

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jana Chrudimská

Studium polymorfismů luteinizačního hormonu a jeho receptoru ve vztahu k rozvoji
ovariálního hyperstimulačního syndromu

Study of luteinizing hormone's and its receptor's polymorphisms in relation to development of
ovarian hyperstimulation syndrome

Bakalářská práce

Školitel: Doc. MUDr. Milan Macek St. Csc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2011

Jana Chrudimská

Poděkování:

Děkuji svému školiteli, Doc. MUDr. Milanu Mackovi St. Csc., za cenné rady a odborné konzultace. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Křenkové za trpělivost a podporu při psaní bakalářské práce a RNDr. Marii Kočové CSc. za ochotu odpovídat na množství otázek souvisejících s psaním práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk	2
Abstrakt	3
Abstract	4
1. Úvod	5
2. Ovariální hyperstimulační syndrom	7
2.1 Klasifikace a příznaky OHSS	7
2.1.1 Klasifikace OHSS dle závažnosti s uvedením příznaků	7
2.1.2 Klasifikace OHSS dle doby projevení syndromu	9
2.1.3 Klasifikace OHSS jako syndrom břišního přetlaku	9
2.2 Rizikové faktory OHSS	9
2.3 Léčba OHSS.....	10
2.4 Patogeneze OHSS	10
3. Gonadotropiny a jejich receptory	12
3.1 Struktura a funkce gonadotropinů.....	13
3.1.1 Folikuly stimulující hormon.....	13
3.1.2 Luteinizační hormon	14
3.1.3 Lidský choriový gonadotropin	15
3.2 Gonadotropinové receptory	15
3.2.1 Receptor folikuly stimulujícího hormonu	16
3.2.2 Receptor luteinizačního hormonu	17
4. Gonadotropiny a rozvoj OHSS	18
4.1 Polymorfismy receptoru luteinizačního hormonu	21
4.2 Polymorfismy luteinizačního hormonu	24
4.2.1 α podjednotka	24
4.2.2 β podjednotka	25
5. Závěr	28
6. Seznam použité literatury	29

Seznam použitých zkratek

AC	adenylate cyclase	adenylát cykláza
AMP	adenosin monophosphate	adenosin monofosfát
ARDS	acute respiratory distress syndrome	syndrom dechové tísně
ART	assisted reproductive technology	techniky asistované reprodukce
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosin monofosfát
COH	controlled ovarian hyperstimulation	kontrolovaná hyperstimulace ovárií
FSH	follicle stimulating hormone	folikuly stimulující hormon, folitropin
FSH-R	follicle stimulating hormone receptor	receptor folikuly stimulujícího hormonu
GnRH	gonadotropin-releasing hormone	gonadotropiny uvolňující hormon
GPCR	G-protein coupled receptor	receptor spřažený s G-proteiny
G-protein	guanine nucleotide regulatory protein	regulační protein obsahující guanin
hCG	human chorionic gonadotropin	lidský choriový gonadotropin
insLQ	insertion of leucine and glycine	inzerce leucinu a glycinu
IVF	in vitro fertilization	in vitro fertilizace
LH	luteinizing hormone	luteinizační hormon, lutropin
LH/hCG-R	luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor	receptor pro luteinizační hormon a lidský choriový gonadotropin
LH-R	luteinizing hormone receptor	receptor luteinizačního hormonu
LH β	β subunit of luteinizing hormone	β podjednotka luteinizačního hormonu
LRR	leucine-rich-repeats	opakující se oblasti bohaté na leucin
OHSS	ovarian hyperstimulation syndrome	ovariální hyperstimulační syndrom
PCOS	polycystic ovary syndrome	polycystický ovariální syndrom
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
Stp.	Stop codon	stop kodón, terminační kodón
TM	transmembrane domain	transmembránová doména
TSH	thyroid-stimulating hormone	thyreotropin
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
v-LH β	variant β subunit of luteinizing hormone	variantní β podjednotka luteinizačního hormonu

Abstrakt

Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS) je iatrogenní komplikací asistované reprodukce (ART), která může ohrozit život pacientky. Je způsobený zvýšenou citlivostí ovariálních receptorů na exogenní gonadotropiny při kontrolované ovariální hyperstimulaci (COH), která je nezbytná pro uvolnění více než jednoho oocyty. Léčba tohoto syndromu je symptomatická, proto je důraz kladen hlavně na prevenci. Cílem současné reprodukční genetiky je najít rizikové markery, pomocí nichž by bylo možné odhadnout citlivost hormonálního receptoru pro luteinizační hormon (LH-R) a receptoru pro folikuly stimulující hormon (FSH-R) ještě před započítím léčby. Individualizací COH by se snížilo riziko nejen OHSS, ale i riziko ukončení COH z důvodu příliš slabé odezvy ovárií. Prozatím jsou ve vztahu k zvýšenému riziku rozvoje OHSS a jeho závažnosti studovány pouze genotypy FSH-R. Cílem dalších studií bude zjistit možný vliv genotypu LH-R a luteinizačního hormonu (LH) na výslednou ovariální odpověď při COH a dalších typech hormonální léčby. Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o možné spojitosti polymorfismů LH a LH-R s OHSS v návaznosti na výsledky získané o FSH-R.

Klíčová slova:

ART, folikuly stimulující hormon, FSH receptor, in vitro fertilizace, luteinizační hormon, LH receptor, polymorfismy, ovariální hyperstimulační syndrom

Abstract

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is an iatrogenic complication in an assisted reproduction (ART), which can threaten the life of the patient. It is caused by an increased sensitivity of ovarian receptors to exogenous gonadotrophins during controlled ovarian hyperstimulation (COH) that is necessary for induction more than one oocyte. Treatment for this syndrome is symptomatic hence the emphasis is primarily on the prevention. The purpose of current reproduction genetics is to find risk markers, by which it could be possible to assess the sensitiveness of a hormonal receptor for luteinizing hormone (LH-R) and a receptor for follicle stimulating hormone (FSH-R) just before the start of the therapy. Individualization of the COH would decrease the risk of both, the OHSS, and the risk of canceling the COH through a poor ovarian response. Temporary, only FSH-R genotypes are studied in relation to an increased risk of OHSS and its severity. The aim of further studies is an ascertaining the possible impact of LH-R's and the luteinizing hormone's (LH) genotype on the final ovarian response during COH and other types of hormonal treatment. This bachelor's work summarizes the present knowledge of the possible connection of LH's and LH-R's polymorphisms to OHSS in continuum to findings gained about FSH-R.

Keywords:

ART, follicle stimulating hormone, FSH receptor, in vitro fertilization, luteinizing hormone, LH receptor, polymorphisms, ovarian hyperstimulation syndrome

1. Úvod

In vitro fertilizace (in vitro fertilization, IVF), neboli „oplození ve zkumavce“, patří mezi základní techniky asistované reprodukce (ART). Počátky IVF sahají do doby před více než 25 lety a od té doby se její metody neustále zdokonalují. Provádí se u párů, které mají z různých důvodů problémy s přirozeným početím dítěte, disfertilitou či infertilitou.

V České republice má problémy s neplodností přibližně 15% párů v reprodukčním věku a vzhledem k rozvoji „civilizačních chorob“, jako je nadměrný stres, nezdravá životospráva, kouření, užívání drog či genotoxických léků (např. cytostatika) a narůstání koncentrace hormonálních disruptorů v potravě a ve vodě (pseuoestrogeny) je pravděpodobné, že se toto číslo bude zvyšovat. Je proto zásadní, aby IVF probíhala co nejefektivněji a s co možná největším omezením všech možných komplikací.

IVF se skládá ze čtyř fází: hormonální stimulace, při které se ve vaječnicích vyvolá tvorba a zrání více Graafových folikulů najednou (běžně dozrává každý měsíc jeden folikul s jedním vajíčkem). Pro finální maturaci oocytů a indukci ovulace se většinou aplikuje lidský choriový gonadotropin (hCG). Po dosažení optimálního stupně vývoje folikulů následuje odběr vajíček (ovum pick-up) transvaginální punkcí vaječnicků jehlou a aspirace folikulární tekutiny s vajíčky pod ultrazvukovou kontrolou v krátkodobé narkóze. Získaná vajíčka jsou v laboratoři zkontrolována a opložena spermatem. Po několikadenní kultivaci (délka kultivace se liší dle použitého protokolu) jsou většinou 2-3 embrya přenesena tenkou kanylou do dělohy (embryotransfer). Kvalitní nadbytečná embrya jsou zamrzána v tekutém dusíku (kryoprezervována) pro pozdější použití.

Mezi nejčastější a nejzávažnější komplikace IVF patří ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS), který ve svých závažných stupních může ohrozit i život pacientky. Jeho přesná patogeneze není zcela objasněna. Současná léčba je symptomatická, proto je důraz kladen především na prevenci, k níž patří i genotypizace žen před kontrolovanou ovariální hyperstimulací (COH).

Jednou z možných příčin OHSS je zvýšená citlivost receptoru pro folikuly stimulující hormon (FSH-R) a pravděpodobně i receptoru pro luteinizační hormon (LH-R) a vlastního luteinizačního hormonu (LH). Díky polymorfismům v genech pro FSH-R, LH-R a LH je ovariální odezva zcela individuální. Stejná dávka gonadotropinu proto může být spojena u jedné pacientky se zvýšeným rizikem závažné formy OHSS, zatímco u jiné je spjata se sníženou citlivostí receptoru k COH. Oba případy mohou být důvodem k ukončení probíhající léčby. Ve snaze předejít nepřiměřené odpovědi na stimulaci se výzkum zaměřil na identifikaci faktorů, které sílu odezvy ovlivňují a mezi které patří i genetické markery. Molekulárně

genetická vyšetření genotypu podmiňujících citlivost hormonálních receptorů jsou jedním ze základů individualizace dávkování hormonální terapie ve snaze využít gonadotropiny ke snížení klinických komplikací a zvýšení jejich efektivity.

Mutace gonadotropinů a jejich receptorů jsou velmi vzácné a jsou příčinou disfertility/infertility u mužů i žen. Individuální variabilita je tak způsobena spíše genotypickými polymorfismy. Polymorfismy v gonadotropinech a jejich receptorech prokazatelně ovlivňují citlivost receptorů na hormonální stimulaci při COH, jak bylo prokázáno při studiu biologického významu polymorfismů FSH-R. Polymorfismus FSH-R v pozici 680 podmiňuje různou citlivost receptoru. Homozygot Asn680Asn je spojen se zvýšenou citlivostí receptoru, zatímco homozygot Ser680Ser podmiňuje sníženou citlivost.

Je pravděpodobné, že podobný vliv bude mít i LH a LH-R, což vzbudilo zájem i současné reprodukční genetiky.

Cílem této práce je shrnout známé poznatky o možném spojení polymorfismů LH a LH-R s OHSS v návaznosti na získané výsledky o FSH-R. Je možné předpokládat, že oba tyto polymorfismy mají vliv na míru odezvy ovárií a mohou tedy ovlivňovat výsledek IVF, třebaže výzkumy v této oblasti jsou teprve na počátku a první výsledky jsou spíše nejednoznačné.

2. Ovariální hyperstimulační syndrom

OHSS je závažná porucha spojená s patologickou reakcí na COH exogenními gonadotropiny, která je nezbytná k získání většího počtu folikulů pro úspěšnou IVF. Její výskyt u vysoce rizikových pacientek s hladinou estradiolu v krvi vyšší než 2500 pg/ml se pohybuje kolem 20% (Gera et al. 2010). Velmi vzácně se však OHSS může objevit i spontánně bez COH. V těchto případech je OHSS vždy spojen s těhotenstvím (AbuLouz, Ahmed and Swan 1997, Chae et al. 2001).

Výskyt OHSS v rámci všech IVF cyklů se pohybuje mezi 3,3% a 7,6% (Serour et al. 1998, Mathur et al. 2000, Gera et al. 2010). Rozmezí je poměrně široké i vzhledem k subjektivnímu hodnocení mírných forem OHSS lékaři. Přesto OHSS představuje zdaleka nejčastější iatrogení komplikaci spojenou s IVF.

Nejčastěji se jedná o mírnou formu OHSS, která u většiny žen do několika dní samovolně odezní. V některých závažných případech však může OHSS trvat déle a rozvinout se do stavu ohrožující život pacientky i plodu, pokud proběhlo umělé oplodnění úspěšně. Jsou známy i případy, kdy na OHSS a s ním spojené další komplikace pacientka zemřela (Serour et al. 1998, Memarzadeh 2010). Incidence závažné formy OHSS, která je spojená s hospitalizací pacientky v nemocnici, je však poměrně nízká – pohybuje se v rozmezí 1,7 – 4,2 % (Serour et al. 1998, Enskog et al. 1999, Wang et al. 2002, Papanikolaou et al. 2006).

2.1 Klasifikace a příznaky OHSS

2.1.1 Klasifikace OHSS dle závažnosti s uvedením příznaků

První detailní klasifikaci OHSS navrhl Rabau roku 1967 a založil ji na klinických a laboratorních nálezech (Rabau et al. 1967). Spolu s rozvojem transvaginální ultrasonografie, která umožnila měření velikosti folikulů, a nově vyvinutého postupu v měření koncentrace estradiolu v séru a progesteronu, byla původní klasifikace několikrát přepracována (Schenker and Weinstein 1978, Golan 1989, Navot, Bergh and Laufer 1992, Mathur 2005) a stále se vyvíjí (Golan and Weissman 2009a, Golan and Weissman 2009b, Mathur and Jenkins 2009).

Královská společnost porodníků a gynekologů (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists) ve své směrnici Green-top Guideline No.5 pro Spojené království Velké Británie a Severního Irska (RCOG 2006) doporučuje používat systém klasifikace od Mathura (Mathur 2005) s modifikovanou kategorií závažného stupně podle Navota (Navot et al. 1992), který ze závažného stupně vyděluje ještě 4. stupeň OHSS – kritický (tabulka č.1).

Klasifikace OHSS dle závažnosti	
Stupeň OHSS	Příznaky
Mírný	Zažívací obtíže Mírná bolest břicha způsobená zvětšenými ovárii Velikost vaječníků obvykle do 8 cm
Střední	Střední bolest břicha Nevolnost, zvracení Ultrasonografické známky ascitu Velikost vaječníků obvykle 8-12 cm
Těžký	Masivní ascites, někdy hydrothorax Oligurie Hemokontrace – hematokrit > 45% Hypoproteinemie Velikost vaječníků obvykle > 12 cm
Kritický	Těžký ascites s hydrothoraxem Hematokrit > 55% Počet leukocytů > 25 000/ml Oligurie/anurie Tromboembolické projevy Syndrom dechové tísně (ARDS)

Tabulka 1: Klasifikace OHSS dle závažnosti podle směrnice Green-top Guideline No.5 (RCOG 2006). OHSS je dynamický stav, který se v čase rozvíjí a plynule mění. Navíc se u pacientky mohou projevit pouze některé z obecně uznávaných příznaků, jejichž hodnocení je často velmi individuální (např. pacientčino ohodnocení míry bolesti břicha). To stěžuje možnosti jeho obecné klasifikace (převzato z RCOG 2006).

Ascites je způsoben zvýšenou permeabilitou nově vytvářených kapilár v ováriích. Extravaskulární tekutina z kapilár bohatá na proteiny (exudát) se akumuluje ve třetím prostoru a dále expanduje do dutin (břišní, pohrudniční, perikardiální). V závažných stavech OHSS velký objem ovárií a vysoká poloha bránice při ascitu přispívají k dušnosti pacientky, stejně jako pleurální či perikardiální exudát, což může vést až k syndromu dechové tísně (ARDS, acute respiratory distress syndrome), zároveň se může indukovat kaskáda hemodynamických procesů vedoucích k trombóze (hemokontrace), nedostatku albuminu v krvi, k celkové elektrolytické nerovnováze a selhání jater a ledvin díky hypoperfuzi orgánů (Schenker and Weinstein 1978, Gera et al. 2010).

2.1.2 Klasifikace OHSS dle doby projevení syndromu

Klasifikace OHSS podle doby nástupu syndromu je užitečná zejména pro určování prognózy dalšího vývoje stavu pacientky.

OHSS je možné rozdělit na časnou a pozdní formu syndromu. Časný OHSS se projeví do 10 dnů od odběru oocytů, zatímco pozdní OHSS nastupuje od 10. dne dále. Rozdíl mezi nimi spočívá především v rozdílné příčině syndromu. Potenciálním iniciátorem se zdá být hCG. Časný OHSS je vyvolán exogenním hCG, zatímco pozdní formy syndromu jsou vyvolány endogenním hCG z implantovaného embrya (Mathur et al. 2000).

Časný OHSS se také častěji vyskytuje u pacientek s diagnózou polycystického ovarialního syndromu (PCOS, polycystic ovarian syndrome) a jeho četnost roste s rostoucí hladinou estradiolu v séru (Mathur et al. 2000). Papanikolaou tuto formu syndromu dále spojuje s vyšším rizikem potratu (Papanikolaou et al. 2005).

Pozdní OHSS a se častěji rozvine až do těžké formy a jeho incidence je vyšší u vícečetných těhotenství (Mathur et al. 2000, Papanikolaou et al. 2005). Jsou ale dokumentovány dvě pacientky, u kterých se projevil pozdní OHSS, přestože nebyly těhotné, byly však léčeny dodatečným podáním hCG během luteální fáze (Papanikolaou et al. 2005).

2.1.3 Klasifikace OHSS jako syndrom břišního přetlaku

Grossmann přišel roku 2010 s novou myšlenkou, že vzhledem ke stejným příznakům OHSS a syndrom břišního přetlaku by měl být OHSS ve svých středně těžkých a závažných formách posuzován jako syndrom břišního přetlaku (Grossman et al. 2010).

2.2 Rizikové faktory

Americká společnost pro reprodukční medicínu (The American Society for Reproductive Medicine) ve svém edukačním přehledu uvádí následující rizikové faktory (ASRM 2008):

- PCOS
- výskyt OHSS v anamnéze pacientky
- nízký věk
- nízká tělesná váha
- vyšší dávka exogenních gonadotropinů při stimulaci
- vysoká absolutní hladina estradiolu v séru nebo její prudký nárůst

Většina těchto rizikových faktorů byla zjištěna empiricky, proto se o jejich spolehlivosti predikovat rozvoj OHSS vedou diskuse. Bez výhrad jsou všeobecně široce uznávané rizikové faktory pouze PCOS a předchozí epizody OHSS u pacientky (Wiser et al. 2005, Swanton et al. 2010).

V posledních letech se objevují i nové způsoby, jak odhalit zvyšující se riziko rozvoje OHSS u pacientky. Patří mezi ně stanovování koncentrace vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor) v den administrace hCG (Manau et al. 2007) a sledování hladiny Anti-Mülleriálního hormonu v bazálním séru (Nakhuda et al. 2006, Leeh et al. 2008). Tyto indikátory ještě potřebují validovat.

Dalším rizikovým faktorem pro rozvoj časně formy OHSS se u bělochů zdá být krevní skupina A (Binder et al. 2008b) a alergie, kterými signifikantně častěji trpěly pacientky, u kterých se rozvinula kritická forma OHSS (Enskog et al. 1999).

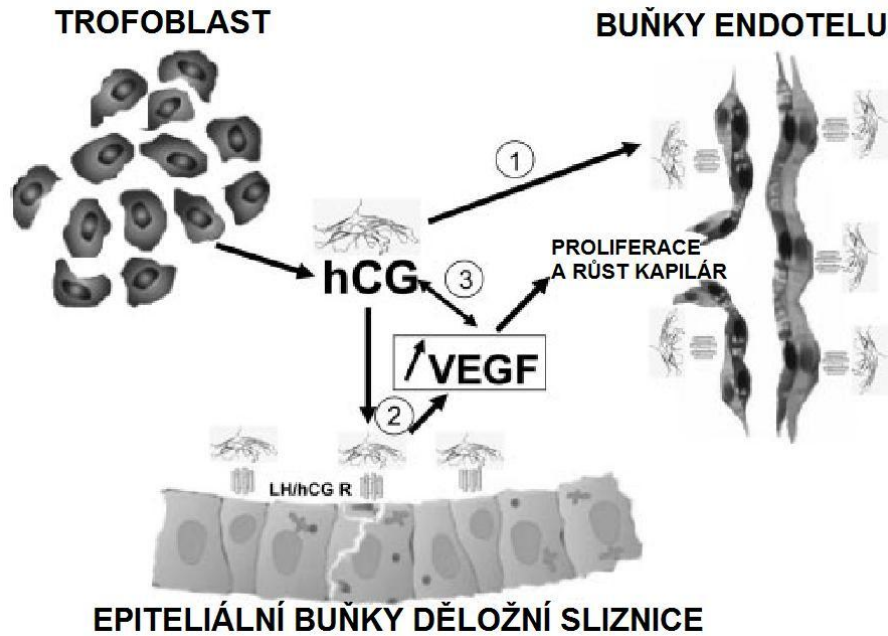
2.3 Léčba OHSS

Protože ještě není uspokojivě objasněn mechanismus vedoucí k rozvoji těžké a kritické formy OHSS, je léčba symptomatická. Velký důraz je proto kladen na informovanost obou partnerů a zkušenosti ošetřujícího lékaře, který by měl strategií COH individualizovat dle rizikových markerů a včas rozeznat zhoršující se příznaky syndromu případně a přerušit stimulaci a získané oocyty či embrya zamrazit.

2.4 Patogeneze OHSS

I přes intenzivní výzkum není přesná příčina OHSS zcela objasněna. K nejdůležitějším komponentám přispívajícím k rozvoji tohoto syndromu patří zvětšená ovária a akutní zvýšená kapilární permeabilita, může být však zahrnuta i porucha funkce renin-angiotensinového systému a další mechanismy.

Za hlavní příčinu zvýšené permeability kapilár při OHSS je považován VEGF (McClure et al. 1994), který běžně stimuluje proliferaci endotelu a angiogenezi (Levin et al. 1998). Hlavním zdrojem cirkulujícího VEGF v těle jsou vaječníky, které takto pravděpodobně pomáhají k vaskularizaci děložní sliznice a jejímu připravení na implantaci embrya (Wang et al. 2002). VEGF je tedy zásadní pro normální ovariální funkci. Pokud dojde k oplození, je VEGF spolu s hCG produkován trofoblastem a hraje klíčovou roli v synchronizaci angiogeneze mezi embryem a děložní sliznicí (obr. 1) (Berndt et al. 2006).



Obr. 1: hCG hraje klíčovou roli v synchronizaci trofoblastu, endotelu a epitelu děložní sliznice. Angiogenická aktivita hCG během implantace: 1) přímý efekt hCG přes interakci s hCG/LH receptory na povrchu endotelu na angiogenezi. 2) nepřímý efekt hCG na angiogenezi přes smyčku zahrnující zvýšenou produkci VEGF děložní sliznicí. 3) přídavný efekt hCG a VEGF ve stimulaci růstu kapilár (převzato z Berndt et al. 2006).

Lee s kolegy zaznamenal produkci signifikantního množství VEGF lidskými luteinizovanými granulózními buňkami, které byly přímo regulovány množstvím hCG. Zhoršení klinického průběhu OHSS v brzkém těhotenství tedy spojuje s podáním hCG a tím zvýšenou produkcí VEGF ze žlutého tělíska (Lee et al. 1997)

Časovou i dávkovou závislost exprese VEGF na hCG dokládá i Wang (Wang et al. 2002). Vysoká hladina VEGF v séru oproti kontrolám byla navíc pozorována u všech pacientek s těžkou formou OHSS (Abramov et al. 1997, Wang et al. 2002).

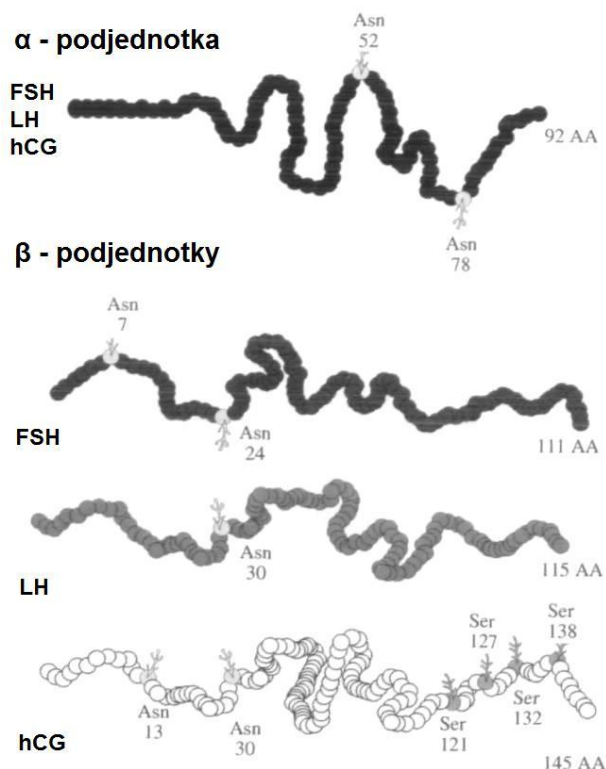
Zdá se tedy, že intenzita syndromu je spojena se stupněm ovariální odezvy na stimulaci. Hlavní roli nejspíše hraje hCG použitý k finální maturaci oocytů a indukci ovulace, který u některých pacientek reguluje nadprodukcí VEGF více folikuly a tím zvyšuje kapilární permeabilitu (Wang et al. 2002). Navíc některé studie ukazují, že produkce VEGF může být indukována nejen hCG, ale i LH a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) (Christenson and Stouffer 1997).

3. Gonadotropiny a jejich receptory

Luteinizační hormon patří mezi gonadotropinové hormony (gonadotropiny), což jsou hormony glykoproteinové povahy ovlivňující vývoj a činnost gonád (vaječníků, varlat), zrání pohlavních buněk a tvorbu pohlavních hormonů (steroidů).

Mezi gonadotropiny patří FSH (folikuly stimulující hormon), LH (luteinizační hormon) a hCG (lidský choriový gonadotropin). FSH a LH jsou v pulzech produkovány předním lalokem hypofýzy (podvěsku mozkového) pod vlivem gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH, Gonadotropin-releasing hormone) (shrnutí v Simoni, Gromoll and Nieschlag 1997, Buffet et al. 1998, Ciccone and Kaiser 2009), zatímco hCG je z hypofýzy produkován jen v malém množství (Cole, Khanlian and Muller 2008) a pochází převážně z placenty (shrnutí v Cole 2010).

Gonadotropiny spolu s thyreotropinem (TSH) patří mezi glykoproteinové hormony. Jsou to heterodimery skládající se ze společné α -podjednotky a unikátní β -podjednotky (obr. 2) (Ji, Grossmann and Ji 1998). Každá z podjednotek má dvě N-glykosilační místa. Glykosilace má vliv na stabilitu, bioaktivitu a životnost hormonu v oběhu (Fox, Dias and Van Roey 2001). Čtyři další O-vázané glykosilace na C-konci hCG mohou za delší poločas života hCG v plazmě a za jeho zvýšenou bioaktivitu oproti LH (Olijve et al. 1996).



Obr. 2: Schematické znázornění proteinové primární struktury a glykosilačních míst α a β podjednotek gonadotropinů s uvedením počtu aminokyselin jednotlivých podjednotek (převzato z Olijve et al. 1996).

Glykoproteinové hormony jsou největšími (30-40 kDa) a nejkompexnějšími ligandy receptorů spřaženými s G-proteiny (GPCR, G-protein = guanine nucleotide regulatory protein) (shrnutí v Ji et al. 1998).

3.1 Struktura a funkce gonadotropinů

Během cyklu začne svůj vývoj v ováriu ženy několik folikulů, z nichž velká většina zanikne díky apoptóze. Zůstane jen malé množství těch, které jsou schopné v dostatečné míře reagovat na FSH, které působí jako antiapoptotický faktor a zároveň podporuje jejich finální maturaci. FSH má tedy zásadní vliv na výběr a maturaci dominantního folikulu.

LH je nepostradatelný pro terminální maturaci preovulačních folikulů, syntézu androgenů a pro indukci vlastní ovulace. Dominantní folikul pod vlivem FSH konvertuje androgeny na estrogény včetně estradiolu, který působí na děložní sliznici a připravuje ji na implantaci. Po ovulaci dochází přes indukci exprese VEGF k migraci luteinizovaných granulózniích buněk, a to díky zvýšené expresi integrinů $\alpha_5\beta_1$ a $\alpha_5\beta_3$. To pomáhá vytvoření a udržení corpus luteum. Pro vznik a udržení corpus luteum je nezbytný také LH, který sekretuje progesteron a tím podporuje časnou fázi těhotenství a spolu s dalšími látkami se podílí i na synchronizaci vývoje děložní sliznice a oocyty (Piersma et al. 2007a, Rolaki et al. 2007 a shrnutí v Buffet et al. 1998).

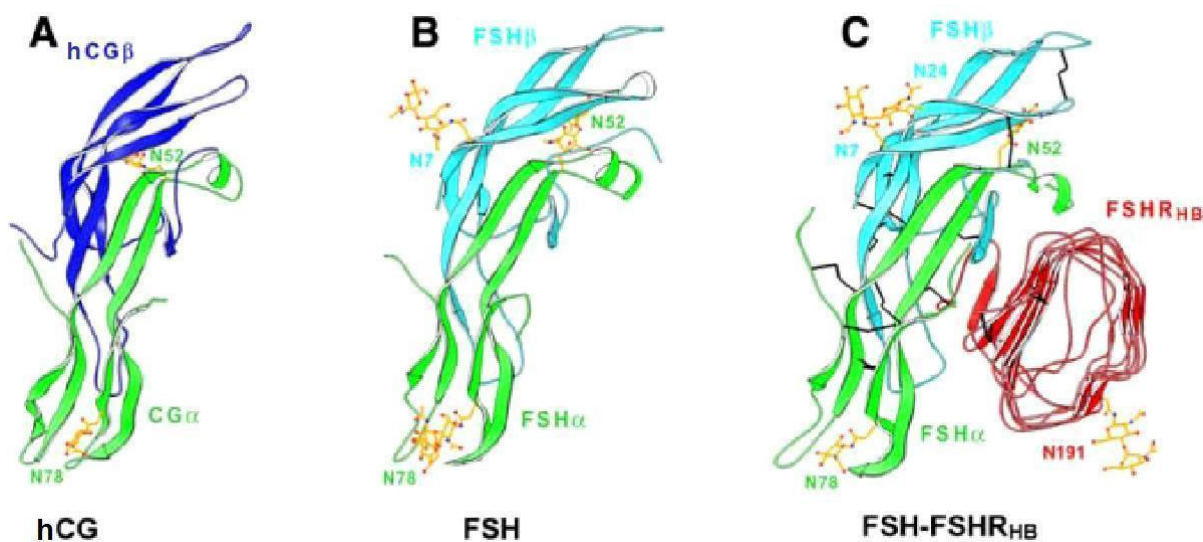
V rámci IVF programu se gonadotropiny využívají ke stimulaci růstu a maturace folikulů (Olijve et al. 1996, Yilmaz et al. 2010). Každá žena je k nim jinak citlivá, proto se předem těžko odhaduje přiměřená dávka k vyvolání potřebné stimulace (Mathur et al. 2000, Papanikolaou et al. 2006). Problémem je jak příliš slabá odezva ovárií, kdy se po stimulaci vyvine pouze několik málo folikulů (tři a méně), které mohou být následně odebrány pro IVF (Livshyts et al. 2009), tak i příliš silná odezva vedoucí k OHSS (Kaiser 2003).

3.1.1 Folikuly stimulující hormon

Krystalickou strukturu FSH (obr. 3B) se podařilo objasnit roku 2001. Získaná data potvrdila stavbu hormonu ze dvou podjednotek – α a β spojených S-S můstky. Obě podjednotky jsou si navzájem podobné a velmi pevně spolu asociují (obr. 3A a B) (Fox et al. 2001, Fan and Hendrickson 2005b). Krystalizace FSH spolu s hormon-vazebnou doménou FSH-R (FSH receptor) ukázala, že se na specifitě vazby hormonu na receptor podílí obě podjednotky hormonu (společná α i specifická β). Vzhledem k velké sekvenční podobnosti

glykoproteinových hormonů se předpokládá, že se všechny váží na své receptory stejným způsobem jako FSH (Fan and Hendrickson 2005b).

Molekuly FSH se váží na FSH-R. Ty jsou u žen exprimované v gonádách na povrchu folikulárních buněk (shrnuto v Simoni et al. 1997). Zde je FSH nezbytný pro terminální maturaci folikulů a zároveň chrání dominantní folikul před apoptózou (shrnuto v Simoni et al. 1997, Buffet et al. 1998).



Obr. 3: Krystalická struktura volného lidského hCG (A), volného lidského FSH (B) a lidský FSH vázaný na hormon-vazebnou doménu FSH-R (C). Žlutě jsou naznačeny karbohydráty, na obrázku vázaného FSH jsou černě S-S můstky (převzato z Fan and Hendrickson 2005a).

3.1.2 Luteinizační hormon

Izolace a kompletní aminokyselinové sekvence β -podjednotky LH byla objasněna již roku 1975 (Sairam and Li 1975), ale krystalizovat se LH ještě nepodařilo. Gen pro společnou α podjednotku je umístěn na 6. chromozomu (6q12.21), zatímco specifická β podjednotka LH je umístěna na 19. chromozomu (19q13.32) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

LH má společný receptor (LH-R) s hCG, proto je někdy LH-R také označován jako LH/hCG receptor (LH/hCG-R). Je exprimován na membránách granulózních buněk na povrchu preovulačních folikulů (shrnuto v Buffet et al. 1998), ale byl zjištěn i na mnoha různých buňkách mimo gonády – např. v lidské kůži (Pabon et al. 1996), v lidských nadledvinách (Chui et al. 2009) a na dalších místech (shrnuto v Ascoli, Fanelli and Segaloff 2002). Fyziologický význam LH-R na jiných místech než v gonádách je předmětem výzkumu (Chui et al. 2009, shrnuto v Ascoli et al. 2002).

V ženských gonádách je LH nezbytný pro finální maturaci folikulů, navození ovulace a následně pro vznik a udržení corpus luteum (žlutého tělíska), který sekretuje progesteron a tím podporuje časnou fázi těhotenství (shrnuto v Buffet et al. 1998).

3.1.3 Lidský choriový gonadotropin

Lidský hCG je velmi podobný LH a oba sdílí i společný receptor (LH-R nebo také LH/hCG-R). Největší rozdíl mezi LH a hCG je v poločasů života obou hormonů. LH obíhá v těle pouze 25-30 min, zatímco hCG v těle působí přibližně 37 hodin. Jak elegantně formuloval Cole, v mnoha ohledech je hCG „super LH“ produkované během těhotenství s 80x větší biologickou aktivitou než LH (shrnutí v Cole 2010).

Trojrozměrná struktura hCG (obr. 3A) ukazuje podobnou stavbu jako FSH – hCG se také skládá ze dvou topologicky velice podobných podjednotek spojených třemi S-S můstky (Lapthorn et al. 1994). Rozdíly mezi FSH a hCG byly při podrobnějším srovnání nalezeny zejména v β -podjednotce. Nalezené odlišnosti mohou být důležité zejména pro specifitu vazby hormonu na receptor a pro přenos signálu (Fox et al. 2001).

V těle ženy se hCG podílí na produkci testosteronu, stimulaci angiogeneze, podpoře spojení trofoblastu s placentou, modulaci imunitního systému, růstu placenty spolu s plodem v průběhu těhotenství, potlačování svalových kontrakcí v průběhu těhotenství a na dalších procesech (shrnutí v Cole 2010).

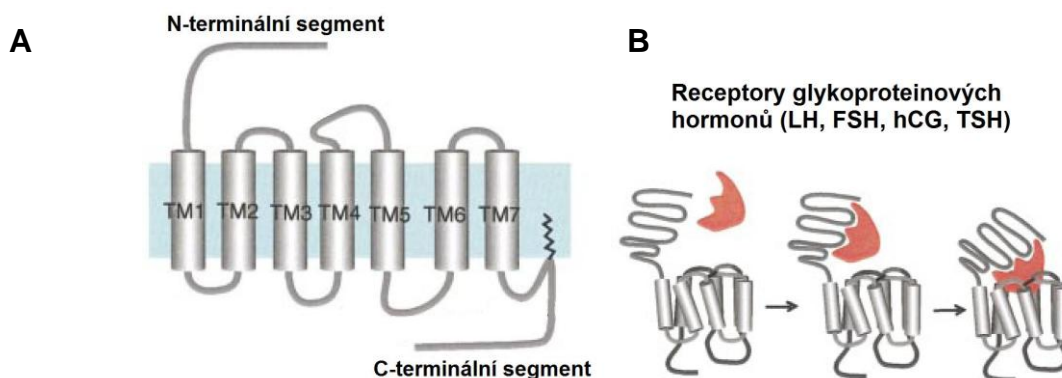
Jedna z nových studií dokládá biologickou funkci některých oligopeptidů odvozených od hCG. Vybrané oligopeptidy interferují s expresí některých genů a tím mohou zastavit závažné záněty, začátek diabetu typu I, selhání jater a tvorbu nádorů. Otevírá se možná cesta vývoje nových léků založených na regulačních oligopeptidech (Khan and Benner 2011).

3.2 Gonadotropinové receptory

Gonadotropinové receptory se řadí do malé skupiny GPCR, která se vyznačuje 8-9 opakujícími se oblastmi bohatými na leucin (LLR, leucine-rich-repeats) ve velké N-terminální doméně. Právě velkou extracelulární doménou s LRR se tyto receptory liší od běžných GPCR (Hsu 2003).

Receptory glykoproteinů (receptory pro FSH, LH, hCG a TSH) jsou si sekvenčně velice podobné (Minegishi et al. 1990, Sprengel et al. 1990), což ukazuje na jejich společný evoluční původ (Hsu 2003). Skládají se z velké extracelulární N-terminální domény s LRR, která zajišťuje vazbu hormonu, a z transmembránové domény podobné rodopsinu. Ta sestává ze 7 transmembránových α -helixů propojených smyčkami a z C-terminálního segmentu v cytoplazmě buňky, sloužícího k přenosu signálu (obr. 4).

Po vazbě hormonu na receptor projde N-terminální segment hormonu konformační změnou a následně interaguje i s exosmyčkou transmembránové domény receptoru, čímž generuje signál (shrnuto v Ji et al. 1998).

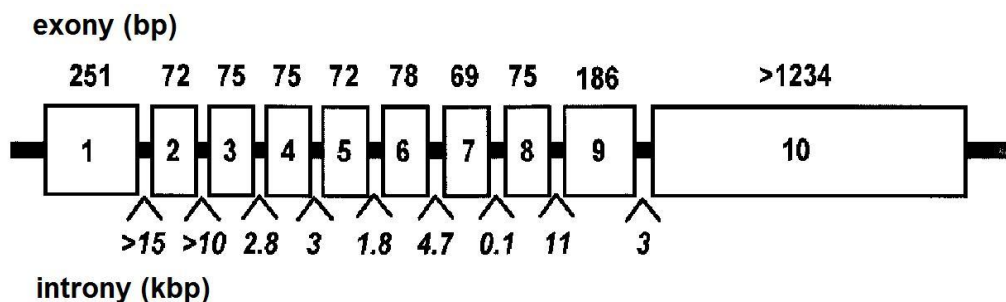


Obr. 4: Obecná stavba receptorů spřažených s G-proteiny (A). Glykoproteinové hormony, LH, FSH, hCG a TSH se váží na N-terminální segment receptoru. Hormon-vazebný segment s navázaným ligandem interaguje s exo-smyčkami transmembránové domény a generuje signál (B). TM označuje transmembránové domény (převzato z Ji et al. 1998).

Signál je přes G-proteiny přenášen dál a generuje tvorbu cAMP (cyklický adenosin monofosfát), který indukuje signalizační kaskádu. Zdá se, že FSH-R přes G-proteiny aktivuje pouze adenylát cyklázu, která vede k produkci cAMP (shrnuto v Simoni et al. 1997), zatímco LH-R pomocí G-proteinů aktivuje nejen adenylát cyklázu, ale i fosfolipázu C (shrnuto v Ascoli et al. 2002).

3.2.1 Receptor folikuly stimulujícího hormonu

Gen pro FSH-R se u lidí nachází na chromozomu 2p21 (Gromoll et al. 1994). Skládá se z 10 exonů a 9 intronů. Zatímco 1. - 9. exon kódují velkou extracelulární doménu, 10. exon kóduje C-terminální část extracelulární domény, transmembránovou i intracelulární doménu (obr. 5). Celkově je lidský gen pro FSH-R dlouhý 54 kbp a kóduje 695 aminokyselin, včetně signálního peptidu o délce 18 aminokyselin (Gromoll, Pekel and Nieschlag 1996).



Obr. 5: Organizace lidského genu pro FSH-R. Exony jsou naznačeny zarámováním. Velikost každého exonu je v pb napsána nad každým exonem, délka intronů je v kbp napsána pod introny (převzato z Simoni et al. 1997).

3.2.2 Receptor luteinizačního hormonu

Gen pro LH-R je u lidí lokalizován, stejně jako gen pro FSH-R, na chromozom 2p21 (Rousseau et al. 1990), což podporuje myšlenku, že se oba v evoluci vyvinuly ze společného předka (Hsu 2003). Celkově je gen pro LH-R dlouhý přes 70 kbp a skládá se z 11 exonů a 10 intronů. Prvních 10 exonů a část 11. exonu kóduje extracelulární doménu receptoru, zbylá část exonu 11 kóduje i zbývající části receptoru - transmembránovou a intracelulární doménu (Atger et al. 1995) Konečný protein pak obsahuje 699 aminokyselin (www.ncbi.nlm.nih.gov).

LH-R je v lidských luteinizovaných granulózních buňkách a corpus luteum exprimován ve čtyřech různých sestřihových variantách. Zkrácené varianty mohou určovat množství receptoru na buněčném povrchu a aktivitu plně dlouhého LH-R (Dickinson et al. 2009).

Např. LH-R bez 9. exonu má nejspíše fyziologický význam a díky alternativnímu sestřihu je produkován v ováriu zdravých žen s pravidelným menstruačním cyklem (Minegishi et al. 1997). Zkrácený LH-R je schopen v endoplazmatickém retikulu tvořit komplexy s nematurovaným standardním LH-R a redukovat tak jejich expresi na povrch buňky. Komplex takovýchto dvou receptorů je v lysozomu degradován (Nakamura et al. 2004). Sestřihová varianta LH-R bez exonu 9 je schopná modulovat aktivitu LH-R během menstruačního cyklu (Minegishi et al. 1997, Nakamura et al. 2004).

Oproti tomu varianty LH-R bez exonu 8 či 10 mají závažný vliv na fertilitu postižených jedinců (Laue et al. 1996, Gromoll et al. 2000). Zajímavý je případ muže s deletovaným 10. exonem. Tento pacient byl postižen hypogonadismem, avšak po léčbě hCG v dospělosti se jeho stav zlepšil a muž začal produkovat fertilní spermie. Exon 10 je zřejmě důležitý pro rozlišení receptoru mezi hCG a LH, přičemž v jeho nepřítomnosti není receptor schopen na LH reagovat. Díky mateřskému hCG produkovanému v těhotenství se tak vyvinuly normální mužské znaky plodu, LH však nebyl schopen stimulovat receptor během puberty (Gromoll et al. 2000).

4. Gonadotropiny a rozvoj OHSS

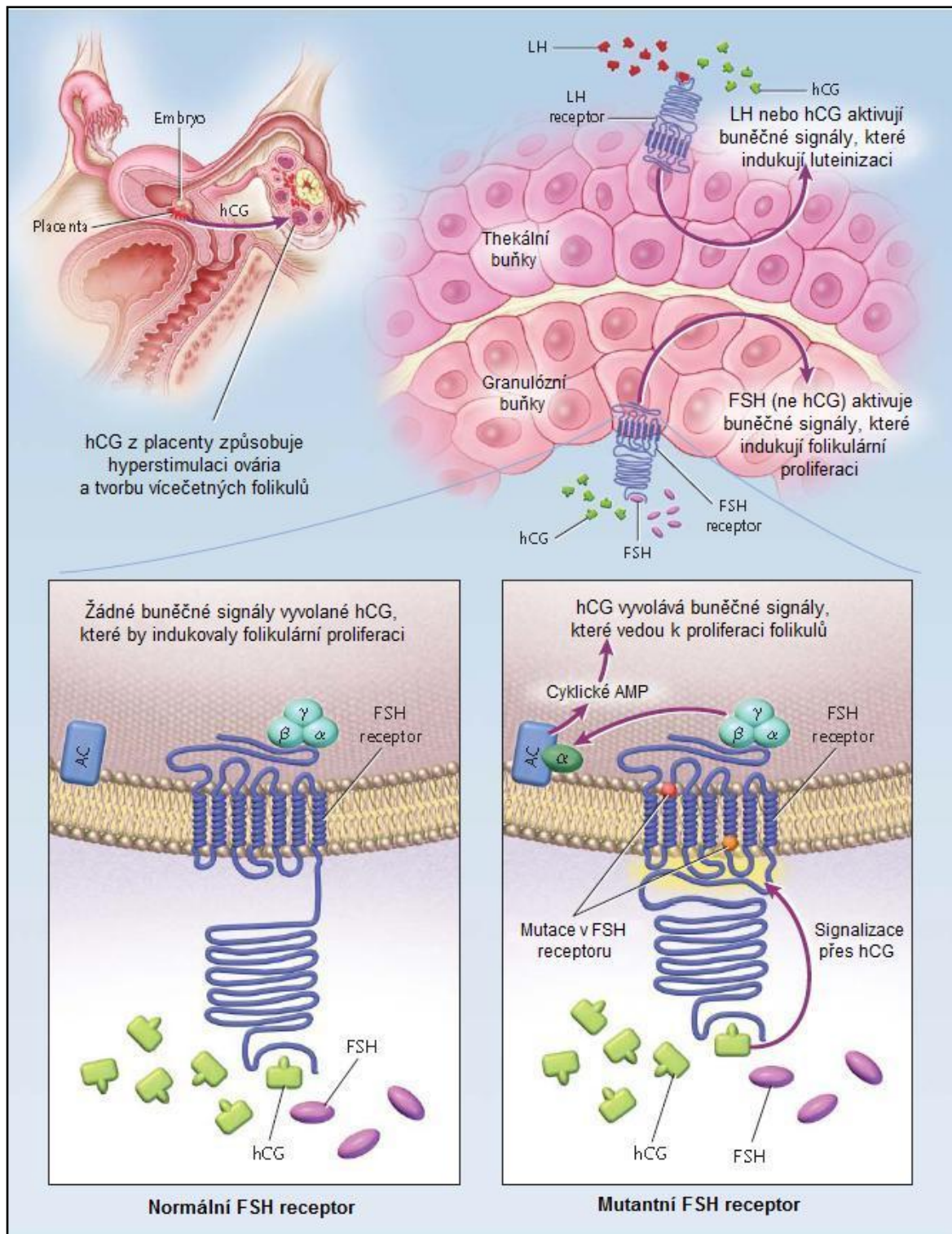
Gonadotropiny a jejich receptory hrají klíčovou roli ve vývoji pohlavních buněk i v průběhu těhotenství, včetně jeho počátečních fází. Pro úspěšnou implantaci trofoblastu a později i vývoj embrya je nezbytná extenzivní angiogeneze endometria v blízkosti místa implantace. Tvorba nových kapilár je stimulována trofoblastem ještě před implantací, a to přes systém zahrnující hCG a VEGF (obr. 1) (Berndt et al. 2006). VEGF je přitom v současnosti považován za hlavní, třebaže ne jedinou, příčinu zvýšené permeability kapilár přispívající k OHSS (McClure et al. 1994).

Rozvoj OHSS souvisí se stupněm ovariální odezvy na gonadotropiny. Známé rizikové faktory v současné době nejsou schopné vysvětlit, proč jsou některé ženy na jejich působení citlivější a OHSS se u nich rozvine a u jiných ne. Možným vysvětlením se zdají být genetické predispozice konkrétní ženy. Protože OHSS je výrazem přehnané reakce na gonadotropiny, jsou tyto hormony a jejich receptory dobrými kandidátními geny pro určování individuální citlivosti ženy na stimulaci (Kerkela et al. 2007). Tuto hypotézu navíc podpořilo spojení spontánní formy OHSS s aktivačními mutacemi Thr449Ile a Asp567Asn v FSH-R (obr. 6) (Kaiser 2003, Smits et al. 2003, Vasseur et al. 2003).

Naopak u žen, u kterých se rozvinula spontánní forma OHSS a neměly FSH-R mutovaný, mohla být přehnaná odezva ovárií způsobená abnormálně vysokou hladinou hCG v těle, v důsledku těhotenství. V těchto případech může být specifita FSH-R obejita právě vysokou koncentrací hCG (Kaiser 2003).

Iatrogenní forma OHSS se od spontánní ale liší. U iatrogenní formy se rozvoj a zvětšení více folikulů objeví díky stimulaci exogenními gonadotropiny. Oproti tomu u spontánní formy OHSS se symptomy objeví až později, díky stimulaci FSH-R pomocí hCG uvolňovaného během těhotenství. Je také možné, že se stimulace mutovaného receptoru objeví až po dosažení určité koncentrace hCG (Delbaere et al. 2004).

Aktivační mutace v genu pro FSH-R ale nevysvětlují všechny případy OHSS. Studium FSH-R genů 29 brazilských pacientek s iatrogenní formou OHSS v těchto genech neodhalilo žádnou mutaci. A přesto se u kontrolní skupiny 50 fertlních Brazilek, které byly vystaveny vysokým hodnotám hCG během těhotenství, OHSS nerozvinul (d'Alva et al. 2005). Příčina iatrogenní formy OHSS není přesně objasněna. Je ale pravděpodobné, že za individuální senzitivitu ke gonadotropinové stimulaci mohou spíše drobné rozdíly v genech pro gonadotropiny a jejich receptory, zatímco mutace jsou většinou charakterizované jasnými fenotypy (Kerkela et al. 2007). U žen jsou aktivační mutace v FSH-R spojeny se spontánním



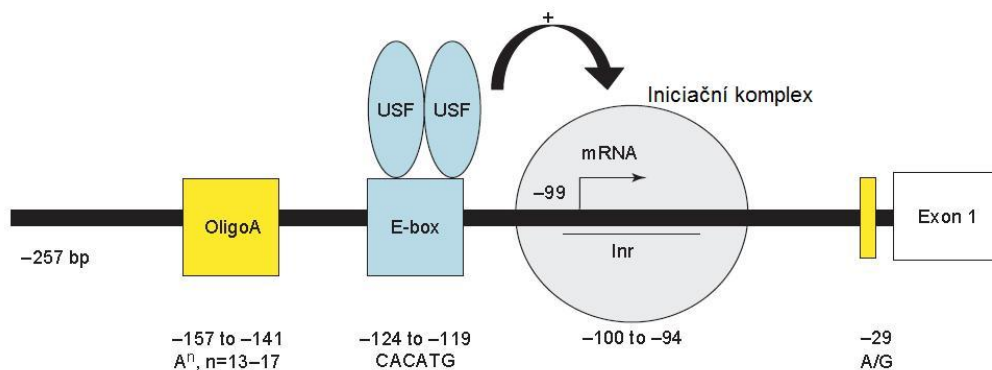
Obr. 6: Patogeneze dědičné spontánní formy ovariálního hyperstimulačního syndromu spojeného s těhotenstvím. Buňky syncytiotrofoblastu vyvíjející se placenty v těhotenství syntetizují hCG, které působí na ovária. V běžném těhotenství je působení hCG limitováno LH-R. Stimulace LH-R v corpus luteum vede ke konstitutivní produkci progesteronu a tím k podpoře průběhu těhotenství. Obě dvě mutace (oranžový a červený bod) v receptoru pro folikuly stimulující hormon umožní stimulaci FSH-R pomocí hCG v granulózních buňkách vyvíjejícího se folikulu. To vede k přehnanému vývoji a zvětšení folikulů. AC označuje adenylát cyklázu a α, β, γ podjednotky G-proteinů (převzato z Kaiser 2003).

OHSS (Smits et al. 2003, Vasseur et al. 2003), naopak inaktivační mutace v FSH-R s předčasným ovariálním selháním (Aittomaki et al. 1995).

Nejlépe prozkoumaný je vztah OHSS k polymorfismům právě FSH-R. Zastoupení jednotlivých polymorfismů se přitom velmi liší dle etnické příslušnosti vyšetřovaných osob (Mayorga et al. 2000, Jun et al. 2006, Macek et al. 2010). Přítomnost serinu na 680. aminokyselinové pozici (exon 10, intracelulárně na konci C-terminální domény receptoru) místo asparaginu je spojena s nízkou odpovědí ovária na stimulaci exogenním FSH (Jun et al. 2006, Loutradis et al. 2006), s polycystickými ovárii (Gu, Park and Baek 2010) a s delším menstruačním cyklem (Greb et al. 2005). FSH-R se Ser680 má nejspíše vyšší práh FSH pro svou aktivaci (Greb et al. 2005). Naopak Asn alela, zvláště u homozygotních pacientů, je spojena s vyšší senzitivou a největší závažností rozvinutého OHSS. Tato alela tedy nepredikuje jen zvýšený risk k rozvinutí OHSS, ale také jeho klinickou závažnost (Daelemans et al. 2004, Macek et al. 2010). Zároveň ženy homozygotní pro Asn častěji klinicky otěhotní (Jun et al. 2006). Nicméně některé studie tato pozorování nepotvrzují (d'Alva et al. 2005, Kerkela et al. 2007).

S polymorfismem Asn680Ser je v genové vazbě další polymorfismus FSH-R: Ala307Ser (Greb et al. 2005, Achrekar et al. 2009a). Thr307 (exon 10, extracelulární doména před začátkem prvního transmembránového helixu) je spjat se silnou odpovědí ovárií na stimulaci (Achrekar et al. 2009a). Polymorfismy Ala307Ser a Asn680Ser se nejčastěji v populaci vyskytují ve spojení Thr307 – Asn680 a Ala307 – Ser680 (Greb et al. 2005).

Důležitý je také AA genotyp na -29 pozici FSH-R (obr. 7), který je asociován se slabou odpovědí ovária, nejspíše ovlivněním exprese receptoru (Achrekar et al. 2009b). Tento polymorfismus se totiž nachází v konzervované sekvenci pro vazbu transkripčního faktoru a je zkoumán zejména ve spojení s polymorfismy na pozicích 307 a 680. V promotorové oblasti FSH-R genu byla nalezena ještě polymorfní oblast lišící se v počtu adenosinů v sekvenci za sebou (A-box). Její vliv na citlivost receptoru ještě nebyl ověřen (shrnuto v Gromoll and Simoni 2005).



Obr. 7: Schematické znázornění promotorové oblasti FSH-R genu. Modře je znázorněna konzervovaná sekvence zvaná E-box, na kterou nasedají transkripční faktory typu USF. Šedě je znázorněna iniciační sekvence (Inr) s počátkem transkripce, žlutě jsou označeny polymorfismy: -29 SNP a variabilní oligo-A úsek (převzato z Gromoll and Simoni 2005).

Gen pro FSH-R byl skenován i pro přítomnost jiných polymorfismů a mutací, které by mohly mít vliv na ovariální stimulaci v rámci ART, žádné další však nedosáhly statistické významnosti (Binder et al. 2008a). Vliv polymorfismů FSH-R na ovariální odezvu se zdá být dostatečně prozkoumán a proto je možné Asn680Ser začít používat jako předpovědní faktor v klinické praxi (Moron and Ruiz 2010). Síla ovariální odezvy je sice regulována mnoha genetickými i enviromentálními vlivy, přesto by tento biomarker mohl pomoci při určování rizika příliš silné či slabé odezvy pacientky na léčbu.

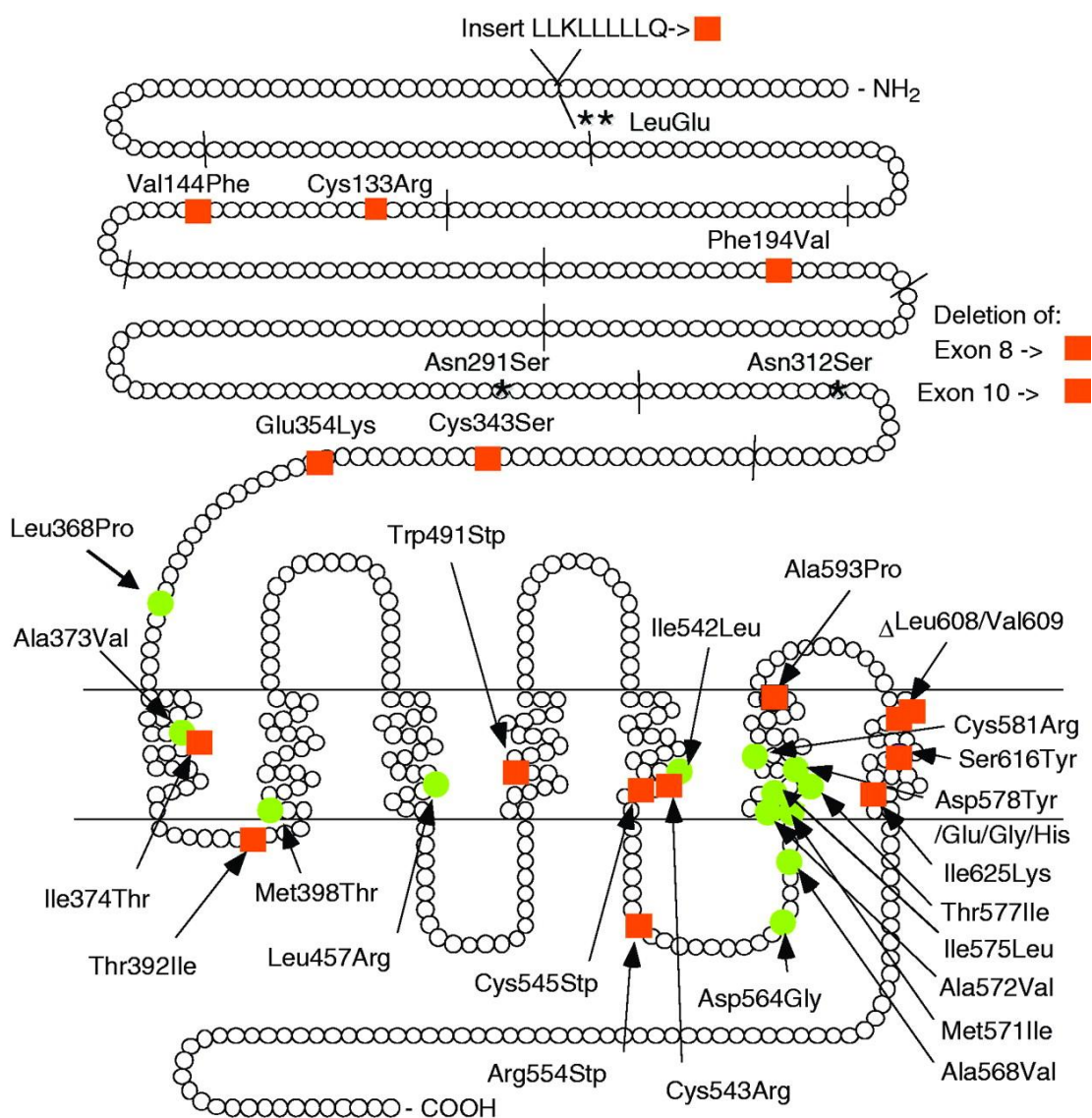
Dalšími kandidátními geny jsou polymorfismy LH a LH-R. Podílejí se na luteinizaci hyperstimulovaných ovárií, což může vést k velkému uvolňování vazoaktivních mediátorů, jako je VEGF a další, a následně k rozvoji OHSS (McClure et al. 1994). Bylo zjištěno, že u primátů přímo stimuluje syntézu VEGF granulózními buňkami nejen hCG (Berndt et al. 2006), ale i FSH a LH (zjištěno na makacích, Christenson and Stouffer 1997).

4.1. Polymorfismy receptoru luteinizačního hormonu

Obdobně jako u FSH-R, i mutace v LH-R jsou většinou charakteristické jasným fenotypem, který narušuje normální pubertální vývoj. Mutace způsobující konstitutivní aktivaci LH-R vedou k předčasné pubertě u chlapců, takže nastupuje již v dětském věku (Nagasaki et al. 2010). Inaktivační mutace mají za následek mužský pseudohermafroditismus (ženské zevní pohlavní orgány, sterilitu a genotyp 46 XY), v „lehčích“ případech mají pacienti mikropenis (Latronico et al. 1996, Qiao et al. 2009). Ve většině případů se jedná o recesivní homozygoty s příbuzensky spřízněnými rodiči.

Byla zaznamenána i mutace LH-R na rozhraní 10. intronu a 11. exonu spojená se spontánní formou OHSS (Akerman, 2000), tato souvislost však u jiných spontánních případů OHSS nebyla potvrzena (d'Alva et al. 2005, Kerkela et al. 2007).

Mezi nejvýznamnější polymorfismy LH-R patří zejména insLQ, způsobená inzercí šesti nukleotidů CTCCAG za 54. nukleotidem vedoucí k vložení dvou aminokyselin leucinu a glyciny za 18. pozici blízko N-konce proteinu (obr. 8). Tuto inzerci popsal již roku 1995 Atger s kolegy při sekvenování LH-R genu (Atger et al. 1995). Frekvence insLQ alely v populaci je etnický závislá a pohybuje se v rozmezí od 0% u Japonců do 28% u zdravého bělošského obyvatelstva (Wu et al. 1998, Rodien et al. 1998, Kerkela et al. 2007). U pacientek postižených OHSS je prevalence této alely vyšší, až 40,5 % (Kerkela et al. 2007).

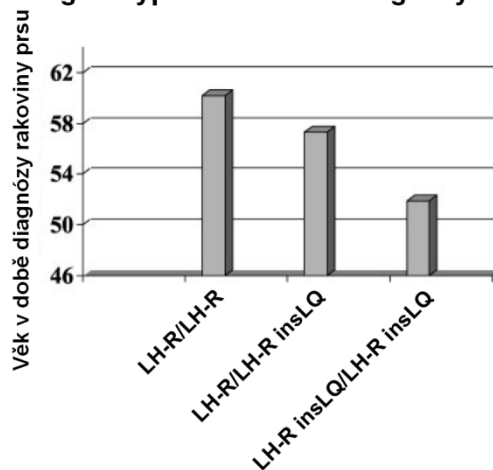


Obr. 8: Mutace a polymorfismy měnící sekvenci aminokyselin v genu pro LH-R. Zelená kolečka zobrazují aktivační mutace, červené čtverečky inaktivační mutace a černé hvězdičky polymorfismy, Stp. značí vznik stop kodónu (převzato z Themmen 2005).

Přestože in vitro studie žádné strukturní rozdíly mezi kratší a delší variantou LH-R neodhalila (Rodien et al. 1998), předpokládá se vliv polymorfismů na funkci LH-R. Polymorfismus insLQ je umístěn v těsném sousedství předpokládané signální sekvence, může tedy interferovat se syntézou LH-R proteinu a jeho umístěním na cytoplazmatickou membránu (Kerkela et al. 2007). Navíc delší, 11 aminokyselinová inzerce do stejného místa jako insLQ, která nezpůsobuje posun čtecího rámce, má za následek mužský pseudohermafroditismus (Richter-Unruh et al. 2002).

InsLQ zřejmě zvyšuje aktivitu LH-R a tím produkci estrogenů, což může mít karcinogenní účinky na prsní tkáň (Piersma et al. 2006). U žen s rakovinou prsu je přítomnost insLQ asociována s nižším věkem, kdy je rakovina prsu diagnostikována (obr. 9) a také s její agresivnější formou, přestože insLQ samostatně riziko vzniku rakoviny prsu nezvyšuje (Powell et al. 2003, Piersma et al. 2006). U pacientek s insLQ před menopauzou byla zaznamenána rychlejší recidiva této nemoci (Piersma et al. 2007b).

LH-R genotyp a věk v době diagnózy rakoviny prsu



Obr. 9: LH-R genotyp a průměrný věk žen v době diagnózy rakoviny prsu. Ženy homozygotní pro alelu charakterizovanou inzercí LQ do genu pro LH-R (na obrázku značena LH-R insLQ) byly v době diagnózy rakoviny prsu mladší průměrně o 8,3 let oproti pacientkám homozygotním pro běžnou LH-R alelu (převzato z Powell et al. 2003).

Spojitosť LH-R polymorfismu insLQ ve vztahu k odpovědi na COH v rámci IVF programů studoval švédský tým v čele s doktorkou Kerkelovou na 21 pacientkách, u kterých se rozvinul závažný stupeň OHSS, a u 51 kontrol, u kterých se během ovariální stimulace OHSS nerozvinul. Přestože byla insLQ alela u pacientek častější (42,5%) než u kontrol (27,5 %), spojitost insLQ s rozvojem OHSS nedosáhla statistické významnosti. U deseti pacientek a deseti kontrol bylo přitom provedeno sekvenování všech 11 exonů LH-R bez nálezů žádné společné varianty. U dalších 11 pacientek a 41 kontrol byl výzkum zaměřen na

cílené hledání přítomnosti insLQ (Kerkela et al. 2007). Tento jev mohl být z části způsoben i malým množstvím pacientek v testovaném souboru.

Významným jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) je i Asn291Ser, způsobený záměnou A/G na 872. nukleotidu 10. exonu. Alelická frekvence Ser alely je silně etnicky závislá. V bělošské populaci se vyskytuje až v 6% (Wu et al. 1998, Piersma et al. 2007b). Strukturální rozdíl mezi těmito dvěma formami receptoru je způsoben chybějící glykosilací na serinu oproti asparaginu. Ser291 je asociován se zvýšenou citlivostí receptoru. Přesto Ser nemá vliv na rozvoj rakoviny prsu (Piersma et al. 2007b).

Dalším důležitým polymorfismem je Ser312Asn, jehož alelická frekvence je obdobně jako Asn291Ser, silně závislá na etnickém původu. Výskyt Asn alely se celkově pohybuje mezi 0 % (asijské obyvatelstvo) a 72% (Afro-Američané), v bělošské populaci mezi 40 – 44% (Wu et al. 1998, Piersma et al. 2007b). Tento SNP je způsoben záměnou A/G na nukleotidové pozici 935 v 10. exonu genu LH-R. Asn alela byla identifikována jako rizikový faktor pro vznik rakoviny prsu (Piersma et al. 2007b) a je spojována s poruchou spermatogeneze u chlapců (Simoni et al. 2008).

Gen pro LH-R byl také v nedávné velké nizozemské asociační studii zaměřené na hledání genů spojených s předčasným ovariálním selháním vyhodnocen jako jeden z šesti kandidátních genů (Knauff et al. 2009).

Variety LH-R mohou ovlivnit funkci receptorů a díky tomu i produkci pohlavních hormonů, což má vliv i na další tkáně a procesy. Polymorfismy tak následně ovlivňují nejen klinický výsledek ovariální stimulace při IVF, ale i prognózu pacientky s rakovinou prsu. Většina pacientek ve švédské studii neměla mutaci nebo společný polymorfismus, který by zvyšoval riziko rozvoje OHSS (Kerkela et al. 2007). To může naznačovat změny v dalších regionech LH-R genu, jako jsou introny nebo promotorová oblast. Ovariální odezva na stimulaci je navíc určována více faktory, například interakcí LH-R s LH. V neposlední řadě mohou v síle ovariální odezvy hrát roli i somatické mutace, jejichž přítomnost by ovšem mohla být otestována pouze odběrem DNA přímo z ovária.

4.2. Polymorfismy LH

4.2.1 α podjednotka

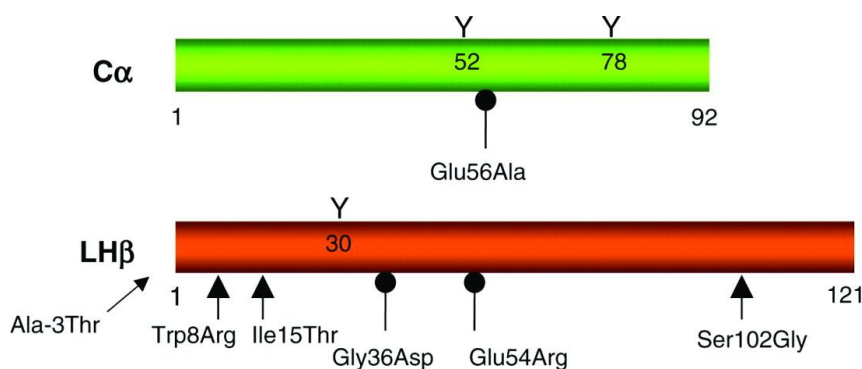
Přírozeně se vyskytující variace v α podjednotce LH receptoru, která je zároveň společná pro FSH, hCG a TSH, nebyly zatím popsány. Je možné, že takováto mutace by byla kvůli současné blokaci hCG, TSH, LH a FSH pro člověka letální.

Byla však popsána somatická mutace ve společné α podjednotce ektopicky sekretovaného hCG z nediferencovaného karcinomu. Mutace byla způsobena jednobázovou substitucí vedoucí k záměně Glu56Ala, díky čemuž byla pozměněna terciální struktura α podjednotky, takže nemohla asociovat s β podjednotkou (Nishimura et al. 1986).

4.2.2 β podjednotka

Ani u specifické β podjednotky LH nejsou časté mutace, protože vážně ovlivňují plodnost postižených osob (Achard et al. 2009). První inaktivační mutace v β podjednotce LH byla dokonce u ženy popsána teprve roku 2007. Homozygotní mutace u brazilské pacientky zasahovala 5' sestřihové místo v nekódující intronové oblasti, takže intron mezi 2. a 3. exonem nebyl vyštěpen. Navíc došlo k posunu čtecího rámce ve třetím exonu, což sice neovlivnilo pubertální vývoj ženy, ale díky absenci funkčního LH byla neplodná (Lofrano-Porto et al. 2007).

V β podjednotce se však vyskytuje i několik polymorfních sekvencí, které mohou mít různě silný vliv na aktivitu LH (obr. 10). Polymorfismus Ser102Gly, způsobený jednobázovou záměnou ve 3. exonu, je spojován s poruchami menstruačního cyklu (Ramanujam et al. 1999) a s predispozicí k neplodnosti u žen (Mafra et al. 2010), přestože přesný mechanismus vlivu tohoto polymorfismu ještě není známý.



Obr. 10: Znárodnění známých mutací a polymorfismů v genech pro společnou α podjednotku gonadotropinů a v β podjednotce LH. Šipky naznačují polymorfismy, tečky inaktivační mutace (převzato z Themmen 2005).

Dalším detekovaným polymorfismem je záměna v 5' nepřekládané oblasti β podjednotky LH i FSH, které jsou pravděpodobně spojené s předčasným počátkem puberty u čínských dívek, tj. počátek puberty před 8. rokem života (Zhao et al. 2010).

Nejrozšířenějším polymorfismem jsou dva SNPs ve druhém exonu genu pro LH β , vedoucí ke vzniku tzv. v-LH β (variabilní β podjednotky LH, obr. 11) (Nilsson et al. 1997, Elter et al. 1999). Tento polymorfismus byl původně popsán jako imunologicky špatně

detekovatelná populace LH (Pettersson and Soderholm 1991). Frekvence v-LH β se výrazně odlišuje ve zkoumaných populacích. Největší zastoupení společně homozygotů a heterozygotů bylo popsáno u Australských Aboriginců (53,5 %), naopak nejnižší frekvence byla zaznamenána v Jižní Indii (0%) a u Mexických Mayů (5%) (Nilsson et al. 1997, Nilsson et al. 1998). V České republice je frekvence v-LH β přibližně 17,5 % (Starka et al. 1999).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
hCG β	TCC	AAG	GAG	CCG	CTT	CGG	CCA	CGG	TGC	CGC	CCC	ATC	AAT	GCC	ACC	CTG	GCT	GTG	GAG	AAG
	Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Ile	<u>Asn</u>	<u>Ala</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ala	Val	Glu	Lys
LHB-V	TCC	AGG	GAG	CCG	CTT	CGG	CCA	CGG	TGC	CAC	CCC	ATC	AAT	GCC	ACC	CTG	GCT	GTG	GAG	AAG
	Ser	Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	His	Pro	Ile	<u>Asn</u>	<u>Ala</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ala	Val	Glu	Lys
LHB	TCC	AGG	GAG	CCG	CTT	CGG	CCA	TGG	TGC	CAC	CCC	ATC	AAT	GCC	ATC	CTG	GCT	GTG	GAG	AAG
	Ser	Arg	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Trp	Cys	His	Pro	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Glu	Lys

Obr. 11: Aminokyselinová sekvence části β podjednotek hCG, LH a v-LH β . Dva SNPs na pozicích 8 a 15 u v-LH β jsou zvýrazněny tučně, rozdíly mezi hCG a LH jsou označeny kurzívou, konzervovaná glykosilační sekvence na pozici 13 je podtržena. Ze sekvencí je vidět, že v-LH β je strukturně více podobná hCG. Mohlo by se proto jednat o evolučně starší formu LH, která má blíže k předku dnešních variant LH a hCG (převzato z Nilsson et al. 1998).

In vitro je LH s v-LH β účinnější v produkci progesteronu než standardní LH, poločas života LH s v-LH β v oběhu je ale kratší (Suganuma et al. 1995). Mezi oběma populacemi LH přitom nebyl pozorován rozdíl ve frekvenci pulzů vylučujících LH z hypofýzy do oběhu (Haavisto et al. 1995).

Odlišná aktivita v-LH β je částečně kompenzována polymorfními změnami v promotorové oblasti genu pro v-LH β , způsobené osmi SNPs. Tyto substituce pozměňují vazebná místa pro některé transkripční faktory a proto je tento promotor transkripčně aktivnější (Jiang et al. 1999, Nilsson et al. 2001). Díky zvýšené bioaktivitě in vitro, ale sníženému poločasu života v oběhu, mohou krátké, ale vysoce aktivní pulzy LH způsobovat změny pozorovatelné ve funkci gonád.

Standardní a variabilní alela LH (s v-LH β) tedy rozdílně odpovídají na stimulaci GnRH (Nilsson et al. 2001, Takahashi et al. 2004). Kratší poločas života v-LH β v oběhu je u nich kompenzován brzkou a vysokou hladinou v-LH β , přičemž tato vysoká hladina trvá delší dobu. U žen je přitom zvýšená sekrece LH spojována s neplodností a potraty (Takahashi et al. 2004).

Ohledně v-LH β a jeho vztahu k plodnosti žen jsou publikované výsledky spíše protichůdné. Obecně se v-LH β častěji vyskytuje u žen s ovulačními poruchami (Ramanujam et al. 1999), u neplodných žen (Takahashi et al. 2004), u chlapců je spojována s pomalým tempem pubertálního vývoje, přestože doba počátku puberty u nich není zasažena (Raivio

et al. 1996). Zvýšená frekvence v-LH β alely u obézních pacientek s PCOS pozorovaná na ženách ve Velké Británii (Rajkhowa et al. 1995) nebyla na populaci tureckých žen potvrzena (Elter et al. 1999). Tento rozdíl může být způsoben poměrně nízkým počtem studovaných vzorků zejména u turecké studie (30 pacientek s PCOS a 30 kontrol). Souvislost polymorfního LH s PCOS by byla zajímavá zejména proto, že PCOS je obecně uznávaným rizikovým faktorem pro rozvoj OHSS (Swanton et al. 2010). Přesto jsou doloženi i zjevně zdraví homozygoti pro v-LH β (Haavisto et al. 1995).

Cramer s kolegy studoval vliv v-LH β na plodnost žen u převážně židovské populace z Bostonu a ze získaných výsledků spojuje přítomnost v-LH β spíše se sníženou plodností, než s neplodností. Zajímavé bylo také zjištění, že ženy nesoucí alespoň jednu v-LH β alelu častěji trpěly depresemi a naopak byly méně často kuřačkami (Cramer et al. 2000).

Změněná bioaktivita a kinetika LH s v-LH β indukuje jemné změny v LH funkci, které mohou predisponovat či ochraňovat své nositele před chorobami spojeným s LH aktivitou (Haavisto et al. 1995).

Jak bylo zjištěno, pro některé pacientky podstupující IVF je prospěšné pozdější podání dávky LH v případě, že nedostatečně odpovídají na stimulaci pomocí FSH. Zdá se, že podaný rekombinantní LH je schopný optimalizovat folikulární maturaci snižováním počtu malých folikulů. Tímto způsobem je možné „zachránit“ stimulační cyklus u mladých žen s původně příliš nízkou odezvou na stimulaci (De Placido et al. 2004). Zajímavé je, že některé ženy pro optimální stimulaci žádné podání exogenního LH nepotřebují, naopak pro jiné pacientky je důležitý. To může být způsobeno tím, že aktivita LH spadne pod pomyslnou hladinu, kdy je ještě aktivní, nebo přítomností méně aktivní izoformy LH, která je sice kompatibilní s normálním spontánním ovulačním cyklem, ale pro udržení vícenásobného folikulárního růstu indukovaného během IVF není dostačující (De Placido et al. 2004).

Vztah v-LH β alely s výsledky IVF byl studován na italské populaci Alviggi s kolegy. V-LH β se přitom mnohem častěji vyskytovala u žen s nízkou ovariální odezvou ke stimulaci. Pomocí v-LH β polymorfismu by tak bylo možné identifikovat skupinu pacientek predisponovaných k nízké ovariální odezvě, které by mohly benefitovat z podání LH během stimulace (Alviggi et al. 2009). Zároveň je pravděpodobné, že takováto skupina má snížené riziko k rozvoji OHSS.

5. Závěr

Byly identifikovány polymorfismy FSH-R, které pokud přímo nezvyšují riziko vzniku OHSS, přispívají k větší závažnosti již rozvinutého syndromu. Dalšími kandidátními geny jsou ty pro LH a LH-R, protože se oba také zásadně podílí na maturaci folikulů a ovulaci. Cílem této bakalářské práce bylo shrnout poznatky týkající se možného spojení těchto dvou genů s rozvojem OHSS.

Gen pro LH-R se vyskytuje v několika variantách, z nichž nejdůležitější je insLQ. InsLQ zřejmě zvyšuje aktivitu LH-R a tím produkci estrogenů, což může mít vliv nejen na rozvoj OHSS, ale např. i na rozvoj rakoviny prsu. Zatím jediná provedená studie zaměřená na polymorfismy LH-R ve vztahu k rozvoji OHSS s ním ale nenaznačuje žádnou spojitost. Tato studie však byla provedena na poměrně malém počtu pacientů, bylo by proto vhodné ji zopakovat a spojit se současným genotypováním variant LH, neboť přenos signálu může společně modulovat receptor i jeho ligand.

LH se nejčastěji vyskytuje ve dvou variantách lišících se svou aktivitou - klasická alela a v-LH β . Typ varianty LH má vliv na tvorbu steroidů a tím dále ovlivňuje predispozici pacientů k dalším nemocem, jako je PCOS (polycystický ovariální syndrom), menstruační poruchy či rychlost pubertálního vývoje u chlapců. Vztah PCOS s variantami LH je zajímavý zvláště proto, že tento syndrom výrazně zvyšuje riziko rozvoje OHSS. Pilotní studie Alviggiho a kolegů navíc ukazuje spojení polymorfnní alely LH se slabou odpovědí ovárií na stimulaci. Běžná alela by tedy mohla predisponovat naopak k ochotnější odpovědi ovárií a potažmo ve spojení s dalšími faktory k OHSS.

Řada otázek týkajících se genetických vlivů na rozvoj OHSS zůstává nezodpovězených, např. ovlivnění citlivosti ovárií vzájemným působením různých polymorfismů LH i FSH genů a jejich receptorů a to i v nekódujících oblastech genů. Nesmí se zapomínat také na environmentální vlivy, věk, váhu či další nemoci pacientky. Nejdůležitější stránkou prevence OHSS tak v současné době zůstává zkušenost a pečlivé pozorování ošetřujícího lékaře, stejně jako odborné poučení pacientek o možných komplikacích.

6. Seznam použité literatury

- Abramov, Y., V. Barak, B. Nisman & J. G. Schenker (1997) Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 67, 261-265.
- AbuLouz, S. K., A. A. Ahmed & R. W. Swan (1997) Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome with pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 177, 476-477.
- Achard, C., C. Courtillot, O. Lahuna, G. Meduri, J. C. Soufir, P. Liere, A. Bachelot, H. Benyounes, M. Schumacher, F. Kuttann, P. Touraine & M. Misrahi (2009) Brief Report: Normal Spermatogenesis in a Man with Mutant Luteinizing Hormone. *New England Journal of Medicine*, 361, 1856-1863.
- Achrekar, S. K., D. N. Modi, S. K. Desai, V. S. Mangoli, R. V. Mangoli & S. D. Mahale (2009a) Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr(307)Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. *Fertility and Sterility*, 91, 432-439.
- Achrekar, S. K., D. N. Modi, S. K. Desai, V. S. Mangoli, R. V. Mangoli & S. D. Mahale (2009b) Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 509-515.
- Aittomaki, K., J. L. D. Lucena, P. Pakarinen, P. Sistonen, J. Tapanainen, J. Gromoll, R. Kaskikari, E. M. Sankila, H. Lehvaslaiho, A. R. Engel, E. Nieschlag, I. Huhtaniemi & A. Delachapelle (1995) Mutation in the follicle-stimulating-hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 82, 959-968.
- Alviggi, C., R. Clarizia, K. Pettersson, A. Mollo, P. Humaidan, I. Strina, M. Coppola, A. Ranieri, M. D'Uva & G. De Placido (2009) Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 9-14.
- Ascoli, M., F. Fanelli & D. L. Segaloff (2002) The lutropin/choriocrntadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*, 23, 141-174.
- ASRM. 2008. Ovarian hyperstimulation syndrome. ed. A. S. f. R. Medicine, Suppl 3. Fertility and Sterility.
- Atger, M., M. Misrahi, S. Sar, L. Leflem, P. Dessen & E. Milgrom (1995) Structure of the human luteinizing hormone choriogonadotropin receptor gene - unusual promoter and 5'-noncoding regions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111, 113-123.
- Berndt, S., S. P. d'Hauterive, S. Blacher, C. Pequeux, S. Lorquet, C. Munaut, M. Applanat, M. A. Herve, N. Lamande, P. Corvol, F. van den Brule, F. Frankenne, M. Poutanen, I. Huhtaniemi, V. Geenen, A. Noel & J. M. Foidart (2006) Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *Faseb Journal*, 20, 2630-+.
- Binder, H., R. Dittrich, I. Hager, A. Muller, S. Oeser, M. W. Beckmann, M. Hamori, P. A. Fasching & R. Strick (2008a) Association of FSH receptor and CYP19A1 gene variations with sterility and ovarian hyperstimulation syndrome. *Reproduction*, 135, 107-116.
- Binder, H., W. A. Flegel, J. Emran, A. Muller, S. Cupisti, M. W. Beckmann, R. Eckstein, R. Dittrich & J. Ringwald (2008b) Blood group A: an overseen risk factor for earlyonset ovarian hyperstimulation syndrome? *Reproductive Biomedicine Online*, 17, 185-189.
- Buffet, N. C., C. Djakoure, S. C. Maitre & P. Bouchard (1998) Regulation of the human menstrual cycle. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 19, 151-186.

- Chae, H. D., E. J. Park, S. H. Kim, C. H. Kim, B. M. Kang & Y. S. Chang (2001) Ovarian hyperstimulation syndrome complicating a spontaneous singleton pregnancy: A case report. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18, 120-123.
- Christenson, L. K. & R. L. Stouffer (1997) Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 2135-2142.
- Chui, M. H., N. C. Ozbey, S. Ezzat, Y. Kapran, Y. Erbil & S. L. Asa (2009) Case Report: Adrenal LH/hCG Receptor Overexpression and Gene Amplification Causing Pregnancy-Induced Cushing's Syndrome. *Endocrine Pathology*, 20, 256-261.
- Ciccione, N. A. & U. B. Kaiser (2009) The biology of gonadotroph regulation. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 16, 321-327.
- Cole, L. A. (2010) Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8.
- Cole, L. A., S. A. Khanlian & C. Y. Muller (2008) Detection of perimenopause or postmenopause human chorionic gonadotropin: an unnecessary source of alarm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198.
- Cramer, D. W., K. S. I. Pettersson, R. L. Barbieri & I. T. Huhtaniemi (2000) Reproductive hormones, cancers, and conditions in relation to a common genetic variant of luteinizing hormone. *Human Reproduction*, 15, 2103-2107.
- d'Alva, C. B., P. Serafini, E. Motta, M. B. D. Kohek, A. C. Latronico & B. B. Mendonca (2005) Absence of follicle-stimulating hormone receptor activating mutations in women with iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 83, 1695-1699.
- Daelemans, C., G. Smits, V. de Maertelaer, S. Costagliola, Y. Englert, G. Vassart & A. Delbaere (2004) Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser(680) Asn polymorphism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 6310-6315.
- De Placido, G., C. Alviggi, A. Mollo, I. Strina, A. Ranieri, E. Alviggi, M. Wilding, M. T. Varricchio, A. L. Borrelli & S. Conforti (2004) Effects of recombinant LH (rLH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary downregulation. *Clinical Endocrinology*, 60, 637-643.
- Delbaere, A., G. Smits, O. Olatunbosun, R. Pierson, G. Vassart & S. Costagliola (2004) New insights into the pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome. What makes the difference between spontaneous and iatrogenic syndrome? *Human Reproduction*, 19, 486-489.
- Dickinson, R. E., A. J. Stewart, M. Myers, R. P. Millar & W. C. Duncan (2009) Differential Expression and Functional Characterization of Luteinizing Hormone Receptor Splice Variants in Human Luteal Cells: Implications for Luteolysis. *Endocrinology*, 150, 2873-2881.
- Elter, K., C. T. Erel, N. Cine, U. Ozbek, B. Hacıhanefioglu & E. Ertunçalp (1999) Role of the mutations Trp(8)double right arrow Arg and Ile(15)double right arrow Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 71, 425-430.
- Enskog, A., M. Henriksson, M. Unander, L. Nilsson & M. Brannstrom (1999) Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 71, 808-814.

- Fan, Q. R. & W. A. Hendrickson (2005a) Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors. *Endocrine*, 26, 179-188.
- Fan, Q. R. & W. A. Hendrickson (2005b) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433, 269-277.
- Fox, K. M., J. A. Dias & P. Van Roey (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecular Endocrinology*, 15, 378-389.
- Gera, P. S., L. L. Tatpati, M. C. Allemand, M. A. Wentworth & C. C. Coddington (2010) Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertility and Sterility*, 94, 173-178.
- Golan, A. 1989. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. In *Obstetrical and Gynecological Survey*, eds. R. Ron-el, A. Herman, Y. Soffer & Z. Weinraub, 430-40.
- Golan, A. & A. Weissman (2009a) A modern classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, 28-32.
- Golan, A. & A. Weissman (2009b) Response: Towards a clinically useful classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, 755-755.
- Greb, R. R., K. Grieshaber, J. Gromoll, B. Sonntag, E. Nieschlag, L. Kiesel & M. Simoni (2005) A common single nucleotide polymorphism in Exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 4866-4872.
- Gromoll, J., U. Eiholzer, E. Nieschlag & M. Simoni (2000) Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: Differential action of human chorionic gonadotropin and LH. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 2281-2286.
- Gromoll, J., E. Pekel & E. Nieschlag (1996) The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. *Genomics*, 35, 308-311.
- Gromoll, J., T. Ried, H. Holtgrevegrev, E. Nieschlag & T. Gudermann (1994) Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10. *Journal of Molecular Endocrinology*, 12, 265-271.
- Gromoll, J. & M. Simoni (2005) Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16, 368-373.
- Grossman, L. C., K. G. Michalakakis, H. Browne, M. D. Payson & J. H. Segars (2010) The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome: an unrecognized compartment syndrome. *Fertility and Sterility*, 94, 1392-1398.
- Gu, B. H., J. M. Park & K. H. Baek (2010) Genetic variations of follicle stimulating hormone receptor are associated with polycystic ovary syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, 26, 107-112.
- Haavisto, A. M., K. Pettersson, M. Bergendahl, A. Virkamaki & I. Huhtaniemi (1995) Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80, 1257-1263.
- Hsu, S. Y. T. (2003) New insights into the evolution of the relaxin - LGR signaling system. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14, 303-309.
- Ji, T. H., M. Grossmann & I. H. Ji (1998) G protein-coupled receptors I. Diversity of receptor-ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17299-17302.
- Jiang, M., P. Pakarinen, F. P. Zhang, T. El-Hefnawy, P. Koskimies, K. Pettersson & I. Huhtaniemi (1999) A common polymorphic allele of the human luteinizing hormone beta-subunit gene: additional mutations and differential function of the promoter sequence. *Human Molecular Genetics*, 8, 2037-2046.
- Jun, J. K., J. S. Yoon, S. Y. Ku, Y. M. Choi, K. R. Hwang, S. Y. Park, G. H. Lee, W. D. Lee, S. H. Kim, J. G. Kim & S. Y. Moon (2006) Follicle-stimulating hormone receptor gene

- polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *Journal of Human Genetics*, 51, 665-670.
- Kaiser, U. B. (2003) The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome. *New England Journal of Medicine*, 349, 729-732.
- Kerkela, E., H. Skottman, B. Friden, K. Bjuresten, J. Kere & O. Hovatta (2007) Exclusion of coding-region mutations in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes as the cause of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 87, 603-606.
- Khan, N. A. & R. Benner. 2011. Human Chorionic Gonadotropin, A Model Molecule for Oligopeptide-Based Drug Discovery 32-53. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*.
- Knauff, E. A. H., L. Franke, M. A. van Es, L. H. van den Berg, Y. T. van der Schouw, J. S. E. Laven, C. B. Lambalk, A. Hoek, A. J. Goverde, S. Christin-Maitre, A. J. Hsueh, C. Wijmenga, B. Fauser & P. O. F. C. Dutch (2009) Genome-wide association study in premature ovarian failure patients suggests ADAMTS19 as a possible candidate gene. *Human Reproduction*, 24, 2372-2378.
- Laphorn, A. J., D. C. Harris, A. Littlejohn, J. W. Lustbader, R. E. Canfield, K. J. Machin, F. J. Morgan & N. W. Isaacs (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 369, 455-461.
- Latronico, A. C., J. Anasti, I. J. P. Arnhold, R. Rapaport, B. B. Mendonca, W. Bloise, M. Castro, C. Tsigos & G. P. Chrousos (1996) Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *New England Journal of Medicine*, 334, 507-512.
- Laue, L. L., S. M. Wu, M. Kudo, C. J. Bourdony, G. B. Cutler, A. J. W. Hsueh & W. Y. Chan (1996) Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Molecular Endocrinology*, 10, 987-997.
- Lee, A., L. K. Christenson, P. E. Patton, K. A. Burry & R. L. Stouffer (1997) Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Human Reproduction*, 12, 2756-2761.
- Leeh, T. H., C. H. Liu, C. C. Huang, Y. L. Wu, Y. T. Shih, H. N. Ho, Y. S. Yang & M. S. Lee (2008) Serum anti-Mullerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Human Reproduction*, 23, 160-167.
- Levin, E. R., G. F. Rosen, D. L. Cassidenti, B. Yee, D. Meldrum, A. Wisot & A. Pedram (1998) Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 102, 1978-1985.
- Livshyts, G., S. Podlesnaja, S. Kravchenko, I. Sudoma & L. Livshits (2009) A distribution of two SNPs in exon 10 of the FSHR gene among the women with a diminished ovarian reserve in Ukraine. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26, 29-34.
- Lofrano-Porto, A., G. B. Barra, L. A. Giacomini, P. P. Nascimento, A. C. Latronico, L. A. Casulari & F. D. D. Neves (2007) Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. *New England Journal of Medicine*, 357, 897-904.
- Loutradis, D., E. Patsoula, V. Minas, G. A. Koussidis, A. Antsaklis, S. Michalas & A. Makrigiannakis (2006) FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 23, 177-184.
- Macek, M., P. Feldmar, H. Kluckova, M. Hrehorcak, J. Diblik, P. Paulasova, M. Turnovec & S. Vilimova (2010) FSH-R polymorphism in severe types of OHSS (type III and IV/V): results of a Czech pilot study. *Human Reproduction*, 25, I323-I323.

- Mafrá, F. A., B. Bianco, D. M. Christofolini, A. M. B. Souza, K. Zulli & C. P. Barbosa (2010) Luteinizing hormone beta-subunit gene (LH beta) polymorphism in infertility and endometriosis-associated infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 151, 66-69.
- Manau, D., F. Fabregues, J. Penarrubia, M. Creus, F. Carmona, G. Casals, W. Jimenez & J. Balasch (2007) Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Human Reproduction*, 22, 669-675.
- Mathur, R. 2005. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. ed. I. Evbuomwan, 132-138. *Current Obstetrics & Gynaecology*.
- Mathur, R. & J. Jenkins (2009) Towards a clinically useful classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, 434-434.
- Mathur, R. S., A. V. Akande, S. D. Keay, L. P. Hung & J. M. Jenkins (2000) Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, 73, 901-907.
- Mayorga, M. P., J. Gromoll, H. M. Behre, C. Gassner, E. Nieschlag & M. Simoni (2000) Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 3365-3369.
- McClure, N., D. L. Healy, P. A. W. Rogers, J. Sullivan, L. Beaton, R. V. Haning, D. T. Connolly & D. M. Robertson (1994) Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet*, 344, 235-236.
- Memarzadeh, M. T. (2010) A fatal case of ovarian hyperstimulation syndrome with perforated duodenal ulcer. *Human Reproduction*, 25, 808-809.
- Minegishi, T., K. Nakamura, Y. Takakura, K. Miyamoto, Y. Hasegawa, Y. Ibuki & M. Igarashi (1990) Cloning and sequencing of human LH hCG receptor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 172, 1049-1054.
- Minegishi, T., M. Tano, Y. Abe, K. Nakamura, Y. Ibuki & K. Miyamoto (1997) Expression of luteinizing hormone human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 3, 101-107.
- Moron, F. J. & A. Ruiz (2010) Pharmacogenetics of controlled ovarian hyperstimulation: time to corroborate the clinical utility of FSH receptor genetic markers. *Pharmacogenomics*, 11, 1613-1618.
- Nagasaki, K., N. Katsumata, Y. Ogawa, T. Kikuchi & M. Uchiyama (2010) Novel C617Y mutation in the 7th transmembrane segment of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in a Japanese boy with peripheral precocious puberty. *Endocrine Journal*, 57, 1055-1060.
- Nakamura, K., S. Yamashita, Y. Omori & T. Minegishi (2004) A splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor modulates the expression of wild-type human LH receptor. *Molecular Endocrinology*, 18, 1461-1470.
- Nakhuda, G. S., M. C. Chu, J. G. Wang, M. V. Sauer & R. A. Lobo (2006) Elevated serum mullerian-inhibiting substance may be a marker for ovarian hyperstimulation syndrome in normal women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 85, 1541-1543.
- Navot, D., P. A. Bergh & N. Laufer (1992) Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies - prevention and treatment. *Fertility and Sterility*, 58, 249-261.
- Nilsson, C., M. Jiang, K. Pettersson, A. Iitia, M. Makela, H. Simonsen, S. Eastal, R. J. Herrera & I. Huhtaniemi (1998) Determination of a common genetic variant of

- luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassays. *Clinical Endocrinology*, 49, 369-376.
- Nilsson, C., K. Pettersson, R. P. Millar, K. A. Coerver, M. M. Matzuk, I. T. Huhtaniemi, M. L. Savontaus, M. Punab, H. Pisarek, K. Kula, T. M. Petterson, J. B. vanSantbrink, B. Fauser, R. N. Clayton, P. Beck-Peccoz, K. Fujieda, A. Aribarg & C. N. Wang (1997) Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: An international collaborative research. *Fertility and Sterility*, 67, 998-1004.
- Nilsson, C. H., M. Kaleva, H. Virtanen, A. M. Haavisto, K. Pettersson & I. T. Huhtaniemi (2001) Disparate response of wild-type and variant forms of LH to GnRH stimulation in individuals heterozygous for the LH beta variant allele. *Human Reproduction*, 16, 230-235.
- Nishimura, R., J. Shin, I. Ji., C. R. Middaugh, W. Kruggel, R. V. Lewis & T. H. Ji. 1986. A single amino acid substitution in an ectopic α subunit of a human carcinoma choriogonadotropin. . 10475 - 10477. Wyoming: The Journal of Biological Chemistry.
- Olijve, W., W. de Boer, J. W. Mulders & P. M. van Wezenbeek. 1996. Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). 371-382. NV Organon, Oss, The Netherlands: Molecular human reproduction.
- Pabon, J. E., J. S. Bird, X. Li, Z. H. Huang, Z. M. Lei, J. S. Sanfilippo, M. A. Yussman & C. V. Rao (1996) Human skin contains luteinizing hormone chorionic gonadotropin receptors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 2738-2741.
- Papanikolaou, E. G., C. Pozzobon, E. M. Kolibianakis, M. Camus, H. Tournaye, H. M. Fatemi, A. Van Steirteghem & P. Devroey (2006) Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 85, 112-120.
- Papanikolaou, E. G., H. Tournaye, W. Verpoest, M. Camus, V. Vernaev, A. Van Steirteghem & P. Devroey (2005) Early and late ovarian hyperstimulation syndrome: early pregnancy outcome and profile. *Human Reproduction*, 20, 636-641.
- Pettersson, K. S. I. & J. R. M. Soderholm (1991) Individual differences in lutropin immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies. *Clinical Chemistry*, 37, 333-340.
- Piersma, D., E. Berns, M. Verhoef-Post, A. G. Uitterlinden, I. Braakman, H. A. P. Pols & A. P. N. Themmen (2006) A common polymorphism renders the luteinizing hormone receptor protein more active by improving signal peptide function and predicts adverse outcome in breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91, 1470-1476.
- Piersma, D., A. P. Themmen, M. P. Look, J. G. Klijn, J. A. Foekens, A. G. Uitterlinden, H. Ap Pols & E. M. Berns (2007a) GnRH and LHR gene variants predict adverse outcome in premenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, 9.
- Piersma, D., M. Verhoef-Post, M. P. Look, A. G. Uitterlinden, H. A. P. Pols, E. Berns & A. P. N. Themmen (2007b) Polymorphic variations in exon 10 of the luteinizing hormone receptor: Functional consequences and associations with breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 276, 63-70.
- Powell, B. L., D. Piersma, M. E. Kevenaar, I. L. van Staveren, A. P. N. Themmen, B. J. Iacopetta & E. Berns (2003) Luteinizing hormone signaling and breast cancer: Polymorphisms and age of onset. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 1653-1657.
- Qiao, J., B. Han, B. L. Liu, X. Chen, Y. Ru, K. X. Cheng, F. G. Chen, S. X. Zhao, J. Liang, Y. L. Lu, J. F. Tang, Y. X. Wu, W. L. Wu, J. L. Chen, M. D. Chen & H. D. Song (2009) A Splice Site Mutation Combined with a Novel Missense Mutation of LHCGR Cause Male Pseudohermaphroditism. *Human Mutation*, 30, E855-E865.

- Rabau, E., A. David, D. M. Serr, Maschias S & Lunenfel B (1967) Human menopausal gonadotropins for anovulation and sterility - results of 7 years of treatment. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 98, 92-&.
- Raivio, T., I. Huhtaniemi, R. Anttila, M. A. Siimes, L. Hagenas, C. Nilsson, K. Pettersson & L. Dunkel (1996) The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 3278-3282.
- Rajkhowa, M., J. A. Talbot, P. W. Jones, K. Pettersson, A. M. Haavisto, I. Huhtaniemi & R. N. Clayton (1995) Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 43, 297-303.
- Ramanujam, L. N., W. X. Liao, A. C. Roy, A. Loganath, H. H. Goh & S. C. Ng (1999) Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders. *Clinical Endocrinology*, 51, 243-246.
- RCOG. 2006. The Management of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. In *Green-top Guideline No.5*, ed. R. C. o. O. a. Gynaecologists.
- Richter-Unruh, A., J. W. M. Martens, M. Verhoef-Post, H. T. Wessels, W. A. Kors, G. H. G. Sinnecker, A. Boehmer, S. L. S. Drop, S. P. A. Toledo, H. G. Brunner & A. P. N. Themmen (2002) Leydig cell hypoplasia: cases with new mutations, new polymorphisms and cases without mutations in the luteinizing hormone receptor gene. *Clinical Endocrinology*, 56, 103-112.
- Rodien, P., F. Cetani, S. Costagliola, M. Tonacchera, L. Duprez, T. Minegishi, C. Govaerts & G. Vassart (1998) Evidences for an allelic variant of the human LC/CG receptor rather than a gene duplication: Functional comparison of wild-type and variant receptors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 4431-4434.
- Rolaki, A., G. Coukos, D. Loutradis, H. M. DeLisser, C. Coutifaris & A. Makrigiannakis (2007) Luteogenic hormones act through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism to up-regulate alpha(5)beta(1) and alpha(v)beta(3) integrins, promoting the migration and survival of human luteinized granulosa cells. *American Journal of Pathology*, 170, 1561-1572.
- Rousseau-merck, M. F., M. Misrahi, M. Atger, H. Loosfelt, E. Milgrom & R. Berger (1990) Localization of the human luteinizing hormone choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 54, 77-79.
- Sairam, M. R. & C. H. Li (1975) Human pituitary lutropin - isolation, properties, and complete amino-acid sequence of beta-subunit. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 412, 70-81.
- Schenker, J. G. & D. Weinstein (1978) Ovarian hyperstimulation syndrome - current survey. *Fertility and Sterility*, 30, 255-268.
- Serour, G. I., M. Aboulghar, R. Mansour, M. A. Sattar, Y. Amin & H. Aboulghar (1998) Complications of medically assisted conception in 3,500 cycles. *Fertility and Sterility*, 70, 638-642.
- Simoni, M., J. Gromoll & E. Nieschlag (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 18, 739-773.
- Simoni, M., F. Tuttelmann, C. Michel, Y. Bockenfeld, E. Nieschlag & J. Gromoll (2008) Polymorphisms of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene: association with maldescended testes and male infertility. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18, 193-200.
- Smits, G., O. Olatunbosun, A. Delbaere, R. Pierson, G. Vassart & S. Costagliola (2003) Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *New England Journal of Medicine*, 349, 760-766.

- Sprengel, R., T. Braun, K. Nikolics, D. L. Segaloff & P. H. Seeburg (1990) The testicular receptor for follicle stimulating hormone - structure and functional expression of cloned cDNA. *Molecular Endocrinology*, 4, 525-530.
- Starka, L., M. Hill, R. Hampl & I. T. Huhtaniemi. 1999. Genetic variant of luteinizing hormone in Czech Republic., 103 - 108. *Endocrine Regulations*.
- Suganuma, N., K. Furui, M. Furuhashi, Y. Asada, F. Kikkawa & Y. Tomoda (1995) Screening of the mutations in luteinizing hormone beta subunit in patients with menstrual disorders. *Fertility and Sterility*, 63, 989-995.
- Swanton, A., L. Storey, E. McVeigh & T. Child (2010) IVF outcome in women with PCOS, PCO and normal ovarian morphology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 149, 68-71.
- Takahashi, K., K. Karino, H. Kanasakia & K. Miyazakia (2004) Altered kinetics of pituitary response to gonadotropin-releasing hormone in women with variant luteinizing hormone: correlation with ovulatory disorders. *Hormone Research*, 61, 27-32.
- Themmen, A. P. N. (2005) An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. *Reproduction*, 130, 263-274.
- Vasseur, C., P. Rodien, I. Beau, A. Desroches, C. Gerard, L. de Poncheville, S. Chaplot, F. Savagner, A. Croue, E. Mathieu, N. Lahlou, P. Descamps & M. Misrahi (2003) A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *New England Journal of Medicine*, 349, 753-759.
- Wang, T. H., S. G. Horng, C. L. Chang, H. M. Wu, Y. J. Tsai, H. S. Wang & Y. K. Soong (2002) Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 3300-3308.
- Wiser, A., J. Levron, D. Kreizer, R. Achiron, A. Shrim, E. Schiff, J. Dor & A. Shulman (2005) Outcome of pregnancies complicated by severe ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a follow-up beyond the second trimester. *Human Reproduction*, 20, 910-914.
- Wu, S. M., M. Jose, K. Hallermeier, O. M. Rennert & W. Y. Chan (1998) Polymorphisms in the coding exons of the human luteinizing hormone receptor gene. *Human Mutation*, 11, 333-334.
- Yilmaz, N., D. Uygur, E. Ozgu & S. Batioglu (2010) Does coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome, affect assisted reproduction cycle outcome? *Fertility and Sterility*, 94, 189-193.
- Zhang, F. P., J. Kero & I. Huhtaniemi (1998) The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted into the human follicle-stimulating hormone receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 142, 165-174.
- Zhao, Y., T. Chen, Y. X. Zhou, K. Li & J. H. Xiao (2010) An association study between the genetic polymorphisms within GnRHI, LH beta and FSH beta genes and central precocious puberty in Chinese girls. *Neuroscience Letters*, 486, 188-192.

Internetové zdroje:

www.ncbi.nlm.nih.gov

Tato bakalářská práce vznikla s podporou MZ0FNM2005 projekt 6101 a projektu OPPK CZ.2 16/3.1.00/24022.