CYP21A2 patojenik varyantları
%0	Ağır (Klasik)	Büyük gen delesyonu Büyük gen konversiyonu 8bp. delesyon E6 küme mutasyonu (ILE236ASN, VAL237GLU, MET239LYS) Q318X R366W
%<1		cIVS2 AS, A/C-G,-13)
% 1-% 2		I172N
~%20-%50	Hafif (non-klasik)	P30L V281L P453S

Geniş delesyon ve geniş konversiyon.

CYP21 geni ve C4B-i kapsayan büyük delesyonlar, bir çok popülasyonda klasik 21OHE vakalarının %20’de saptanmaktadır, ancak Latin Amerika ülkelerinde daha az görülmüştür. Homozigot delesyon genotipi tuz kaybına neden olmaktadır (2).

TNXB genini de kapsayan büyük delesyona sahip hastalar gösterilmiştir ve 21-hidroksilaz eksikliği ve Ehlor-Danlos sendromunu kapsayan kontagiyoz gen sendromu saptanmıştır (74).

Geniş konversiyonlar klasik 21-hidroksilaz eksikliği hastaların allellerinin %10'unu kapsar. Konversiyon sonucu psödogenden aktif gene aktarılan mutasyonlar enzim aktivitesini bozmaktadır (2).

İntron 2'de A veya C→G (IVS2AS, A/C-G,-13)

Intron 2'de sondan 13 baz önceki nükleotid normalde Adenin ya da Sitozin'dir. Bu Adenin ya da Sitozin'in Guanin'e dönüşümü klasik 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH'de en sık görülen alleldir (2). DNA nükleotid dizimine göre c.293-13A> G veya c.293-13C> G şeklinde ifade edilmektedir (5). Bu değişim intronun erken bağlanmasına ve translasyonel okuma çerçevesinde kaymaya neden olur. Her ne kadar bu patojenik varyantlardan biri için homozigot olan çoğu birey (>% 90) tuz kaybı sendromu olsa da, tuz kaybının şiddetinde farklılık gözlenmektedir. Bu genotip-fenotip varyasyonu, artmış alternatif "splicing" sonucu normal kırılma olmadığından, değişken aktiviteye sahip, ancak yine de yapılabilen bazı protein üretimi ile açıklanabilir (67). Bu mutasyon hem tuz kaybı, hem de virilizan tip hastalarda saptanmıştır (75,76). White ve ark. (77) bu mutasyonu tuz kaybı vakalarının %22'sinde, basit virilizan vakalarının %25'inde ve non-klasik vakalarının %12'sinde saptamıştır.

ILE172ASN

Ekzon 4'de bulunan çerçeve kayması mutasyonudur. Bu mutasyon normalde CYP21A psödogende bulunmaktadır. CYP21 genine gen konversiyonuyla transfer olabilmektedir. İzolösin bölgelerinin I172N mutasyonu sonucu etkilenmesi enzimin endoplazmatik retikulum ile ilişkisini zayıflatarak, enzimin uygun olmayan bir şekilde yerleşmesine neden olabileceği tartışılmıştır (2). Wedell ve ark.(78) bu mutasyonu ILE173ASN olarak refere etmiştir. Bu mutasyon %2 enzim aktivitesine sahip olup, tuz kaybına neden olmadığı gösterilmiştir (79).

New ve arkadaşları (80) ise p.Ile173Asn ve ağır patojenik varyanta sahip bileşik heterozigot olan etkilenmiş bireyler arasında, %76'sı basit virilize edici fenotipe sahipken, %23'ü tuzkaybettiren fenotipine sahip olduğunu göstermiştir. Transkripsiyon regülasyonunda veya proteini translasyonunda olan negatif değişikliklerin 21-OH enzim aktivitesinin azalmasına neden olabileceği öne sürülmüştür.

I172N patojenik varyantı ve ağır varyantı olan hastaların çok küçük bir yüzdesinde ise non-klasik fenotip (beklenen klasik fenotip yerine) saptanmıştır (81).

VAL281LEU

Exon 7'de yerleşen bu mutasyon enzimin endoplazmatik retikulum ile ilişkisini zayıflatarak kalan enzim aktivitesini %20-50 oranına düşmesine neden olmaktadır. Ezquite ve ark. (82) İspanyol popülasyonunda yaptığı çalışmada non-klasik KAH hastalarında (38 hastanın 15'inde) en sık saptanan mutasyon V281L (%34) olmuştur. White ve ark. (77) yaptığı çalışmada da non-klasik tip KAH vakalarının %34'de V281L mutasyonu saptamıştır.

Pro30LEU

Ekson 1'de yerleşmektedir. Kültüre edilmiş hücrelerde %30-60 oranında normal aktiviteye neden olan bir mutasyon olsa da enzimin değişken olabileceğine dair kanıtlar gösterilmiştir. Non-klasik KAH hastalarının yaklaşık %15'inde bulunmaktadır (2). Val281Leu veya Pro30LEU mutasyonu taşıyan bileşik heterozigot bireylerin küçük bir kısmında (%3) non-klasik tip fenotip beklendiği halde klasik fenotip saptanmıştır (5).

8-BP DEL

White ve ark. (83) CYP21Pgeninde, ekson 3'de 707-714 nükleotidlerinde 8bp delesyonunu göstermiştir. Bu delesyon "frameshift" yoluyla protein sentezini durdurarak tuz kaybı tipine neden olduğu bildirilmiştir.

GLN318TER (Q318X)

Bu mutasyon ekzon 8'de 318. pozisyonda prematür terminasyona neden olan nonsense mutasyondur. Mutant enzimin kalan aktivitesinin %0 olduğu gösterilmiştir. Tuz kaybettiren tip ile ilişkilidir (2).

ILE236ASN, VAL237GLU, MET239LYS. E6 küme mutasyonları

Ekson 6'da bu 3 mutasyonun toplandığı bölgedeki G heliksinin etkilenmesi, enzim aktivitesinin tamamen kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Tuz kaybettiren tiplerle ilişkilendirilmiştir (84).

ARG356TRP (R356W)

Ekzon 8'deki bu mutasyon enzim aktivitesini tamamen yok etmektedir. Tuz kaybettiren tiplerle ilişkilidir (2).

PRO453SER

Overbach ve ark. (85) yaptığı çalışmada 13 Non-klasik KAH vakasında CYP21 gen strukturunu analiz ederken ekson 10'da pro453ser (P453S) mutasyonunu saptamıştır. P453S mutasyonu non-klasik KAH vakalarının %46,2'sinde saptanmıştır. Diğer non-klasik tip mutasyonlardan farklı olarak, P453S mutasyonu psödogende bulunmamıştır.

Mutasyonların patofizyolojisi

Çekinik kalıtmımlı hastalıklarda, iki allelde olan mutasyonlardan daha az ağır olanı fenotipi belirlemektedir. 21-OHE'ne neden olan alleller, rezidüel enzim aktivitesine bağlı olarak ağır veya hafif olarak gruplandırılmıştır (Tablo 3).

- Tuz kaybı olan 21-OHE KAH olgularında genellikle en ağır patojenik varyantlar saptanmıştır (örn. Homozigot delesyonlar).
- Non-klasik 21-OHE KAH olgularında, genellikle bir ya da her iki allel hafif etkilenmiştir.
- Farklı tipteki mutasyonlar için heterozigot olgularda ise, hastalık ekspresyonunun şiddeti büyük oranda iki alelden daha hafif etkilenenin aktivitesi tarafından belirlenir.

2.15. Genetik testler

CYP21A2 geninde sık görülen nokta mutasyon ve gen delesyonlarını hedefleyen analizler etkilenmiş olguların %80-98'inde hastalığa neden allelleri saptayabilir. Kullanılan yöntem ve tetkik edilen populasyona göre bu oran değişmektedir. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tüm gen sekanslama nadir görülen mutasyonları, çoklu ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) testi ise büyük gen delesyonları ve konversiyonları saptayabilir. En sık görülen mutasyonları saptamak için

minisekanslama tekniği geliştirilmiş ve bir çok klinikte kullanıldığı belirtilmektedir (73).

2.16. Test sonuçlarının yorumlanması

Büyük gen konversiyonları birden fazla mutasyona sahip sekansı psdogenden aktif gene transfer edebilir. Bu durumda, sık görülen mutasyonları hedefleyen analizlerde multipl mutasyonlar saptanır. Bu metod mutasyonların bir allelde mi, yoksa iki allelde mi yerleştiğini gösteremez. Mutasyonların *cis* konfigürasyon veya *trans* konfigürasyonda olduğunu göstermek için her iki ebeveynin genetik analizi yapılmalıdır.

Yanlış yorumlamanın başka bir nedeni ise CYP21A2 gen duplikasyonudur. Hem fonksiyonel gen, hem de aynı kromozomda mutasyona sahip kopya taşıyan bireyler yanlışlıkla taşıyıcı sanılabirler (73).

2.17. Genotip-fenotip korelasyonu

Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu 21 hidroksilaz yetersizliğinde genotip ve fenotip ilişkisinin olduğunu göstermektedir (79,87,88). Ancak 21 hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH vakalarında genotip ve fenotip ilişkisinin kesin olmadığı da bildirilmiştir (80,81).

Speiser ve ark. (79) 21-hidroksilaz yetersizliğine bağlı KAH tanılı 88 ailede genotip ve fenotip karşılaştırması yapmıştır. Analiz edilen kromozomların %95'inde mutasyon saptanmıştır. En sık görülen mutasyonlar IVS2AG (%26), büyük delesyon (%21), Ile172asn (%16) ve val281leu (%11) olduğu bildirilmiştir. Vakalar tahmin edilen enzim aktivitesine göre gruplandırılmış, ancak her grupta beklenenden daha ağır yada daha hafif fenotipe sahip hastalar saptanmıştır. Fenotip-genotip uyumsuzluğunun CYP21 geninin allelik varyasyonlarından kaynaklandığı bildirilmiştir.

Jaaskelainen ve arkadaşları (89) gen mutasyonlarının hasta kliniği ile uyumlu olduğunu, ancak I172N mutasyonunun ise geniş fenotipik varyasyonları neden olduğunu bildirmiştir.

Krone ve arkadaşları (90) yaptığı çalışmada akraba olmayan 155 KAH tanılı hastada genotip-fenotip ilişkisini ve CYP21 mutasyonlarının sıklığını araştırmıştır. 310 allelden 306'sında (%99) mutasyon saptanmış ve en sık görülen mutasyonların IVS2AG (%30), büyük delesyon (%20), I172N (%20) ve büyük gen konverisyonu (%7) olduğu bildirilmiştir. 5 yeni nokta mutasyon göstermiştir (90). Genotipler tahmin edilen enzim aktivitesine göre 4 grupta (0, A, B, C) kategorize ederek, her grubun pozitif prediktif değeri hesaplanmıştır. En ağır ve en hafif mutasyon olan gruplarda fenotip-genotip uyumunun iyi olduğu, orta ağır mutasyon olan gruplarda ise fenotip-genotip uyumsuzluğunun daha fazla olduğu belirtilmiştir (90).

Pinto ve arkadaşları (91) 21-OHE'ne bağlı KAH tanılı 68 hastanın klinik, hormonal ve genetik incelemesini yaparak genotip-fenotip korelasyonunu araştırmıştır. Mutasyon şiddetine göre vakalar gruplandırılmış: grup 0, enzim aktivitesini tamamen yok eden mutasyon sahip genotip (%17.6); grup A, homozigot IVS2 mutasyonu olan ve bir allelde IVS2, diğer allelde 0 grup mutasyonu taşıyan bileşik heterozigot genotip (%33.8); grup B, I172N mutasyonuna sahip homozigot ve bir allelde I172N, diğer allelde grup 0 veya grup A mutasyonuna sahip bileşik heterozigot genotipler (%14.7); grup C, V281L veya p30L mutasyonuna sahip homozigot veya bileşik heterozigot genotipler (%26.5) ve grup D, enzim aktivitesi belli olmayan mutasyonlar (%7.4). Grup 0 ve A'da tüm vakalar tuz kaybı sendromu, grup C ise non-klasik tip KAH olduğu gösterilmiştir. B grubu hastalardan 5'i tuz kaybı sendromu, 5'i ise basit virilizan tip olduğu saptanmıştır. Grup 0 ve A'nın tanı yaşının daha erken olduğu, ve grup B ile karşılaştırıldığında daha ağır virilize olduğu gösterilmiştir. Grup 0, A ve B'ye uygulanan hidrokortizon dozunun aynı olduğu, grup C'de ise düşük olduğu gösterilmiştir. Hem klasik, hem de non-klasik tip hastalarda final boyun hedef boydan az olduğu saptanmıştır. Genetik defekt ile klinik-laboratuvar bulguların iyi korrele olduğu gösterilmiştir (91).

Stikkelbroeck ve arkadaşları (81) Hollanda popülasyonunda CYP21 mutasyon sıklığını ve genotip-fenotip korelasyonunu araştırmıştır. 198 hastadan, 370 allel incelenmiştir. Gen delesyonu/konversiyonu 118 allelde (%31.9) saptanmış. En sık görülen nokta mutasyon ise IVS2 (%28.1) ve I172N (%12.4) olmuştur. Yedi allelde (%1,9) tek kromosom yerleşimli ekson 7 ve 8'de bulunan psödogen kaynaklı küme mutasyon (V281L-F306-Q318X-R356W) ve 6 yeni mutasyon bulunduğu belirtilmiştir.

Genotip-fenotip korelasyonu 87 hastada yapılmış, sıfır mutasyon grubunda 29 hastadan 28'inde (%97) ve IVS2 mutasyonuna sahip (homozigot veya 0 grup mutasyonla bileşik heterozigot) 24 hastanın 23'ünde tuz kaybettiren tip saptanmıştır. I172N mutasyonuna sahip homozigot ve bileşik heterozigot (0 grup mutasyon ya da IVS2 mutasyonu) hastalarda tuz kaybettiren tip (17 hastanın 2'sinde, %12), basit virilizan tip (17 hastanın 10'unda, %59) ve non-klasik tip KAH (17 hastanın 5'inde, %29) saptanmıştır. P30L, V281L ve P453S mutasyonuna sahip homozigot ve bileşik heterozigot 6 hastada non-klasik tip saptanmıştır (81). Batı Avrupa ülkelerinde yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında fenotip-genotip korelasyonun düşük olduğu bildirilmiştir (81). Yeni bulunan 6 mutasyon ve ekson 7 ve 8'de yerleşen psödogen kaynaklı 4 küme mutasyonu Hollanda populasyonu için karakteristik olabileceğini belirtmiştir (81).

New ve ark. (80) 21-OHE'ne bağlı KAH hastalarının en büyük kohortunu içeren çalışmada fenotipin öngörülebilirliğinin önceden düşünülenenden daha az olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada genotiplerin yaklaşık %50'sinde doğrudan genotip-fenotip korelasyonu bulunmuştur. En güvenilir olmayan tahminler, basit virilize edici formda ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, tuz kaybettiren form ve klasik olmayan formlarda bulunan bazı genotipler için güçlü korelasyon kaydedilmiştir. P.V281L, delesyonlar, 8-bp delesyon, p.Q318X ve p.R356W mutasyonlarında yüksek genotip-fenotip uyumu saptanmıştır.

Türkiye'de yapılan çalışmalardan Tükel ve ark. (92) 31 hasta üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada CYP21A2 geninde sık rastlanan mutasyonlar, "semiquantitative" PZR/enzim kesimine dayalı bir metod ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda P30L ve V281L mutasyonlarına rastlanmamıştır. IVS2 mutasyonuna %22.5, 8bp delesyonuna %3.2, I172N mutasyonuna %11.4, E6 cluster mutasyon kümesine %3.2, Q318X mutasyonuna %8, R356W mutasyonuna %9.6 oranında rastlanmıştır. Aynı çalışmada "SouthernBlot" tekniği ile CYP21A2 genindeki delesyon ve konversiyonlar da incelenmiş ve delesyon oranı %9.6, konversiyon oranı ise %22.5 olarak bulunmuştur.

2009 yılında Baş ve ark.'nın (93) ülkemizde gerçekleştirdiği çalışmada, 56 KAH tanılı hastada CYP21 genotipleme raporumuzdur. Hastaların %84.6'sında hastalığa neden olan mutasyonların saptanmış olduğu raporlanmıştır. Çalışmada %22.0 oranında IVS2, %14.3 oranında konversiyon, %8.8 oranında R356W, %9.9 oranında I172N, %7.6 oranında V281L, %6.6 oranında büyük delesyon, %4.4 oranında 8-bpdelesyon,

%3.3 oranında Q318X, %3 oranında 8-bpdelesyonu, %2.2 oranında p453S, R339H ve E6 küme rmutasyonları ve %1.1 oranında kompleks alleller saptamışlardır (93).

Sadeghi ve ark. (94) yapmış olduğu çalışmada ise 21-hidroksilaz eksikliği tanısı almış 100 hastada CYP21A2 geninde sık rastlanan mutasyonlar incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda % 28.5 oranında IVS2, % 17 oranında büyük gen delesyonları, %12.5 oranında Q318X, %4 oranında I172N ve 8-bp delesyonu, %4.5 oranında V281L, %4.5 oranında R356W, %1,5 oranında P30L ve %1 oranında I236N, V237E ve M239K mutasyonları bulunmuştur.

KAH hastalarında genotip-fenotip değişkenliği için çeşitli faktörler sorumlu olabilir. Aynı mutasyonu taşıyan kardeşler arasında bile klinik bulguların ağırlığı açısından farklılık olduğu gözlenmiştir. Başka genlerin de etkisi olabileceğine dikkat çekilmektedir (29).

CYP21A2 mutasyonları dışında steroid etkisini veya tuz dengesini değiştirerek fenotipi etkileyebilen diğer faktörler bildirilmiştir: androjen reseptöründe CAG tekrarları uzunluğu (95, 96); P450 oksidoredüktaz enzimin yüksek polimorfizmi; RNA “splice” faktörlerinde kırılma mutasyonları varyantları (97, 98) ve 21-hidroksilaz aktivitesine sahip sitokrom P450 tip II gibi diğer başka proteinleri kodlayan diğer genler (99, 100). Ayrıca, genetik analizde yeni mutasyonların araştırılmaması, eksik genotiplenme, 2 ve ya fazla mutasyona bağlı bileşik heterozigotluk genotip-fenotip uyumsuzluğunu izah edebilir.

2.18. Tedavi

2.18.1. Glukokortikoid tedavisi

Kojenital adrenal hiperplazide tedavi medikal, cerrahi ve uygun cinsel kimliğin verilmesine yöneliktir. Tedavide en önemli nokta ACTH sekresyonunu normale getirilerek adrenal androjenlerin aşırı sekresyonun inhibe edilmesi ve adrenal bez tarafında sentezlenemeyen steroidlerin replasmanının yapılmasıdır. Adrenal kortekste androjen yapımını baskılamak için fizyolojik dozda glukokortikoid tedavisi yetersiz kaldığından, supra-fizyolojik dozlar kullanmak gerekir. Glukokortikoid dozu interval büyüme, vücut yüzey alanı, kemik yaşı ve hormon seviyesine göre ayarlanır. Çocuklarda önerilen kortizol tedavisi hidrokortizondur ve 10-20 mg/m²/gün 2 ve ya 3

dozda uygulanır. Yenidoğanlarda kortizol sekresyonu biraz yüksek olsa da (7-9 mg/m²/gün), KAH'li infantlara minimum 6mg/gün 3 dozda verilir (2).

Diğer uzun etkili glukokortikoidlere göre yan etkileri daha az olduğu için tedavide tercih edilen başlıca glukokortikoid hidrokortizondur. Büyük adolesan ve erişkinler daha düşük doz prednizon (5-7,5 mg/gün iki doz) ve ya deksametazon (0,25-0,5 mg tek ve ya iki doz) ile tedavi edilebilir. Hastalar hızlı kilo alma, hipertansiyon, striyalar ve osteopeni gibi yatrogenik Cushing sendromu bulguları açısından dikkatli izlenmelidir. Testikuler adrenal rest sorunu olan erkek hastalarda ACTH baskılanması için yüksek doz deksametazon gerekebilir. Ateş, travma, ameliyat gibi akut strese maruz kalan KAH hastalarda aldığı glukokortikoid dozunun artırılması gerekir. Genellikle kullanılan hidrokortizon miktarı 3 katına çıkartılır (2).

Tedavi başarısı (adrenal hormonların baskılanması) 17-OHP ve androstenodion düzeyi ile izlenmelidir. Kız hastalarda ve prepubertal erkek hastalarda testosteron düzeyi de bakılabilir. Hedef 17-OHP düzeyi yaş ve cinsiyet dikkate alınarak 100-1000ng/dl aralığında seyretmelidir. Hormon ölçümü zamanı ilaç alma saatine yakın, saat 08:00'da, ACTH fizyolojik pik yaptığı saatte ve ya bir sonraki dozu almamıştan önce olmalıdır. KAH hastalarında hormon düzeyinin izlenmesi ya tükürükten ya da parmak ucundan filtre kağıtına toplanan örnekten 17-OHP ölçülmesiyle de yapılabilir (2).

Çocuklar yıllık kemik yaşı değerlendirilmeli ve lineer büyüme dikkatli izlenmelidir. Dikkatli hasta takibi ve iyi hasta uyumu olmasına bakmayarak, bir çok retrospektif çalışmalarda final boyun populyasyonun ortalama boyundan ve ya hesaplanan hedef boydan 1-2 SDS aşağı olduğu gösterilmiş (101,102).

Tedavide hidrokortizon ile kontrol sağlanılamıyorsa, 2-4 günlük prednizon veya deksametazon tedavisi ile baskılanma sağlanarak hidrokortizon tedavisi devam ettirilebilir. Epifizler kapandıktan sonra prednizon ve ya deksametazon esas tedavi olarak kullanılabilir. Ancak ilaç dozu 20mg/m² hidrokortizon eqvivalan dozunu aşmamalı ve hasta yatrogenik Cushing sendromu bulguları açısından dikkatli izlenmelidir (2).

Non-klasik KAH tanısı alan hastalarda eğer fazla androjen sekresyonu bulguları varsa tedavi edilmelidir. Erken pubarş, erken başlayan tüylenme ve ona eşlik eden

uyumlu kemik yaşı bulguları olan hastada düşük doz glukokortikoid tedavisi başlanabilir. Non-klasik Yahudi hasta grubunda yapılan çalışmada erken adrenarş ve kemik yaşı hızlanmasının ilk bulguları başlarken düşük doz glukokortikoid tedavisi başlanarak hedef boya ulaşılmıştır (103). Başka çalışmalarda ise non-klasik KAH'nin boya yan etkisi olmadığı gösterilmiştir (104).

2.18.2. Mineralokortikoid tedavisi

Mineralokortikoid replasmanı ise fludrokortizon ile yapılır. Hedef renin düzeyini normal aralıkta tutmaktır. Günlük doz genelde 100-200 µg kadardır. Tuz kaybettirmeyen klasik KAH olgularında da glukokortikoid ihtiyacını azalttığından fludrokortizon replasmanı önerilmektedir (104,105). Ancak fludrokortizonun da yüksek dozlarının büyüme engelleyebileceği unutulmamalıdır. Yenidoğan döneminde tuz kaybettiren klasik KAH olgularında günlük 1-2 g sodyum klorür gereksinimi olurken, yaşamın ilk 6-12 ayı geçtikten sonra tuza ihtiyaç kalmaz. Sıcak havalarda ve yorucu egzersizlerde tuz ihtiyacı arta bileceğinden tedaviye eklemek gerekebilir (2).

2.18.3. Diğer terapötik yaklaşımlar

KAH tedavisinde yeni kullanılan 4'lü rejime flutamid (androjen reseptör bloker), testolakton (aromataz inhibitörü), düşük doz hidrokortizon ve fludrokortizon dahildir. Standart tedavi alan çocuklarla kıyaslandığında daha az kemik yaşı etkilenmesi ve daha uygun büyüme hızı saptanmıştır (106).

Diğer deneysel ilaç ise 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz (11-HSD) inhibitörü olan karbenoksolondur. Bu enzim kortizolu inaktive ederek onun mineralokortikoid reseptörlerine ulaşmasını engelliyor (107).

Konjenital adrenal hiperplazi ve konkurent malignite nedeniyle tedavi alan 2 hastada antiandrojen etkisi olan klormadion asetat prostat kanseri için kullanılmıştır ve her iki vakada ACTH ve adrenal androjen sekresyonu baskılandığı bildirilmiştir (108).Ancak, hepatik toksisite ve teratojenite gibi yan etkileri olan antiandrojenler çocuk ve kadın KAH hastalarının tedavisinde kullanılmamaktadır (2).

Standart medikal tedaviye alternatif olarak laparoskopik adrenalektomi ve düşük doz steroid tedavisi de denenmiştir (109).

2.18.4. Cerrahi tedavi

Kız çocuklarda dış genitalyanın düzeltilebilmesi için cerrahi tedavi önem taşımaktadır. Ancak hastalara uygulanacak cerrahi yaklaşım halen oldukça karmaşık ve tartışmalıdır. “European Society for Pediatric Endocrinology” ve “Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society”ye göre klasik tipte KAH hastası olan ve virilizasyonu bulunan kızlarda cerrahi operasyon diğer yaşlara oranla teknik olarak daha kolay olduğu için 2-6 aylıkken yapılmalıdır (5).

Cerrahi tedavi, genitoplasti ve vajinoplasti olmak üzere 2 aşamadan oluşmaktadır. Genitoplasti ile klitoris ve labia düzeltilir, vajinoplasti ile “perineal introitus” oluşturmak için vajina ile urogenital sinus ayırımı gerçekleştirilir (2).

2.18.5. Puberte prekoks tedavisi

Adrenal seks hormonlarının fazla salgılanmasına bağlı hipotalo-hipofizer-gonadal aksın olgunlaşması ve santral puberte prekoks gelişebilir. Santral puberte prekoksda GnRH analogları ile hipofiz baskılanması gerekir (110).

KAH hastalarında tedavi sonucunda adrenal seks steroidlerinde ani düşüş hipotalamusu aktive ederek gerçek puberte prekoks neden olabilir. Bu durumun lüteinizan hormon salgılayıcı hormon analogları ile etkin olarak tedavi edilebileceği bildirilmiştir. Tedavinin amacı hipofizer gonadotropini ve aynı zamanda gonadal seks hormonlarını baskılamak ve epifiz kapanmasını geciktirerek hedef boya ulaşmayı sağlamaktır (2).

2.19. Prenatal tanı ve tedavi

Konjenital adrenal hiperplazi prenatal tedavi ile postnatal fenotipi iyileştirilebilen nadir genetik hastalıklardan biridir.

21-hidroksilaz eksikliğinin prenatal tanısı, ilk trimesterinin sonlarında koryonik villus örnekleme ile veya ikinci trimesterde amniyosentez ile elde edilen DNA analizi ile konulabilir. Ailede etkilenen bir çocuk bulunduğu bu prosedür uygulanır.

21-hidroksilaz eksikliği ile ilgili prenatal tanı ve tedavi 1984 yılından beri yapılmaktadır (2). Gebelikte anneye deksametazon tedavisi uygulanarak virilize adrenal

hiperplazili fetusda fetal adrenal androjen sekresyonu dahil, diğler steroidler baskılanır (111-113).

Riskli gebeliklerde, plasentadan kolayca geçen ve tuz tutma etkisi az olan deksametazonun annenin gebelik öncesi tartısına göre hesaplanarak 20 µg/kg'dan (max 1,5mg/gün) iki ve ya üç dozda verilmesi önerilmektedir. Eğer gebeliğın 6. haftasında başlanılırsa, etkilenen kızlarda dış genitalyanın virilizasyonunu engellenir. Fetusun cinsiyeti ve genotipi belirlemek için daha sonra koryonik villus biyopsisi yapılır, tedaviye sadece etkilenen fetusun dışı olması durumunda devam edilir. Cinsiyet tayini ve CYP21 gen analizi için maternal plazmadan izole edilen fetal hücrelerin DNA analizi ile etkilenen dışı fetüs daha erken saptanabilir (61).

Prenatal tedavi alan kız hastaların %70'i normal veya çok az virilize genitaliya ile doğulur. Kız hastalarda cerrahi rekonstruksiyona gerektiren tedavi başarısızlığı tedavinin geç başlanması, gebeliğın orta döneminde tedavinin kesilmesi, uygunsuz ve ya suboptimal dozda verilmesi ile açıklanmış (114), ancak açıklanamayan vakalarda bildirilmiştir (115).

Prenatal tedavi alan kızların adolesan döneme geç ulaştığı ve normal kognitif gelişim gösterdiği bildirilmiş (116).

Prenatal tedavinin maternal yan etkileri ödem, aşırı kilo alımı, osteopeni, hipertansiyon, glukoz intoleransı, cushingoid yüz görünümü ve şiddetli stria oluşumudur.

Anne ve babanın her ikisi de KAH hastalığı açısından taşıyıcı ise doğacak olan çocukların sadece 1/8'inin etkilenmiş bir kız olabileceği ve 7/8 fetusun dekzametazon tedavisini gereksiz bir şekilde alabileceği düşünüldüğünden prenatal tedavi uygulanması konusunda halen tartışmalar sürmektedir (2).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Olgular

Çalışmada, yaş aralığı gözetmeksizin, İ.Ü. Çerhpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji polikliniğinde 21-hidroksilaz eksikliği klinik tanısı ile takip ve tedavi edilen 40 olgu alınmıştır. Klinik verilere retrospektif olarak Haziran 1982'den Aralık 2017'ye kadar Çocuk Endokrinolojisi polikliniğinde muayene edilen hastaların tıbbi kayıtlarından ulaşılmıştır.

3.2. Fenotip değerlendirilme

Hastalar elektrolit anormalliklerinin varlığı veya yokluğu ve hormonal veriler temel alınarak tuz kaybettiren, basit virilize ve non-klasik KAH olarak tiplendirilmiştir. Hastaların kliniğe başvuru yaşı, tanı alma yaşı, cinsiyeti, anne-baba akrabalık öyküleri, tedavi öncesinde bakılan bazal ve/veya kortikotropin ile uyarılan serum 17-hidroksiprogesteron ve renin düzeyleri kaydedildi.

3.3. Genotip değerlendirme

Klasik ve non-klasik tanılı 40 hastanın genetik sonucu incelendi. Bunlardan 35-i aynı merkezde çalışılmışdı (merkez I). Bu merkezde periferik kandan izole edilen genomik DNA örneğinde CYP21A2 geninin protein kodlayan bütün ekzonlarına ve intron 2'ye özgü primer çiftleri kullanılarak Sanger yöntemi ile dizi analizi yapılmıştır. Genin protein kodlayan ekzon bölgeleri, ekzon-intron bağlantı bölgeleri ile patojenik olarak belirlenen intron 2'nin -13. baz bölgesi ve başlangıç kodonundan itibaren yaklaşık -350bp bölge proksimal promöter olarak dizilenmiştir. Elde edilen hasta verileri NCBI kaynaklı referans dizi kullanılarak analiz edilmiştir.

35 hastadan 26'sına aynı zamanda MLPA testi yapılmıştır (merkez II). MLPA testi ile prob bağlanma bölgelerine göre saptanabilen büyük ekzon ve gen konversiyonları, gen delesyonları, İntron 2'de c.293-13C/A>G (rs6467, IVS-12A/C-G), Ekzon 3'de c.332_339delGAGACTAC (8 bp del), Ekzon 4'de c.515T>A (p.I172N), Ekzon 6'da c.713T>A (p.V238E) ve c.719T>A (p.M240K), Ekzon 7'de c.923delT (p.L308Cfs*15) bakılmıştır (Tablo 4).

5 hastaya ise 3 farklı merkezde (2 hastaya hem dizi, hem de MLPA, 3 hastaya ise sadece dizi analizi yapıldı) genetik inceleme yapılmıştır. Hasta numaralarına göre yapılan analizlerin listesi Tablo 5’de yer almaktadır.

Tablo 4: Merkez I ve Merkez II’de çalışılan genetik testlerin karşılaştırılması

	Merkez I	Merkez II
Kullanılan yöntem	Sanger yöntemi ile dizi analizi	MLPA
İncelenen bölge ve mutasyonlar	Tüm ekzon Ekzon-intron bağlantı bölgeleri Intron 2’nin -13 baz bölgesi -350bp promotör bölge	Büyük ekzon ve gen konversiyonları Gen delesyonları İntron 2’de c.293-13C/A>G (rs6467, IVS-12A/C-G) Ekzon 3’de c.332_339delGAGACTAC (8 bp del) Ekzon 4’de c.515T>A (p.I172N) Ekzon 6’da c.713T>A (p.V238E) vec.719T>A(p.M240K) Ekzon 7’de c.923delT (p.L308Cfs*15)

MLPA: Multiplex ligation-dependent Probe Amplification;8 bp del: 8 bp delesyon

Tablo 5: Genetik testlerin çalışıldığı merkezler

Hasta no	Merkez I	Merkez II	Dış merkez
1	+	+	
2*			+
3	+		
4	+	+	
5	+	+	
6*			+
7	+		
8	+	+	
9	+	+	
10	+	+	
11	+	+	
12	+	+	
13	+	+	
14	+	+	
15	+	+	
16	+	+	
17	+	+	

* dış merkezde hem dizi analizi, hem de MLPA yapılan hastalar

Tablo 5: Genetik testlerin çalışıldığı merkezler (Devamı)

Hasta no	Merkez I	Merkez II	Dış merkez
18	+	+	
19	+		
20	+	+	
21	+	+	
22	+	+	
23	+		
24	+	+	
25	+	+	
26	+		
27			+
28	+	+	
29	+	+	
30			+
31	+		
32	+	+	
33	+	+	
34	+		
35	+	+	
36	+	+	
37			+
38	+		
39	+		
40	+	+	

* dış merkezde hem dizi analizi, hem de MLPA yapılan hastalar

3.4. Metod

Olgularımızda saptadığımız genotipler daha önce hastalıktan sorumlu olduğu belirlenmiş mutasyonların *in vitro* çalışmalara dayalı tahmini enzimatik aktivite düzeyine göre 4 gruba ayrıldı (1, 2). Grup 0, enzim aktivitesi sıfır olan, her iki allelde enzim aktivitesini sıfırlayan mutasyonu olan hastalar (gen delesyonları, konversiyonlar, 8bp delesyon, Q318X, Y59N) dahil edildi. Grup A'ya IVS2 mutasyonu için homozigot olan veya IVS2 ve 0 mutasyonu için bileşik heterozigot olan hastalar dahil edildi. Bu mutasyon için tahmin edilmiş bulunan minimal enzim aktivitesi %0-1'dir. B grubuna I172N mutasyonu homozigot veya 0 ve A grupları ile bileşik heterozigot olan hastalar dahil edildi. I172N mutasyonu için tahmin edilen enzim aktivitesi % ~ 2'dir. C grubuna genotipleri V281L, P30L mutasyonu için homozigot veya grup 0, A veya B ile bileşik heterozigot olan hastalar dahil edildi. D grubuna ise CYP21 geninden mutasyon saptanmayan hastalar dahil edildi.

Grup 0 ve A için beklenen fenotip tuz kaybı, Grup B hastaları için basit virilizan ve C grubu için non-klasik KAH formlarıdır. Her bir mutasyon grubu için pozitif prediktif değer (positive predictive value; pozitif öngördürütçü değer) hesaplandı. PPV her grupta beklenen fenotiple uyumlu hasta sayısı o grupta olan toplam hasta sayısına bölünüp, 100 ile çarpılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

Kırk hastadan 5'inde genetik testler farklı dış merkezlerde, 35'inde ise merkez I'de yapılmıştı. Bu 35 hastadan 26'sına aynı zamanda merkez II'de MLPA testi de çalışılmıştı. Farklı merkezlerde ve yöntemlerde çalışılan genetik testlerin sonucuna göre 40 hastanın genotipi karşılaştırıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Dizi analizi ve MLPA testi sonuçlarının karşılaştırılması

No	Dizi analizi	MLPA testi
1	R356W / R356W	IVS2 / saptanmadı
2*	Q318X / Q318x	Q318X / Q318x
3	IVS2 / IVS2	Çalışılmadı
4	I172N / I172N	del /saptanmadı
5	IVS2 / IVS2	IVS2 / IVS2
6*	Q318X / Q318x	Q318X / Q318x
7	IVS2 / Q318X	Çalışılmadı
8	IVS2 / IVS2	del /IVS2
9	IVS2 / IVS2	del /IVS2
10	IVS2 / IVS2	IVS2/IVS2
11	Gen çoğaltılmadı	del/del
12	Gen çoğaltılmadı	konv/konv
13	Gen çoğaltılmadı	konv/konv
14	I172N / Mutasyon saptanmadı V281L / Mutasyon saptanmadı C.920*921 / Mutasyon saptanmadı I236N,V237E,M239K / Mutasyon saptanmadı	Mutasyon saptanmadı
15	Gen çoğaltılmadı	del / del
16	8bp del / 8bp del	8bp del / del
	IVS2 / IVS2	
17	Gen çoğaltılmadı	konv /konv
18	I172N / I172N	I172N / I172N
19	IVS2 / Q318X	Çalışılmadı
20	Gen çoğaltılmadı	konv / del
21	IVS2 / IVS2	del / IVS2
22	I172N / I172N	I172N / I172N
23	I172N / I172N	Çalışılmadı
24	IVS2 / IVS2	IVS2 / IVS2
25	IVS2 / IVS2	IVS2 / IVS2
26	9_10msL /9_10msL	Çalışılmadı
27*	I172N /I172N	Çalışılmadı
28	IVS2 / IVS2	IVS2/IVS2
29	IVS2 / IVS2	IVS2/IVS2
30*	I172N / I172N	Çalışılmadı
31	IVS2 / IVS2	Çalışılmadı
32	Q318X / Q318x	konv / saptanmadı
33	Gen çoğaltılmadı	konv/del
34	V281L/V281L	Çalışılmadı
35	V281L /V281L	Mutasyonsaptanmadı
36	V281L /V281L	Mutasyon saptanmadı
37*	I172N /I172N	Çalışılmadı
38	I172N/ V281L	Çalışılmadı
39	V281L/ Y59N	Çalışılmadı
40	p.30L/8bp del	8bp del/saptanmadı

*dış merkezlerde çalışılan hastalar; Del: delesyon; konv: konversiyon; 8-bp del: 8-bp delesyon; IVS2: Intron 2 splice mutasyonu (IVS2 -13 A-G); MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.

Hasta genotipleri 6 farklı grupta değerlendirilebildi.

Birinci grup: sadece bir merkezde çalışılan olgular. On dört olguda sadece tek merkezde genetik test yapılmıştı. Bu olgulardan 12'sinde (hasta no. 3, 7, 19, 23, 26, 27, 30, 31, 34, 37, 38, 39) sadece dizi analizi, 2'sinde ise (hasta no. 2, 6) dış merkezde hem dizi, hem MLPA testi yapılmıştı (Tablo 7).

Tablo 7: Tek merkezde çalışılan olgular

Hasta No	Merkez I	Dış merkez
2		Q318X/Q318X
3	IVS2/IVS2	
6		Q318X/Q318X
7	IVS2/Q318X	
19	IVS2/Q318X	
23	I172N /I172N	
26	9_10insL /9_10insL	
27		I172N /I172N
30		I172N /I172N
31	IVS2/IVS2	
34	V281L/V281L	
37		I172N /I172N
38	I172N/ V281L	
39	V281L/ Y59N	

İkinci grup: hem merkez I'de, hem de merkez II'de çalışılan ve genetik sonuçları aynı olan olgular. Sekiz olguda (hasta no.5, 10, 18, 22, 24, 25, 28, 29) dizi analizi ve MLPA analizi sonuçları aynı saptandı (Tablo 8).

Tablo 8: Merkez I'de ve merkez II'de genetik sonuçları aynı saptanan olgular

Hasta no	Merkez I	Merkez II
5	IVS2/ IVS2	IVS2 / IVS2
10	IVS2/ IVS2	IVS2/ IVS2
18	I172N / I172N	I172N / I172N
22	I172N / I172N	I172N / I172N
24	IVS2/ IVS2	IVS2/ IVS2
28	IVS2/ IVS2	IVS2/ IVS2
29	IVS2/ IVS2	IVS2/ IVS2

Üçüncü grup: PCR yöntemi ile CYP21A2 geni çoğaltılmayan hastalar. Yedi olguda (hasta no. 11, 12, 13, 15, 17, 20, 33) Merkez I'de PCR yöntemi ile CYP21A2 geni çoğaltılmadığından bu durum aktif genin kısmi ya da tamamının kaybı olasılığı şeklinde değerlendirilmişti. Merkez II'de MLPA ile delesyon ve konversiyon saptandı, sonuçları anlamlı kabul edildi (Tablo 9).

Tablo 9: Merkez I'de CYP21A2 geni çoğaltılmayan ve merkez II'de delesyon ve konversiyon saptanan olgular

Hasta no	Merkez I	Merkez II
11	Gen çoğaltılmadı	del / del
12	Gen çoğaltılmadı	konv / konv
13	Gen çoğaltılmadı	konv / konv
15	Gen çoğaltılmadı	del / del
17	Gen çoğaltılmadı	konv / konv
20	Gen çoğaltılmadı	konv / del
33	Gen çoğaltılmadı	konv / del

Kalın yazı kabul edilen genotipi göstermektedir. Del: delesyon; konv: konversiyon

Dördüncü grup: merkez I'de homozigot nokta mutasyon saptanan, ancak merkez II'de MLPA testi sonucu bir allelde delesyon saptanan olgular. Bu hasta grubunda (hasta no. 4, 8, 9, 16, 21) merkez II sonuçları anlamlı kabul edildi (Tablo 10).

Tablo 10. Merkez I'de homozigot nokta mutasyon, merkez II'de ise delesyon saptanan hastalar

Hasta no	Merkez I	Merkez II
4	I172N / I172N	del/ mutasyon saptanmadı
8	IVS2/IVS2	del / IVS2
9	IVS2/IVS2	del / IVS2
16	IVS2/IVS2 8 bp-del / 8 bp-del	8bp-del / del
21	IVS2/IVS2	del / IVS2

Kalın yazı kabul edilen genotipi göstermektedir. Del: delesyon, 8 bp-del: 8 bp delesyon.

Beşinci grup: merkez II'de çalışılmayan mutasyonların saptandığı olgular. Dört olguda (hasta no. 32, 35, 36, 40) dizi analizinde merkez II'de çalışılmayan mutasyonlar saptanmıştı (Tablo 11).

32 no'lu hastada I'de homozigot olarak Q318X/Q318X saptandı, ancak II'de bu mutasyon bakılamıyordu. Bu hastada II'de bir allelde konversiyon saptandı. Genotipi konversiyon/Q318X olarak kabul edildi.

35 ve 36 no'lu hastalarda homozigot V281L/V281L saptandı. MLPA sonucu normal saptandı. Merkez II'de bu mutasyon bakılmadığından, genotipi V281L/V281L kabul edildi.

40 no'lu hastada I'de p30L/8bp-del, II'de ise bir allelde 8bp-del mutasyonu saptandı. Diğer allelde mutasyon saptanmadı. Anne ve babaya dizi analizi yapıldı. Annede 8bp-del mutasyonu, babada ise p30L mutasyonu heterozigot saptandı. Genotip p30L / 8bp del kabul edildi.

Tablo 11: Merkez II'de çalışılmayan mutasyonların saptandığı hastalar

Hasta no	Merkez I	Merkez II
32	Q318X / Q318X	Konv / mutasyon saptanmadı
35	V281L / V281L	Mutasyon saptanmadı / Mutasyon saptanmadı
36	V281L / V281L	Mutasyon saptanmadı / Mutasyon saptanmadı
40	P30L / 8bp-del	8bp-del / mutasyon saptanmadı

Kalın yazı kabul edilen genotipi göstermektedir. Konv: konversiyon, 8 bp-del: 8 bp delesyon.

Altıncı grup: genotipi belirlenemeyen olgular. Üç olguda (hasta no. 1, 14, 26) genotip belirlenemedi (Tablo 12).

1 no'lu hastada dizi analizinde R356W/R356W mutasyonu homozigot saptandığı halde, ikinci merkezde bir allelde IVS-2 saptandı, diğer allelde ise mutasyon görülmedi. Hem IVS-2 mutasyonunun dizi analizi ile saptanma ihtimali yüksek olduğundan, hem de anne ve baba arasında 2. derece akraba evliliği olan hastanın heterozigot olma olasılığı düşük olduğundan hiçbir sonuç anlamlı kabul edilmedi.

14 no'lu hastada dizi analizinde hastalıkla ilişkilendirilmiş 4 mutasyon için heterozigot olduğu saptandı. Annenin de aynı şekilde 4 mutasyon için heterozigot olduğu saptandı. Babada ise mutasyon saptanmadı. İndeks olguda MLPA ile de delesyon, konversiyon ve prob bağlanma bölgelerine göre araştırılabilen 5 mutasyon saptanmadı. Sonuçta genotipi belirlenememiş oldu.

26 no'lu hastada saptanan ve daha önce CYP21 geninde benign varyant olarak tanımlanan 9_10insL değişimin pseudogene ait olabileceği düşünüldüğünden, MLPA ile konversiyon aranması gerekti. Ancak DNA yetmediği için çalıştırılmadı.

Tablo 12: Genotipi belirlenemeyen olgular

Hasta no	Merkez I	Merkez II
1	R356W / R356W	IVS2 / mutasyon saptanmadı
14	I172N/mutasyon saptanmadı V281L/mutasyon saptanmadı C.920*921/mutasyon saptanmadı I236N,V237E,M239K/mutasyon saptanmadı	Mutasyon saptanmadı/ mutasyon saptanmadı
26	9_10 insl / 9_10 insl	Çalışılmadı

Bileşik heterozigot olan 4 olguda (hasta no.7, 14, 19, 40) anne ve babada CYP21 gen dizi analizi yapıldı (Tablo 13).

13: Anne ve babada dizi analizi yapılan olgular

Hasta no	Anne	Baba	Hasta
7	IVS2/mutasyon saptanmadı	Q318X/ mutasyon saptanmadı	IVS2/Q318X
14	I172N/ mutasyon saptanmadı V281L/ mutasyon saptanmadı C.920*921/mutasyon saptanmadı I236N,V237E,M239K/ mutasyon saptanmadı	mutasyon saptanmadı / mutasyon saptanmadı	I172N/ mutasyon saptanmadı V281L/ mutasyon saptanmadı C.920*921/ mutasyon saptanmadı I236N,V237E,M239K/ mutasyon saptanmadı
19	Q318X/ mutasyon saptanmadı	I172N/ mutasyon saptanmadı	Q318X/I172N
40	8bp del/ mutasyon saptanmadı	P30L/ mutasyon saptanmadı	P30L/8bp del

8 bp-del: 8 bp delesyon

Bu güne kadar 21-hidroksilaz eksikliği ile ilişkilendirilen mutasyonları içeren genotipi belirlenen otuz yedi 21-hidroksilaz eksikliği tanılı hastamızın klinik ve biyokimyasal verileri ve moleküler defektleri Tablo 14’de özetlenmiştir.

Klinik bulgular 37 olgunun 15’i tuz kaybı formu (%40.5), 15’i basit virilize form (%40.5) ve 7’si non-klasik form (%18.9) özelliğini gösteriyordu. Klasik KAH olgularının ise %50’i tuzkaybı formu, %50’si ise basit virilizan tip olarak tanımlanmıştır (Şekil 2).

Erkek/kız oranına bakıldığında bütün vakaların %27’i (10/37) erkek, tuz kaybı ile giden vakaların % 46.6’sı (7/15), basit virilizan vakalarının %20-si (3/15) erkek olduğu görüldü. Non-klasik KAH vakalarında erkek hasta yoktu (Tablo 15 ve şekil 3).

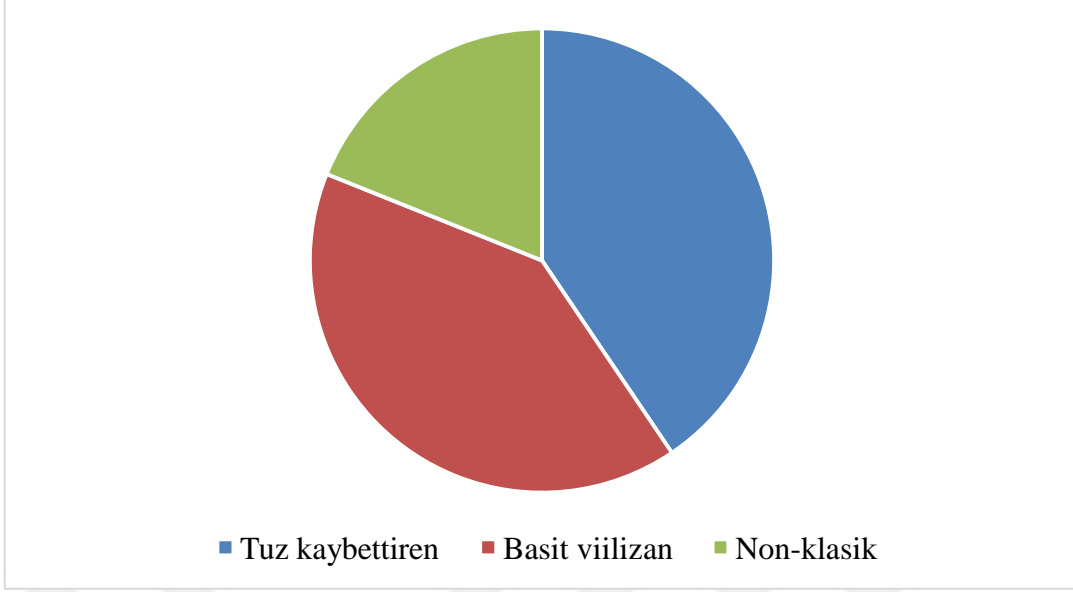
Otuz yedi hastamızın 16’sında (%43.2) anne baba arasında akrabalık tanımlanmaktadır (Tablo 14). Bileşik heterozigot genotipine sahip 13 hastanın 2’sinde (%15.3) anne baba arasında akrabalık tanımlanmaktadır.

Hastaların %27,5’inde (n = 8) pozitif aile öyküsü vardı: iki kardeşin de etkilendiği aile sayısı 4’tü. İlk ailede, iki kardeşte 46, XX BV, ikinci ailede 46, XX TK ve 46, XY TK, üçüncü ailede 46, XX BV ve 46, XY BV, dördüncü ailede ise aynı genotipli kardeşler 46, XX TK ve 46, XY BV idi (Tablo 16).

Tablo 14: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği tanılı hastaların klinik ve biyokimyasal verileri ve moleküler defektler

Hasta no	Karyotip	Genotip	AE	Tanı yaşı	b 17OHP(ng/ml)	Fenotip
2 ¹	XX	Q318X/Q318x	yok	0,04	110(t.a)	TK
3	XX	IVS2/IVS2	var	0,04	>20	TK
4	XX	del/saptanmadı	yok	0,01	138	TK
5 ²	XY	IVS2 /IVS2	var	0,02	47,6	TK
6 ¹	XY	Q318X/Q318x	yok	0,02	166(t.a.)	TK
7	XX	IVS2/Q318X	var	0,08	591	TK
8	XY	del/IVS2	yok	0,01	16,50(t.a)	TK
9	XY	del /IVS2	yok	0,29	>20	TK
10	XY	IVS2/IVS2	var	0,08	42,25	TK
11	XX	del/del	var	0,05	>20	TK
12	XX	konv/konv	var	0,05	259	TK
13	XY	konv/konv	yok	0,15	100	TK
15	XX	del/del	var	0,01	>20	TK
16	XX	8bp del/del	yok	0,140	>20	TK
17	XY	konv/konv	var	0,06	>20	TK
18 ³	XX	I172N/I172N	var	5,05	Dış merkez	BV
19	XY	IVS2/Q318X	yok	0,08	591	BV
20	XX	konv/del	yok	0,11	43,94	BV
21	XX	del/IVS2	yok	0,01	>20	BV
22 ³	XX	I172N /I172N	var	4,671	0,91	BV
23	XX	I172N /I172N	var	7,5	69,6	BV
24*	XX	IVS2/IVS2	yok	2,54	12,8	BV
25*	XX	IVS2/IVS2	yok	0,36	>20	BV
27	XY	I172N /I172N	yok	9,29	>20	BV
28	XX	IVS2/IVS2	yok	4,42	>20	BV
29 ²	XY	IVS2/IVS2	var	2 529	>20	BV
30	XX	I172N /I172N	yok	1,84	220	BV
31	XX	IVS2/IVS2	var	0,15	80	BV
32	XX	konv/Q318x	var	0,66	28,5(t.a)	BV
33	XX	konv/del	yok	0,485	>20	BV
34	XX	V281L/V281L	var	8,4	5,9	NK
35	XX	V281L /V281L	yok	6,62	32	NK
36	XX	V281L /V281L	var	17,38	8,37	NK
37	XX	I172N /I172N	yok	11,06	4,4	NK
38	XX	I172N/V281L	yok	17,03	28,7	NK
39	XX	V281L/Y59N	yok	8,25	31,5	NK
40	XX	p.30L/8bp del	yok	7,12	4,7	NK

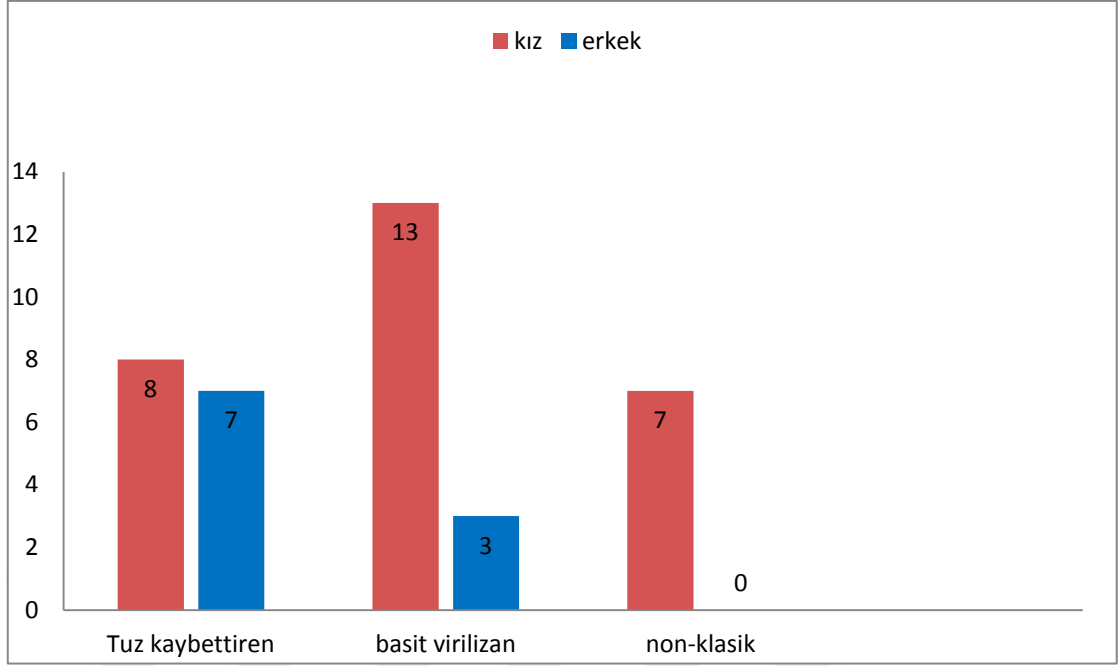
Genotipi belirlenemeyen 1, 14 ve 26 no'lu hastalar tabloda yer almamaktadır. ¹, ², ³, *kardeş çiftlerini göstermektedir; t.a.-tedavi altında; AE: akraba evliliği; TK: tuz kaybı; BV: basit virilizan; NK: non-klasik; del: delesyon; konv: konversiyon; 8 bp del: 8bp delesyon; b17OH: bazal 17 hidroksiprogesteron.



Şekil 2: Tüm KAH-lı vakaların hastalık tipine göre dağılımı.

Tablo 15: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği olgularının hastalık tipi ve cinsiyete göre dağılımı

Tip	Erkek (XY)	Dişi (XX)	Toplam	Erkek/kız oranı
Tuz Kaybettiren	7	8	15	1: 1.1
Basit virilizan	3	12	15	1:4
Non-klasik	0	7	7	
Toplam	10	27	37	1:2.7



Şekil 3: Yirmi bir hidrosilaz eksikliği olan XX ve XY vakalarının hastalık tipine göre dağılımı

Tablo 16: Kardeş olan 21-hidroksilaz eksikliği tanımlı hastalarımızın genotip ve fenotip özellikleri

No	KARYOTİP	FENOTİP	GENOTİP
1	XX	BV	IVS2/IVS2
	XX	BV	IVS2/IVS2
2	XX	BV	I172N/I172N
	XY	BV	I172N/I172N
3	XX	TK	Q318X/Q318X
	XY	TK	Q318X/Q318X
4	XX	TK	IVS2/IVS2
	XY	BV	IVS2/IVS2

BV: basit virilizan; TK: tuz kaybettiren.

Genetik bulgular.

Çalışmamızda, 37 hastanın 74 alleli tanımlandı. Yirmi bir hidroksilaz eksikliği olan 37 hastanın mutasyon sıklığı Tablo 17 ve şekil 4’de gösterilmektedir.

Yirmi dört hasta (%64.9) homozigot ve 13 hasta (%35.1) bileşik heterozigot idi.

Büyük gen delesyonu 11 allelde (%14.7) ve büyük gen konversiyonu 9 allelde (%12.1) saptandı.

Nokta mutasyonları 51 allelde (%68.9) saptandı.

En sık saptanan nokta mutasyon IVS2 olup, sıklığı %28.3 (21/74) olarak saptandı.

IVS2 mutasyonundan sonra en sık görülen nokta mutasyonlar sırasıyla I172N (13allel, %17.6), V281L (8 allel, %10.8) ve Q318X (7 allel, %9.6) saptandı.

P30L mutasyonu %1.4 (1allel), Y59N mutasyonu %1.4 (1allel) ve 8pb del. mutasyonu %2.7 (2 allel) oranında saptandı.

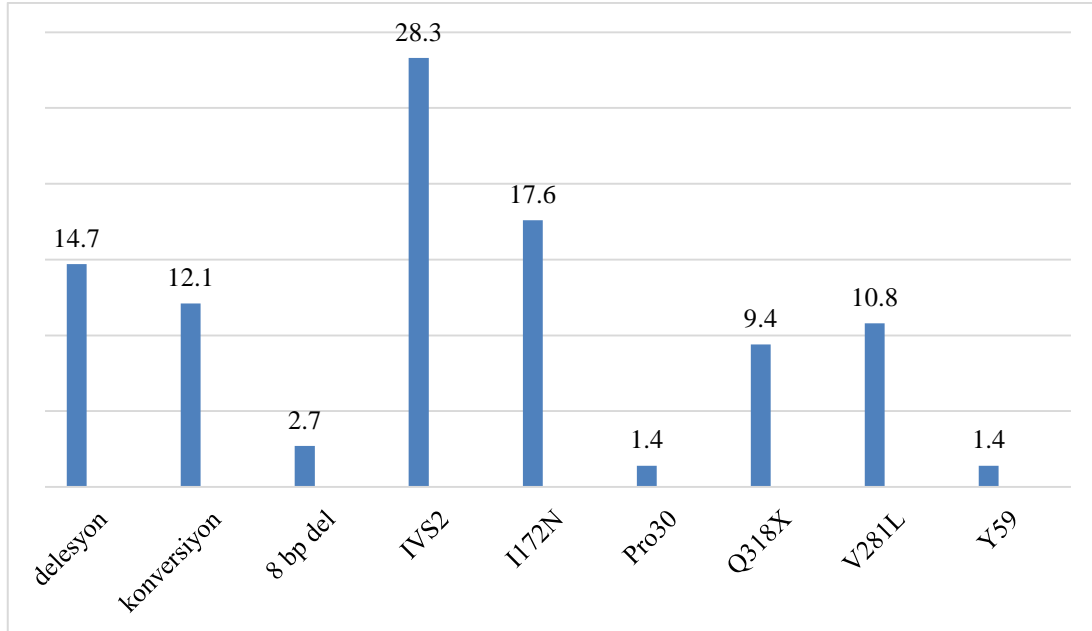
Hem tuz kaybettiren formda, hem de basit virilizan formda en sık saptanan mutasyon IVS2 mutasyonu olup, allel sıklığı her bir form için sırasıyla %30 ve %40 olarak saptanmıştır. Tuz kaybettiren form hastalarda IVS2 mutasyonundan sonra en sık görülen mutasyon büyük gen delesyonu (%26) oldu (Şekil 5). Basit virilizan form hastalarda IVS2 mutasyonundan sonra sık görülen mutasyonlar I172N (%33,3) oldu (Şekil 6). Non-klasik form hastalarda en sık saptanan mutasyon V281L olup, allel sıklığı %57 olarak saptandı (Şekil 7).

Tuz kaybettiren tip tanılı bir hastada bir allelde mutasyon saptanmadı.

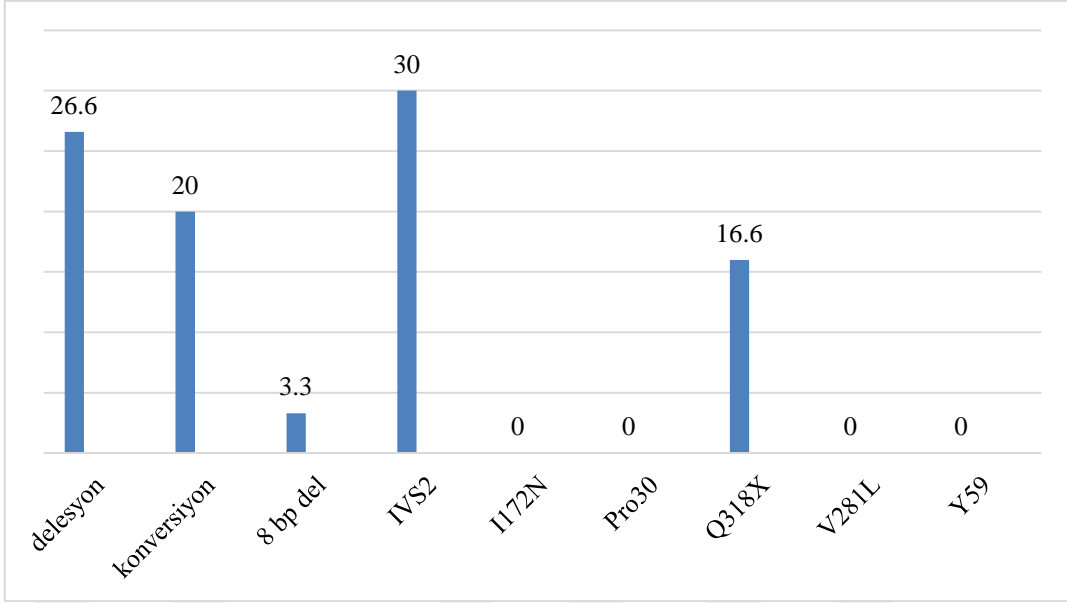
Tablo 17: Yirmi bir hidroksilaz eksikliği olan 37 hastanın 74 allelinde saptanan mutasyonların sıklığı

Mutasyon	TK n (%)	BV n (%)	NK n (%)	Total sayısı	Total sıklığı (%)
delesyon	9 (30)	12 (40)	0(0)	21	28.3
konversiyon	6(20)	3(10)	0(0)	9	12.1
8bp delesyon	1(3.3)	0(0)	1(7.1)	2	2.7
R356W	0(0)	0(0)	0(0)	0	0
Q318X	5(16.6)	2(6.7)	0(0)	7	9.4
IVS2-13 A, C>G	9(30)	12(40)	0(0)	21	28.3
I172N	0(0)	10(33.3)	3(27)	13	17.6
p.Pro 30 Leu	0(0)	0(0)	1 (7.1)	1	1.4
V281L	0(0)	0(0)	8 (57.1)	8	10.8
Y59N	0(0)	0(0)	1 (7.1)	1	1.4
Mutasyon saptanmadı	1(3.3)	0(0)	0(0)	1	1.4
Toplam	30 (100)	30 (100)	14 (100)	74	100

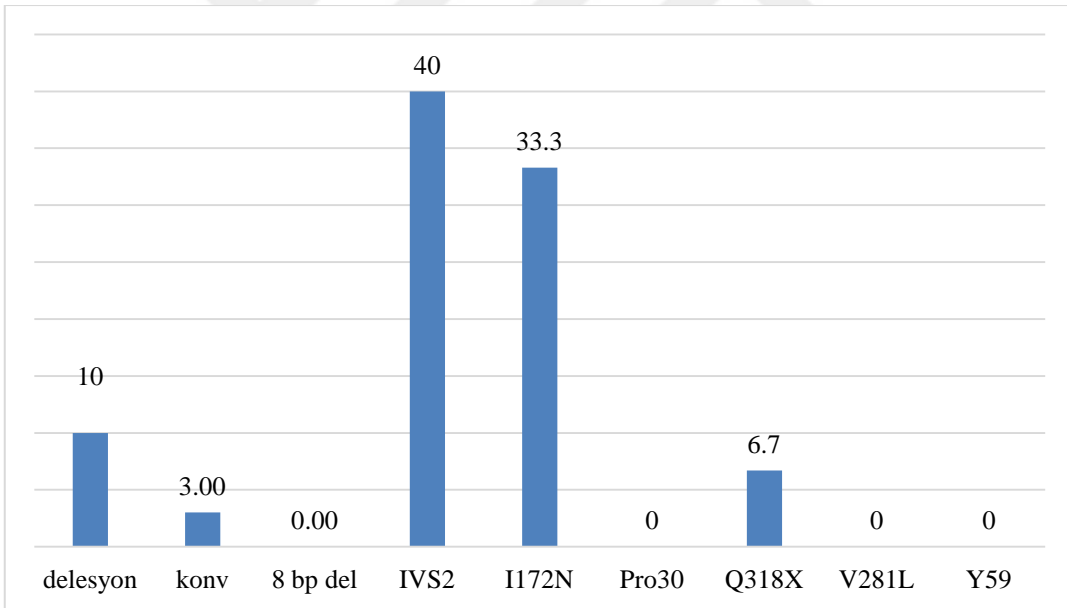
TK: tuz kaybettiren; BV: basit virilizan; NK: non-klasik.



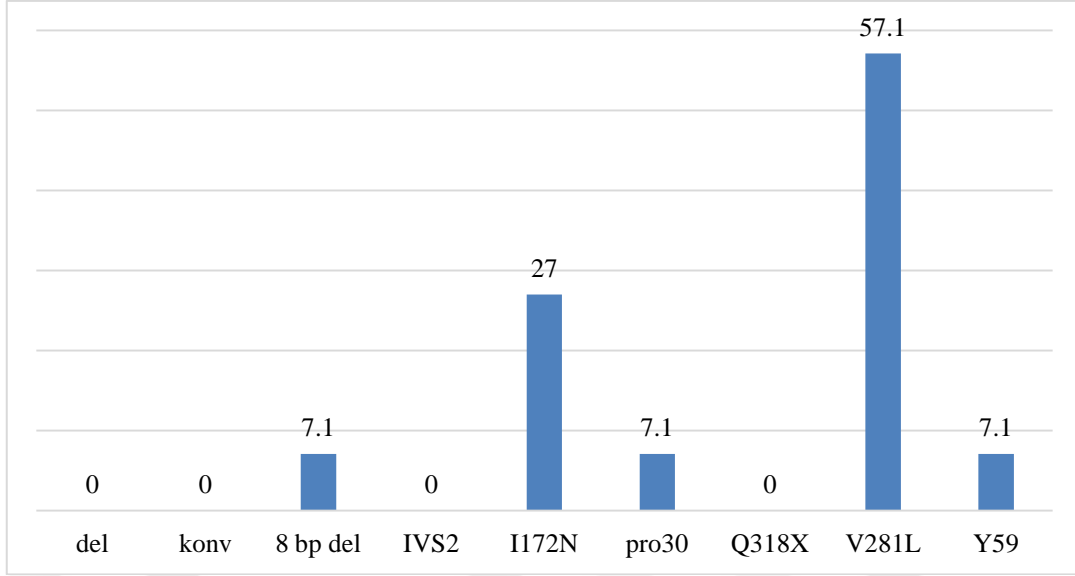
Şekil 4: Otuz yedi hastada CYP21 geninde rastlanan allel sıklıkları



Şekil 5: Tuz kaybettiiren formulu 15 KAH hastasında rastlanan patojen allel sıklıkları



Şekil 6: Basit virilizan formulu 15 KAH hastasında CYP21 geninde rastlanan patojen allel sıklıklar.



Şekil 7: Non-klasik formlu 7 KAH hastasında CYP21 geninde saptanan patojen allel sıklıkları.

Otuz yedi hastada 16 tip genotip saptandı. Genotip ve fenotipler Tablo 18’de gösterilmektedir. Tuz kaybettiren tip KAH vakalarında en sık saptanan genotip IVS2/IVS2 (%20) ve konv/konv (%20) genotipleridir. Basit virilizan tip KAH vakalarında sık saptanan genotip ise IVS2/IVS2 (%33.3) ve I172N/I172N (%33.3) genotipleridir. Non-klasik KAH vakalarında ise en sık görülen genotip V281L/V281L-dir (%42,8).

Genotip-fenotip uyumu.

Hasta genotipleri in vitro çalışmaları dayalı tahmini enzimatik aktivite düzeyine göre 4 gruba ayrıldı. Genotip, öngörülen ve bulunan fenotipler Tablo 18-de özetlendi. Genel genotip-fenotip uyumu %72.9 (27/37) saptandı. Grup 0’da 10 hastadan 2-si genotipine göre tuz kaybeden tip beklenirken basit virilizan KAH saptandı. Her iki allelde ağır tip mutasyona sahip (del/konv ve Q318X/konv) bileşik heterozigot iki hasta basit virilizan tip idi. A grubunda 12 hastadan 6’sı ve B grubunda 7 hastadan 5’i beklenen fenotiple (tuz kaybeden tip) uyumlu saptandı. A grubunda IVS2/IVS2 genotipli hastaların % 37.5’i (3/8) tuz kaybettiren tip, %62.5’i (5/8) ise basit virilizan tip saptandı. IVS2/del genotipli bileşik heterozigot bir hastada basit virilizan tip saptandı. B grubunda her iki allelde 172N mutasyonu ve bir allelde 172N, diğer allelde ağır tip mutasyon taşıyan hastaların %85-i (5/6) basit virilizan tip tanısı almıştır. Kalan %15 (1

hasta) hasta ise non-klasik tip tanılıdır. C grubunda olan 6 hasta non-klasik tip olup, beklenen fenotiple uyumlu saptandı. Mutasyon grupları için ppv hesaplandı: ppv 0: %80, ppv A: %50, ppv B: %85, ppv C: %100.

Tablo 18: Olgularımızda genotip-fenotip uyumu

Mutasyon Grubu (enzim aktivitesi)	Genotip	Öngörülen fenotip	TK	BV	NK	Hasta sayısı	Genotip-fenotip korelasyonu(ppv)	
0 (%0)	Del /Del	TK	2	0	0	2	%100	%80
	Konv/Konv		3	0	0	3	%100	
	Del/Konv		0	1	0	1	0	
	Q318X/Q318X		2	0	0	2	%100	
	Q318X/konv		0	1	0	1	%0	
	8bp del/del		1	0	0	1	%100	
A (%1)	IVS2/IVS2	TK	3	5	0	8	%37.5	%50
	IVS2/Q318X		1	0	0	1	%100	
	IVS2/Del		2	1	0	3	%66.6	
B (%1-2)	I172N/I172N	BV	0	5	1	6	%83.3	%85
	I172N/Q318X		0	1	0	1	%100	
C (%20-%50)	V281L/V281L	NK	0	0	3	3	%100	%100
	V281L/Y59N		0	0	1	1	%100	
	V281L/I172N		0	0	1	1	%100	
	P30L/ 8bp del		0	0	1	1	%100	
D	Del/saptanmadı		1	0	0	1	0	0

TK: tuz kaybı sendromu; BV: basit virilizan tip; NK: non-klasik tip; Del: delesyon; konv:konversiyon; 8bp del: 8 bp delesyon; ppv: positive predictive value

5. TARTIŞMA

Konjenital adrenal hiperplazi otozomal çekinik bir hastalık olduğundan eşit cinsiyet dağılımı beklenmektedir. Ancak çalışmamızda KAH olgularının %27'si (1/2.7) erkek olarak saptanmıştır. Klasik KAH grubunda erkek/kız oranı 1/2 saptanmıştır. Non-klasik tip grubunda ise erkek hasta yoktu. Vaka çalışmalarına dayanarak yapılan araştırmalarda Ercan ve arkadaşları (117) erkek/kız oranını 1/4.2 olarak, Kandemir ve arkadaşları (118) 1/4 olarak bildirilmiştir. KAH taraması yapılan İsveç'te ise bu oran 1/1.2 bildirilmiştir (119). Tarama programlarına dayanılarak yapılan Therrel ve arkadaşlarının (120) çalışmasında erkek/kız oranı 1.2/1 olarak bildirilmiştir. Bu bulgular erkeklerin tanı almadan kaybedildiğini akla getirmektedir (121, 122). Türkiye'de 2017 yılında yapılan KAH yenidoğan taraması pilot çalışmasının verilerine göre ise erkek/kız oranı 1.5/1 saptanmıştır (62). Bu da Türkiye'de daha önce bildirilen oranlardan çok farklıdır (118,119).

Akraba evliliği oranı Ercan ve ark. çalışmasında (117) %55, Kandemir ve ark. çalışmasında (118) %56,4, Baş ve ark. çalışmasında (93) %32, Sadeghi ve ark. çalışmasında (94) %56, bizim çalışmamızda ise %43.2 saptandı. Çalışmamızda saptanan akraba evliliği oranı Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarla benzerlik gösteriyordu.

Çalışmamızda 40 klasik ve non-klasik KAH olgusunun 3'ünde genotip belirlenememiştir. Genotipi belirlenen 37 hastanın 74 allelinin 73'ünde (%98.6) mutasyon saptanmıştır. Mutant allellerin içinde en yüksek oranda (%28.3) IVS2 mutasyonu saptanmıştır. Bu oranı %17.6 oranında I172N, %14.7 oranında büyük gen delesyonu, %12.1 oranında konversiyon, %10,8 oranında V281L, %9.6 oranında Q318X, %2.7 oranda 8-bp del, %1.4 oranında P30L, ve %1,4 oranında Y59N (sadece bir allel) mutasyonları takip etmektedir. 21-Hidroksilaz eksikliğine bağlı klasik KAH'da mutasyonların sıklıklarının saptanması için farklı toplumlarda bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırması Tablo 19' da özetlenmiştir.

Tablo 19: Çalışmamızda ve literatürdeki 9 en sık rastlanan mutasyon sıklıkları

Ülke	Allel sayı	del. %	konv. %	IVS2 %	I172 N %	V28 1L %	Q31 8X %	P30L %	8bp del. %	R35 6W %	E-6%
Bu çalışma	74	14.7	12.1	28.3	17.6	10.8	9.4	1.4	1.4	0	0
Baş ve ark.(93)	91	8.8	14.3	22.0	9.9	7.6	3.3	0	4.4	8.8	2.2
Tukel ve ark.(92)	62	9.6	22.5	22.5	11.4	0	8	0	3.2	9.6	3.2
Sadeghi ve ark.(94)	200	17	0	28.5	4	4.5	12.5	1.5	4	4.5	1
Krone ve ark.(90)	310	20.3	8.7	30.3	19.7	2.9	4.8	2.6	1.6	4.5	1.0
Stikkelbroek ve ark. (81)	370	31.9		28.1	12.4	2.2	3.5	0.3	4.3	8.4	3.0
New ve ark.(80)	3005	20.3		22.9	8.2	23.9	3.5	2.6	2.1	3.6	2.1

*New ve ark, Stikkelbroek ve ark. yaptığı çalışmada büyük gen delesyonu ve konversiyonu oranı birlikte gösterilmiştir.

Yirmi bir hidroksilaz eksikliğinde en sık rastlanan mutasyonlardan biri IVS2 mutasyonudur (2). Ülkemizde yapılan çalışmalarda bu mutasyonun görülme sıklığı % 22-28 civarındadır. Bizim çalışmada da IVS2 mutasyonu %28.3 allel sıklığı ile saptanan en sık mutasyon olmuştur. Ayrıca ABD, Almanya, İspanya, Meksika ve Japonya gibi bazı ülkelerde de IVS2 en sık saptanan mutasyon olarak bildirilmiştir (2).

Çalışmamızda IVS2 mutasyonundan sonra en sık görülen mutasyonlar sırasıyla I172N, büyük gen delesyonu, konversiyon ve V281L olup Türkiye’de ve dünyada yapılan diğer çalışmalarda da bizde olduğu gibi en sık görülen 4 mutasyon içine girmektedir (Tablo 19). Çalışmamızda P30L, 8bp del, Y59N mutasyonları ise en az görülen mutasyonlar olup, tüm allellerin % 5,4’ünü oluşturmaktadır.

Birinci ekzonda yer alan P30L mutasyonu non-klasik tip KAH hastalarında gözlenen bir mutasyon olarak tanımlanmakla birlikte görülme oranı düşüktür (Tablo 19). Ülkemizde yapılan iki çalışmada da bu mutasyon gözlenmemiştir (92,93). Sadeghi ve ark. çalışmasında (94) ise %1 oranında saptanmıştır. Bizim çalışmamızda bir non-klasik tip KAH hastasında sadece bir allelde belirlenmiş olup %1.4 oranında saptandı.

Diğer taraftan, üçüncü ekzonda bulunan ve 8 bazlık delesyon mutasyonu olan 8bp del mutasyonu da olgularımızda %1.4 oranında saptanmış olup, bu oran hem dünyada, hem de Türkiye’de yapılan çalışmalarla benzerlik göstermiştir (80, 81, 92, 93, 94).

Ayrıca çalışmamızda %1.4 oranında (bir allelde) Y59N mutasyonu saptandı. Türkiye’de yapılan diğer çalışmalarda bu mutasyon saptanmamıştır, ancak literatürde bildirilmiştir. İlk kez Tardy V. tarafından tanımlanmış olan bu mutasyon 2007’de saptanmıştır (123). Y59N mutasyonu enzimin hidrofobisitesini etkileyerek fonksiyon kaybına yol açmaktadır. CYP21A2’nin hidrofobik interaksiyonlarının kaybı protein stabilitesini ve ikincil strüktürlerin organizasyonunu bozduğu bildirilmiştir. Bu nedenle de tuz kaybettiren tiple ilişkili bulunmuştur (124). Bizim çalışmamızda non-klasik KAH olgunun bu mutasyon için heterozigot olduğu saptanmıştır. Hastalık ekspresyonunun şiddeti daha hafif etkilenen allelin aktivitesi tarafından belirlendiği için, V281L/Y59N genotipi beklendiği gibi non-klasik tiple uyumlu saptandı.

Dört no’lu tuz kaybı sendromlu hastada bir allelde mutasyon saptanmadı. Wilson ve ark. (125) sadece bir mutant allelin saptandığı iki kardeş bildirmişlerdir. Bu kardeşlerden bir tanesi tuz kaybı sendromu, diğeri basit virilizan tip KAH idi. Bu olgularda tek allelde babadan kalıtılan IVS2 mutasyonu saptanmıştır. Saptanan bu mutasyon A grubu, yani ağır mutasyondur. Bizim olgumuzda ise daha da ağır bir patoloji, yani 0 grubuna giren delesyon saptandı. Wilson ve ark. (125) olgularında anneden aynı kromozom kalıtılmasına rağmen annede ve her ikisinin maternal allelinde mutasyon saptanmamıştır. Bizim bu olgumuzda anne ve babanın genotipi araştırılmamıştır.

Krone ve ark. (90) da 3 hastalarında mutasyon saptamamışlardır. Bunlardan birinde bizim hastamızda olduğu gibi sadece bir allelde delesyon ve tuz kaybı sendromu vardı. Diğer hasta ise bir allelde I172N mutasyonuna sahip olup basit virilizan tip idi. Basit virilizan tip tanımlı üçüncü hastada ise her iki allelde mutasyon saptanmamıştır. Krone ve ark. (90) CYP 21 geninin tüm ekzon, intron ve promotor bölgede -450bp bölgeye kadar dizi analizi yapmalarına rağmen mutasyon saptanmamışlardır. Mutasyonun saptanmadığı durumda regülatör bölgeyi incelemek için -2000bp bölgeyi kapsayan dizi analizi yapılması gerektiğini bildirmişlerdir (90).

Araujo ve ark. (126) ise bir allelinde mutasyon saptanmayan 17 non-klasik klinik tanıli hastanın 2'sinde promotor bölgede mutasyon göstermiştir. Bu hastalardan birinde bir allelde V281L mutasyonu önceden saptanmış olup, diğer allelde -126C>T, -113G>A, -110T>C promotor mutasyonu saptanmıştır. Diğer hastada ise IVS2 mutasyonu bir allelde önceden saptanmış olup, diğer allelde promotor bölgede -126C>T saptanmıştır. Bu çalışmada CYP21A2 geninin -370 bp'lik promotor bölgesi araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak -350bp'lik promotor bölge çalıştırılmıştır.

Baş ve ark. (93) %15.4 allelde mutasyon saptanmamıştır. Bu oran bizim çalışmamızda %1.4'dür.

Yirmi bir hidroksilaz eksikliğinde en sık görülen 9 mutasyondan ikisi, R356W ve E6 küme mutasyonları ise çalışmamızda saptanmadı.

Genotip-fenotip ilişkisi

CYP21A2'deki mutasyon tipine göre, KAH hastalığının kliniği büyük değişkenlik göstermektedir. Fenotipin şiddeti, genellikle her iki allelde mevcut bulunan mutasyonlara bağlıdır. Genotip-fenotip korelasyonları hastalığın klinik seyrini öngörmeye yardımcı olabilir. Diğer taraftan aynı mutasyona sahip hastalarda farklı klinik tablolar da gelişebilir. Ağır ve hafif genotipler klinik açıdan öngörülebilir tablolara yol açarken, genetiğin orta derecede etkilendiği olgularda klinik tablo açısından yüksek oranda örtüşme söz konusu olabilir (2). Diğer taraftan, belli bir genotip için hangi formun gözlenebileceği öngörülerek hormonal tanının mümkün olmadığı KAH'nin prenatal tanısında yararlı olabilir. Ayrıca genotip verileri CYP21A2 mutasyonu için heterozigot olan ebeveynlerde normal hamilelik ya da tüp bebek uygulamaları öncesi genetik danışmada önem taşıyabilir.

Çalışmamızda ağır mutasyonları içeren 0 grubunda genotip-fenotip uyumu %80 (8/10 hasta) saptandı. Del/del, konv/konv ve Q318X/Q318X homozigot genotipe sahip 7 hastada da genotip öngörülen fenotiple uyumlu saptandı. Del/8bp del genotipli bileşik heterozigot hastada her iki allelde ağır tip mutasyon olduğundan, öngörülen fenotip tuz kaybettiren tipti ve genotiple fenotip uyumlu idi. Del/konv (hasta no. 33) ve Q318X/konv (hasta no.32) bileşik heterozigot genotipine sahip iki hastada ise her iki allelde ağır tip mutasyon olmasına rağmen basit virilizan tip saptandı. New ve ark. da

(80) del/konv genotipine sahip 2 hastada da basit virilizan tip saptamıştır. Lobato ve ark. ise (127) tuz kaybı sendromlu hastanın birinde Q318X/konv genotipi saptamıştır.

Bu çalışmada en az bir allelede IVS2 mutasyonuna sahip 12 hastada (grup A) genotip-fenotip uyumu %50 (6 hasta) saptandı. IVS2/del ve IVS2/IVS2 genotipli 6 hastada ise tuz kaybettiren tip beklenirken, basit virilizan tip saptandı. White ve ark. (77) IVS2 mutasyonunu, heterozigot ya da homozigot olarak, tuz kaybı vakalarının %22, basit virilizan KAH vakalarının %25 ve non-klasik KAH vakalarının %12'sinde saptamıştır. Wilson ve ark.'ın (125) çalışmasında IVS2/IVS2 genotipli 21 hastadan 19'unda tuz kaybı sendromu, 2'sinde ise basit virilizan tip saptanmıştır. IVS2/del genotipli 25 hastadan 24'ünde tuzkaybı sendromu, bir hastada ise basit virilizan tip saptanmıştır. Bu uyumsuzluğu IVS2 mutasyonunun değişken splicing'i (kırılma) ile ilişkilendirmiştir. New ve ark. (80) homozigot IVS2 mutasyonuna sahip 155 hastanın %92'sinde (143 hasta) tuz kaybı sendromu, %7'sinde (11 hasta) basit virilizan tip ve %0,7'sinde (1 hasta) non-klasik tip saptamıştır. IVS2 mutasyonunun kriptik "up-stream 3' splice" akseptörünü aktive ederek anormal kırılmaya neden olduğunu ve basit virilizan tip fenotipinin ise az sayıda transkriptin düzgün kırılmasına bağlı olabileceğini bildirmiştir. Bizim olgularımızda, genotip-fenotip uyumsuzluğunun daha yüksek oranda olduğunu gördük. Olgu sayımızın azlığı bu durumla ilişkili olabilir.

IVS2/IVS2 homozigot genotipine sahip kardeşlerin (hasta no. 5 ve 29) farklı fenotipe sahip olduğu saptandı. Beş no'lu hasta yenidoğan döneminde kuşkulu genitalya nedeniyle incelenerek, tuz kaybı sendromu tanısı almıştır. Hidrokortizon ve fludrokortizon tedavisi ile izlenmektedir. Kardeşi 29. no'lu hasta ise 2,5 yaşında, hızlı büyüme şikayeti ile tetkik edilerek basit virilizan tip tanısı almıştır. Hidrokortizon tedavisi ile izlenmektedir.

Pinto ve ark. (91) ve Speiser ve ark. da (79) çalışmalarında aynı genotipe, ancak farklı fenotipe sahip kardeşler bildirmiştir. Kardeş olsun yada olmasın aynı mutasyonu taşıyan bireylerde tuz kaybının farklı ağırlıkta olabileceği görülmüştür (28,29). Bu gözlemlerle ilgili açıklamalar henüz tam bilinmese de tuz kaybında hem genetik hem de genetik olmayan faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir. CYP21 tarafından kodlanmayan ek 21 hidrosilaz aktivitesinin ve androjen biyosentezinin ve androjene karşı duyarlılığın genetik varyasyonlarının androjen fazlalığı bulgularını

etkileyebileceği ve tuz kaybı bulgularında farklılıklara neden olabileceği bildirilmiştir (2).

B grubunda genotip-fenotip uyumu %85 saptandı. I172N mutasyonunun %2 enzim aktivitesine sahip olup, basit virilizan KAH'a neden olduğu ve tuz kaybına neden olmadığı gösterilmiştir (79). I72N/172N genotipli 6 hastadan 5'i basit virilizan iken, bir hastada non-klasik tip saptandı. Stikkelbroeck ve ark. (81) I172N/I172N genotipine sahip 4 hastanın 3'ünde non-klasik tip (beklenen klasik fenotip yerine) KAH saptamışlardır. Diğer taraftan, tersine, New ve ark. (80) I172N/I172N genotipine sahip 23 hastadan 21'inde basit virilizan tip, 2'sinde ise tuz kaybettiren tip saptamış ve bu uyumsuzluğa transkripsiyonel regülasyon veya protein translasyonundaki negatif değişikliklerin 21-OH enzim aktivitesinin azalmasına neden olabileceğini öne sürmüştür. Aynı çalışmada I172N/del genotipine sahip non-klasik tip bir hastada genotip-fenotip uyumsuzluğunu CYP21A2 allelinin hafif mutasyonlu bir duplikasyonu olabileceği ile ilişkilendirmiştir (80). I172N/Q318X genotipine sahip hastamız ise beklendiği gibi basit virilizan tipte idi.

C grubunda fenotip-genotip uyumu %100 saptanmıştır. Hafif mutasyon olarak tanımlanan V281L mutasyonunun, enzim aktivitesinin %20-50 oranına düşmesine ve non-klasik fenotipe neden olduğu bildirilmektedir (2). Bizim çalışmamızda da V281L/V281L genotipine sahip 3 hastada non-klasik tip saptandı. V281L/I172N, V281L/Y59N ve P30L/8bp-del genotipine sahip bileşik heterozigot genotipli 3 hastada da non-klasik tip saptandı. Diğer çalışmalarda da V281L mutasyonu ve C grubuna dahil diğer mutasyonların fenotip-genotip uyumunun yüksek olduğu bildirilmiştir (79,81,90,91). Sadeghi ve ark. (94) P30L mutasyonunu 2 hastada 3 allelde saptamışlardır; ancak bu araştırmacıların her iki hastası da basit virilizan KAH idi. P30L mutasyonu V281L mutasyonu gibi hafif mutasyon grubuna dahil edilse de, hem non-klasik, hem de virilizan tip hastalarda da saptanabileceği bildirilmiştir (80).

Çalışmamızda genotip-fenotip uyumsuzluğu 10 hastada saptandı. Tuz kaybettiren (14/15) ve non-klasik tip (6/7) KAH vakalarında fenotipin genotiple daha uyumlu, basit virilizan tip KAH vakalarında (6/15) ise daha az uyumlu olduğu görüldü. Bu bulgular literatürle uyumluydu (79, 80, 81, 88, 89, 90). Bu da, özellikle basit virilizan KAH için fenotipin sadece in vitro çalışmalara dayanarak belirlenen enzim aktivitelerine göre öngörülelemeyeceğini gösteriyor.

Genotip-fenotip ilişkisi ile ilgili çalışmalarda 0, A ve C mutasyon kategorileri birlikte alındığında genotip ve fenotip arasında iyi bir ilişki olduğu gösterilmiştir (79, 80, 89, 90, 91). Bizim alışmamızda genotip-fenotip uyumu %72.9 saptandı. Grup 0, B ve C’de genotip ve fenotip ilişkisi A grubuna göre daha iyi olduğu gösterildi ve 0, B ve C gruplarının toplam fenotip-genotip uyumu %87,5 bulundu. Grup 0’da genotip-fenotip uyumu % 80, grup B’de %85, grup C’de ise %100 saptandı (Tablo 10). A grubunda ise genotip-fenotip uyumsuzluğunun daha yüksek oranda (%50) olduğunu gördük. Olgu sayının azlığının bu durumla ilişkili olabileceğini düşündük.

KAH hastalarında genotip-fenotip değişkenliği için çeşitli faktörlerin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (29). Androjen reseptöründe CAG tekrarları uzunluğu (95, 96), P450 oksidoredüktaz enzimin yüksek polimorfizmi, RNA “splice” faktörlerinde kırpılma mutasyonları varyantları (97, 98) ve 21-hidroksilaz aktivitesine sahip sitokrom P450 tip II gibi başka proteinleri kodlayan diğer genler (99, 100) CYP21A2 mutasyonları dışında steroid etkisini veya tuz dengesini değiştirerek fenotipi etkileyebilir. Ayrıca, genetik analizde yeni mutasyonların araştırılmaması, eksik genotiplenme, 2 ve ya fazla mutasyona bağlı bileşik heterozigotluk da genotip-fenotip uyumsuzluğunu izah edebilir.

SONUÇLAR

- Klasik ve non-klasik 40 KAH hastamızın 37'sinde 74 allelin 73'ünde mutasyon belirlendi.
- Yirmi dört hasta (%64.9) homozigot ve 13 hasta (%35.1) bileşik heterozigot idi.
- Büyük gen delesyonu 11 allelde (%14.7) ve büyük gen konversiyonu 9 allelde (%12.1) saptandı.
- Nokta mutasyonları 51 allelde (% 68.9) saptandı.
- En sık saptanan nokta mutasyon IVS2 olup, sıklığı %28.3 (21/74) olarak saptandı.
- IVS2 mutasyonundan sonra en sık görülen nokta mutasyon sırasıyla I172N (13 allel, %17.6), V281L (8 allel, %10.8) ve Q318X (7 allel, %9.6) olarak saptanmıştır.
- P30L mutasyonu %1.4 (1allel), Y59N mutasyonu %1.4 (1allel) ve 8pb del mutasyonu %2.7 (2 allel) oranında saptandı.
- Y59N mutasyonu Türkiye'de ilk defa bildirildi. Olgu non-klasik KAH olgusu idi.
- Tuz kaybettiren form hastalarda IVS2 mutasyonundan sonra en sık görülen mutasyon büyük gen delesyonu (%26) idi.
- Basit virilizan form hastalarda da IVS2 mutasyonundan sonra sık görülen mutasyon I172N (%33,3) oldu.
- Non-klasik form hastalarda en sık saptanan mutasyon V281L olup, allel sıklığı % 57 olarak saptandı.
- Tuz kaybettiren tip tanılı bir hastada bir allelde mutasyon saptanmadı.
- Mutasyon grupları için ppv hesaplandı: ppv 0: %80, ppv A: %50, ppv B: %85, ppv C: %100 bulundu

- Basit virilizan tip (6/15) KAH olgularında fenotipin tuz kaybettiren tip (14/15) ve non-klasik tip (6/7) olgularına göre genotiple daha az uyumlu olduğu belirlendi.



7. KAYNAKLAR

1. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 181-92.
2. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *EndocrRev* 2000; 21:245-91.
3. Bongiovanni AM, Root AM 1963 The adrenogenital syndrome. *N Engl J Med* 268:1283–1289.
4. Van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2004;151Suppl 3: U71–5.
5. Nimkarn S, Gangshietti P.K, Yau M, New M.I, 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. *GeneReviews* 2016.
6. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of non-classical steroid 21-hydroxylase deficiency. *American journal of human genetics.* 1985; 37:650–67. [PubMed: 9556656]
7. Winters JL, Chapman PH, Powell DE, Banks ER, Allen WR, Wood DPJ 1996 Female pseudo hermaphroditism due to congenital adrenal hyperplasia complicated by adenocarcinoma of the prostate and clear cell carcinoma of the endometrium. *Am J Clin Pathol*106:660–664
8. Prader A 1954 Der genital befund beim pseudohermaphroditismus femininus der kengenitalen adrenogenitalen syndroms. *Helv Paediatr Acta* 9: 231–248
9. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW 1993 Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev*14: 577–593
10. Choong CS, Kempainen JA, Zhou ZX, Wilson EM 1996 Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol* 10: 1527–1535
11. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL 1994 The length and location of CAG trinucleotide repeats in the and rogen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucl Acids Res* 22: 3181–3186
12. Jaaskelainen J, Voutilainen R 1997 Growth of patients with 21hydroxylase deficiency: an analysis of the factors influencing adult height. *Pediatr Res* 41: 3033
13. Thilen A, Woods KA, Perry LA, Savage MO, Wedell A, Ritzen EM 1995 Early growth is not increased in untreated moderately severe 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr* 84: 894–898

14. Helleday J, Siwers B, Ritzen EM, Carlstrom K 1993 Subnormal androgen and elevated progesterone levels in women treated for Congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 933–936
15. Holmes-Walker DJ, Conway GS, Honour JW, Rumsby G, Jacobs HS 1995 Menstrual disturbance and hypersecretion of progesterone in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43: 291–296
16. Pertzelan A, Yalon L, Kauli R, Laron Z 1982 A comparative study of the effect of oestrogen substitution therapy on breast development in girls with hypo and hypergonadotrophic hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 16: 359–368
17. Schwarz HP, Jocham A, Kuhnle U 1995 Rapid occurrence of thelarche and menarche induced by hydrocortisone in a teenage girl with previously untreated congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Pediatr* 154:617–620
18. Lo JC, Schwitzgebel VM, Tyrrell JB, Fitzgerald PA, Kaplan SL, Conte FA, Grumbach MM. Normal female infants born of mothers with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 930–6
19. Gastaud F, Bouvattier C, Duranteau L, Brauner R, Thibaud E, Kutten F, Bougnères P. Impaired sexual and reproductive outcomes in women with classical forms of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 1391–6
20. Witchel SF. Management of CAH during pregnancy: optimizing outcomes. *Curr Op in Endocrinol Diabetes Obes*. 2012; 19: 489–96.
21. Ogilvie CM, Crouch NS, Rumsby G, Creighton SM, Liao LM, Conway GS. Congenital adrenal hyperplasia in adults: a review of medical, surgical and psychological issues. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006a; 64: 2–11
22. Merke DP, Chrousos GP, Eisenhofer G, Weise M, Keil MF, Rogol AD, Van Wyk JJ, Bornstein SR. Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patient with classic 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1362–8
23. Funder JW 1993 Aldosterone action. *Annu Rev Physiol* 55:115–130
24. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH 1997 Cortico steroid therapy in severe illness. *N Engl J Med* 337: 1285–1292
25. Globerman H, Rosler A, Theodor R, New MI, White PC 1988 An inherited defect in aldosterone biosynthesis caused by a mutation in or near the gene for steroid 11-hydroxylase. *N Engl J Med* 319: 1193–1197
26. Bornstein SR, Tajima T, Eisenhofer G, Haidan A, Aguilera G 1999 Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase deficient mice. *FASEB J* 13: 1185–1194

27. Whitehead FJ, Couper RT, Moore L, Bourne AJ, Byard RW 1996 Dehydration deaths in infants and young children. *Am J Forensic Med Pathol* 17: 73–78
28. Stoner E, Dimartino-Nardi J, Kuhnle U, Levine LS, Oberfield SE, New MI 1986 Is salt-wasting in congenital adrenal hyperplasia due to the same gene as the fasciculate defect? *Clin Endocrinol (Oxf)* 24: 9–20
29. Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI 1991 Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *N Engl J Med* 324: 145–149
30. Winkel CA, Casey ML, Worley RJ, Madden JD, Mac Donald PC 1983 Extra adrenal steroid 21-hydroxylase activity in a woman with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 104–107
31. Tukey RH, Okino S, Barnes H, Griffin KJ, Johnson EF 1985 Multiple gene-like sequences related to the rabbit hepatic progesterone 21-hydroxylase cytochrome P-450 1. *J Biol Chem* 260: 13347–13354
32. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 4205–14.
33. Escobar-Morreale HF, Sanchón R, San Millán JL. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 527–33.
34. Fanta M, Cibula D, Vrbíková J. Prevalence of nonclassic adrenal hyperplasia (NCAH) in hyperandrogenic women. *Gynecol Endocrinol.* 2008; 24: 154–7
35. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1997; 26: 853–91
36. Moran C, Azziz R, Carmina E. (2000). 21-Hydroxylase-deficient nonclassical adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*, 183: 1468-74.
37. Resnick SM, Berenbaum SA, Gottesman II, Bouchard TJ 1986 Early hormonal influences on cognitive functioning in congenital adrenal hyperplasia. *Dev Psychol* 22: 191–198
38. Nass R, Baker S 1991 Androgen effects on cognition: congenital adrenal hyperplasia. *Psycho neuroendocrinology* 16:189–201
39. Hampson E, Rovet JF, Altmann D 1998 Spatial reasoning in children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Dev Neuropsychol* 14: 299–320
40. Dittmann RW, Kappes MH, Kappes ME, Borger D, Stegner H, Willig RH, Wallis H 1990 Congenital adrenal hyperplasia. I: Gender-related behavior and attitudes

in female patients and sisters [published erratum appears in *Psychoneuroendocrinology* 1991; 16(4):369–71]. *Psychoneuroendocrinology* 15: 401–420

41. Dittmann RW, Kappes MH, Kappes ME, Borger D, Meyer-Bahlburg HF, Stegner H, Willig RH, Wallis H 1990 Congenital adrenal hyperplasia. II. Gender-related behavior and attitudes in female salt-wasting and simple-virilizing patients. *Psychoneuroendocrinology* 15:421–434
42. Berenbaum SA, Snyder E 1995 Early hormonal influences on childhood sex-typed activity and playmate preferences: implications for the development of sexual orientation. *Dev Psychol* 31:31–42
43. Berenbaum SA 1999 Effects of early androgens on sex-typed activities and interests in adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Horm Behav* 35:102–110
44. Nass R, Baker S 1991 Learning disabilities in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Child Neurol* 6:306–312
45. Donaldson MD, Thomas PH, Love JG, Murray GD, McNinch AW, Savage DC 1994 Presentation, acute illness, and learning difficulties in salt wasting 21-hydroxylase deficiency. *Arch Dis Child* 70: 214–218
46. Helleday J, Bartfai A, Ritzen EM, Forsman M 1994 General intelligence and cognitive profile in women with congenital adrenal hyperplasia (CAH). *Psychoneuroendocrinology* 19: 343–356
47. Merke DP, Fields J, Vaituzis AC, Chrousos GP, Giedd JN Children with classic CAH have decreased amygdala and normal hippocampal volume. Program of the 81st Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, CA, 1999 (Abstract P2–126)
48. Kuhnle U, Bullinger M 1997 Outcome of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Surg Int* 12: 511–515
49. Ravichandran R, Lafferty F, McGinniss MJ, Taylor HC 1996 Congenital adrenal hyperplasia presenting as massive adrenal incidentalomas in the sixth decade of life: report of two patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1776–1779
50. Umpierrez MB, Fackler S, Umpierrez GE, Rubin J 1997 Adrenal myelolipoma associated with endocrine dysfunction: review of the literature. *Am J Med Sci* 314: 338–341
51. Pignatelli D, Vendeira P, Cabral AC 1998 Adrenal incidentalomas: adrenal hemangioma in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *South Med J* 91: 775–779

52. Mokshagundam S, Surks MI 1993 Congenital adrenal hyperplasia diagnosed in a man during workup for bilateral adrenal masses. *Arch Intern Med* 153: 1389–1391
53. Norris AM, O’Driscoll JB, Mamtora H 1996 Macronodular congenital adrenal hyperplasia in an adult with female pseudohermaphroditism. *Eur Radiol* 6: 470–472
54. Dubey GK, Dotiwalla HH, Choubey BS, Kher A 1981 A case report of virilising adrenal cortical carcinoma. *J Assoc Physicians India* 29: 491–493
55. Bauman A, Bauman CG 1982 Virilizing adrenocortical carcinoma. Development in a patient with salt-losing congenital adrenal hyperplasia. *JAMA* 248: 3140–3141
56. Lightner ES, Levine LS 1993 The adrenal incidentaloma. A pediatric perspective. *Am J Dis Child* 147: 1274–1276
57. Bonaccorsi AC, Adler I, Figueiredo JG 1987 Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and the therapeutic results in three patients. *Fertil Steril* 47: 664–670
58. Clark RV, Albertson BD, Munabi A, Cassorla F, Aguilera G, Warren DW, Sherins RJ, Loriaux DL 1990 Steroidogenic enzyme activities, morphology, and receptor studies of a testicular adrenal rest in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1408–1413
59. Avila NA, Shawker TS, Jones JV, Cutler Jr GB, Merke DP 1999 Testicular adrenal rest tissue in congenital adrenal hyperplasia: Serial sonographic and clinical findings. *AJR Am J Roentgenol* 172:1235–1238601.
60. Walker BR, Skoog SJ, Winslow BH, Canning DA, Tank ES 1997 Testis sparing surgery for steroid unresponsive testicular tumors of the adrenogenital syndrome. *J Urol* 157: 1460–1463
61. Behrman, Kleigman, Stanton, St. Geme, Schor Nelson Textbook of Pediatrics 19th edition: 1930-1935
62. Guran T, Tezel B, Gürbüz F, Eklioğlu BS, Hatipoğlu N, Kara C, Şimşek E, Şahin N, Çizmecioglu FM, Alkan A, Özön A, Baş F, Özdemir G, Aydın M, Darendeliler F. 2018 Türkiye’de Konjenital Adrenal Hiperplazi Yenidoğan Taraması: 38.936 Bebeği Kapsayan Pilot Çalışma Verilerinin Değerlendirilmesi. XII Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diabet Kongresi bildiri kitabı: 61.
63. Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD 1987 Molecular characterization of the HLA-lined steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* 6: 1653–1661
64. Carroll MC, Campbell RD, Porter RR 1985 Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 521–525

65. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL 1985 Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1089–1093
66. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y 1986 Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2841–2845
67. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. (1988). Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:7486-90.
68. White PC, New MI, Dupont B 1984 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* 81: 7505–7509.
69. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI 1988 Characterization of recurrent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4436–4440
70. Donohoue PA, Van Dop C, McLean RH, White PC, Jospe N, Migeon CJ 1986 Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 995–1002
71. Dupont B, Oberfield SE, Smithwick EM, Lee TD, Levine LS 1977 Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet* 2: 1309–1312
72. Levine LS, Zachmann M, New MI, Prader A, Pollack MS, O'Neill GJ, Yang SY, Oberfield SE, Dupont B 1978 Genetic mapping of the 21-hydroxylase-deficiency gene within the HLA linkage group. *N Engl J Med* 299: 911–915
73. Weis RE, Refetoff S *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders*. 2010: 165-172.
74. Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J 1997 Tenascin-X deficiency is associated
75. Owerbach D, Crawford Y. M, Draznin M. B. Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Molec. Endocr.* 4: 125-131, 1990.
76. Mornet E, Crete P, Kuttann F, Raux-Demay M.-C, Boue J, White, P. C, 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.* 48: 79-88, 1991.
77. White P. C, Tusie-Luna M.T, New M. I, Speiser P. W. Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Hum. Mutat.* 3: 373-378, 1994.

78. Wedell A, Ritzen EM, Haglund-Stengler B, Luthman H 1992 Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7232–7236
79. Speiser PW, et al. (1992) Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90(2): 584–595.
80. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, Sun L, Zaidi M, Wilson RC, Yuen T. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 2611–6.
81. Stikkelbroeck N.M.M.L, Hoefsloot L.H, de Wijs I.J, Otten B.J, Hermus A.R.M. M, Sistermans E.A. 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. Endocr. Metab.* 88: 3852-3859, 2003.
82. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo P. G. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum. Genet.* 96: 198-204, 1995.
83. White P. C, Vitek A, Dupont B, New M. I. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 4436-4440, 1988.
84. Tusie-Luna M. T, Traktman P, White P. C. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J. Biol. Chem.* 265: 20916-20922, 1990.
85. Owerbach D, Sherman L, Ballard A.L, Azziz R. Pro453-to-ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. *Molec. Endocr.* 6: 1211-1215, 1992.
86. Helmberg A, Tusie-Luna M. T, Tabarelli M, Kofler R, White P. C. R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Molec. Endocr.* 6: 1318-1322, 1992.
87. Marino R et al. (2011) Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: Genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75(4): 427–435.
88. Finkelstein GP, et al. (2011) Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (1): E161–E172.
89. Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase

- (CYP21) deficiency: good correlation in a welldefined population. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 3293-3297, 1997.
90. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP (2000) Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, welldefined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 85(3): 1059–1065.
 91. Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, Morel Y, Brauner R. Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 2624-2633, 2003.
 92. Tükel T, Uygüner O, Wei JQ, Yüksel-Apak M, Saka N, Song DX, Kayserili H, Bas F, Günozü H, Wilson RC, New MI, Wollnik B. A novel semiquantitative polymerase chain reaction /enzyme digestion–based method for detection of large scale deletions/conversions of the CYP21 gene and mutation screening in Turkish families with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5893-5897.
 93. Bash F, Kayserili H, Darendeliler F. CYP21A2 gene mutations in Congenital adrenal hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children. *J Clin Res Ped Endo* 2009; 1(3): 116-128
 94. Sadeghi F, Kutlay NY, Berberoğlu M, Cetinkaya E, Aycan Z, Kara C, Ruhi HI, Ocal G, Şıklar Z, Elhan A, Tükün A. (2008). Identification of frequency of distribution of the nine most frequent mutations among patients with 21-hydroxylase deficiency in Turkey. *J Pediatr Endocr Met*, 21(8):781-787
 95. Kaupert LC, Lemos-Marini SH, De Mello MP, et al. The effect of fetal androgen metabolism-related gene variants on external genitalia virilization in congenital adrenal hyperplasia. *Clinical genetics.* 2013; 84:482–8.
 96. Moura-Massari VO, Cunha FS, Gomes LG, et al. The Presence of Clitoromegaly in the Nonclassical Form of 21-Hydroxylase Deficiency Could Be Partially Modulated by the CAG Polymorphic Tract of the Androgen Receptor Gene. *PLoS one.* 2016; 11: e0148548.
 97. Buchner DA, Trudeau M, Meisler MH. SCN11, a putative RNA splicing factor that modifies disease severity in mice. *Science.* 2003; 301:967–9.
 98. L'Allemand D, Tardy V, Gruters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4562–7.
 99. Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, Cohen JB. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:4081–8.

100. Miller WL. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:1304.
101. New MI, Gertner JM, Speiser PW, del Balzo P 1988 Growth and final height in classical and nonclassical 21- hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Jpn* 30: 79–88
102. Young MC, Ribeiro J, Hughes IA 1989 Growth and body proportions in congenital adrenal hyperplasia. *Arch Dis Child* 64:1554–1558
103. Cameron FJ, Tebbutt N, Montalto J, Yong AB, Zacharin M, Best JD, Warne GL 1996 Endocrinology and auxology of sibships with non-classical congenital adrenal hyperplasia. *Arch Dis Child* 74:406–411
104. Lee MM, Donahoe PK 1993 Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* 14:152–164
105. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS 1995 Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives [published erratum appears in *Endocr Rev* 1995 Aug;16(4): *Endocr Rev* 16: 271–321
106. Laue L, Merke DP, Jones JV, Barnes KM, Hill S, Cutler Jr GB 1996 A preliminary study of flutamide, testolactone, and reduced hydrocortisone dose in the treatment of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3535–3539
107. White PC, Mune T, Agarwal AK 1997 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev* 18: 135–156
108. Kageyama Y, Kitahara S, Tsukamoto T, Tsujii T, Goto S, Oshima H 1995 Chlormadinone acetate as a possible effective agent for congenital adrenal hyperplasia to suppress elevated ACTH and antagonize masculinization. *Endocr J* 42: 505–508
109. Van Wyk JJ, Gunther DF, Ritzen EM, Wedell A, Cutler Jr GB, Migeon CJ, New MI 1996 The use of adrenalectomy as a treatment for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3180–3190
110. Pescovitz OH, Comite F, Cassorla F, Dwyer AJ, Poth MA, Sperling MA, Hench K, McNemar A, Skerda M, Loriaux DL 1984 True precocious puberty complicating congenital adrenal hyperplasia: treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone analog. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 857–861
111. David M, Forest MG 1984 Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 105: 799–803
112. Evans MI, Chrousos GP, Mann DW, Larsen JWJ, Green I, Mc-Cluskey J, Loriaux DL, Fletcher JC, Koons G, Overpeck J 1985 Pharmacologic suppression of the fetal adrenal gland *in utero*. Attempted prevention of abnormal external genital

- masculinizationin suspected congenital adrenal hyperplasia. *JAMA* 253: 1015–1020
113. Speiser PW, Laforgia N, Kato K, Pareira J, Khan R, Yang SY, Whorwood C, White PC, Elias S, Schriock E, Simpson JL, Taslimi M, Najjar J, May S, Mills G, Crawford C, New MI 1990 First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Clin Endocrinol Metab* 70: 838–848
 114. Migeon CJ 1990 Editorial: Comments about the need for prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 836–837
 115. Pang S, Pollack MS, Marshall RN, Immken L 1990 Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency *N Engl J Med* 322: 111–115
 116. Forest MG, Morel Y, David M 1998 Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 9: 284–289
 117. Ercan O, Hatemi S. Konjenital adrenal hiperplazili 75 olgumuzun değerlendirilmesi. *Turk Pediatri Ars* 2000; 35: 1.
 118. Kandemir N, Yordam N. Congenital adrenal hyperplasia in Turkey: a review of 273 patients. *Acta Paediatr.* 1997; 86(1): 22-25.
 119. Thilen A, Larsson A. Congenital Adrenal Hyperplasia in Sweden 1969-1986 Prevalence, Symptoms and Age at Diagnosis. *Acta Paediatr Scand* 1990; 12;511-512
 120. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001; 30(1): 15-30.
 121. White PC. Optimizing newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Paediatr.* 2013; 163: 10-2.
 122. White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol.* 2009; 5: 490-8.
 123. Tardy VT, Morel Y. Gene symbol: CYP21A2. *Hum Genet.* 2007 Apr; 121 (2): 294
 124. Haider S, et al. (2013) Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 2611–2616.
 125. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI (1995) Steroid 21-hydroxylase deficiency: Genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80(8): 2322–2329.

126. Araújo RS, Mendonca BB, Barbosa ÂS, Lin CJ, Marcondes JAM, Billerbeck AEC, Bachega TASS. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4028-4034.
127. Lobato MN, Ordonez-Sanchez ML, Tusie-Luna MT, Mesequer A. Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: Identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. *Hum Hered* 1999; 49: 169-175.

