

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Jana Chrudimská

Prevalence vybraných polymorfizmů v genu pro receptor luteinizačního hormonu v české populaci a u pacientek s ovariálním hyperstimulačním syndromem

The prevalence of chosen polymorphisms of luteinizing hormone receptor gene in Czech population and patients with ovarian hyperstimulation syndrome

Diplomová práce

Školitel: doc. MUDr. Milan Macek, CSc.

Praha, 2013

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, 1.5.2013

Jana Chrudimská

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem lidem, kteří mi umožnili pracovat na tomto zajímavém projektu, hlavně mým rodičům a příteli, kteří mě v průběhu celého studia velmi podporovali.

Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli, doc. MUDr. Milanu Mackovi, CSc., za odborné vedení mé práce a velkou podporu při zpracování zadaného tématu. Děkuji laboratoři Centra cystické fibrózy na Ústavu biologie a lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole za vytvoření příjemného pracovního prostředí, zejména Petře Peldové, Ph.D. za pomoc při řešení praktických i teoretických problémů v průběhu vypracování práce a MUDr. Marku Turnovcovi za trpělivost a odborné konzultace.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu IGA NT13770-4/2012 (Ministerstvo zdravotnictví, ČR), projektu institucionální podpory 00064203 (Fakultní nemocnice v Motole, ČR) a OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022 (EU).

Abstrakt

Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS) je komplikací technik asistované reprodukce (ART), která potenciálně může ohrozit život pacientky. Je způsoben zvýšenou citlivostí ovarií na léčbu gonadotropiny při kontrolované hyperstimulaci ovarií (COH). Míru ovariální odezvy přitom mohou jemně regulovat polymorfizmy v genech pro gonadotropiny a jejich receptory.

Cílem této studie je zjistit prevalenci polymorfizmů Asn291Ser (rs1470652), Ser312Asn (rs2293275) a insLQ (inzerce leucinu a glutaminu, rs58356637) v genu pro receptor luteinizačního hormonu a choriového gonadotropinu (LHCGR) u 102 českých fertálních mužů, 149 fertálních žen a u 58 pacientek, u kterých se rozvinul závažný stupeň OHSS.

Polymorfizmy Asn291Ser a Ser312Asn byly detekovány pomocí TaqMan SNP Genotyping Assay, insLQ na kapilární elektroforéze s fluorescenčně značenými primery.

Zjištěné prevalence studovaných polymorfizmů v české fertální populaci jsou ve shodě s většinou výsledů z ostatních evropských studií. Nebyl zjištěn rozdíl v jejich prevalenci mezi muži a ženami, stejně jako nebyl objeven žádný vztah těchto polymorfizmů k rozvoji OHSS. Na provedení haplotypové analýzy byl počet analyzovaných vzorků příliš nízký. Získaná data budou použita pro následné asociační studie v oblasti dysfertility, hormonálně dependentních onemocnění a nádorů ovarií a testes.

Klíčová slova:

LH receptor, polymorfizmus, populační studie, insLQ, Asn291Ser, Ser312Asn, OHSS, IVF, ART

Abstract

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is an iatrogenic potentially life-threatening complication of assisted reproduction techniques (ART). It is caused by an increased sensitivity of ovaries to gonadotropins administered during the controlled ovarian hyperstimulation (COH). Thus, the degree of ovarian response can be gently tuned by genetic polymorphisms of gonadotropins and their receptors.

The aim of this study is to ascertain the prevalence of polymorphisms Asn291Ser (rs1470652), Ser312Asn (rs2293275) and insLQ (insertion of leucine and glutamine, rs58356637) in the luteinizing hormone chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) gene in 102 Czech fertile men, 149 fertile women and 58 patients with serious grade of OHSS.

Detection of the Asn291Ser and Ser312Asn polymorphisms was performed using TaqMan SNP Genotyping Assays. The insLQ variation was detected by the capillary electrophoresis with fluorescence-labeled primers.

This study ascertained the prevalence of studied variants in Czech fertile population. Obtained results are in concordance with the majority of data from other European populations. There is no difference in prevalence between control-men and control-women. No relation to the development of OHSS was disclosed. The number of analyzed samples is too small for haplotype analysis. These data will be used for further association studies in dysfertility, hormone-dependent diseases and ovarian and testicular cancers.

Key words:

LH receptor, polymorphism, population study, insLQ, Asn291Ser, Ser312Asn, OHSS, IVF, ART

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam zkratek	9
1 Úvod	9
2 Cíle práce	11
3 Přehled literatury	12
3.1 Receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu (LHCGR)	12
3.1.1 Gen pro LHCGR	12
3.1.2 Proteiová struktura LHCGR	13
3.1.3 Funkce LHCGR	14
3.1.4 Mutace LHCGR	15
3.1.5 Polymorfizmy LHCGR	18
3.2 Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS)	22
3.2.1 Příznaky a klasifikace OHSS.....	22
3.2.2 Patogeneze OHSS.....	24
3.2.3 Léčba a prevence OHSS.....	26
3.2.4 Rizikové faktory OHSS.....	27
3.2.5 Genetické faktory ovlivňující OHSS.....	27
3.3 Principy vybraných používaných metod	31
3.3.1 Fragmentační analýza	31
3.3.2 Genotypizace pomocí TaqMan® MGB™ sond.....	32
4 Materiál a metody	35
4.1 Materiál	35
4.1.1 Vzorke DNA	35
4.1.2 Chemikálie.....	36
4.1.3 Roztoky	37
4.1.4 Komerční pufry a roztoky nezahrnuté v soupravách.....	37
4.1.5 Komerční soupravy	37
4.1.6 Enzymy	37
4.1.7 Standardy molekulových hmotností.....	37
4.1.8 Oligonukleotidové primery	38
4.1.9 TaqMan®MGB™ sondy a primery k detekci SNPs v genu pro LHCGR.....	39
4.2 Metody	39
4.2.1 Práce s DNA.....	39
4.2.2 Bioinformatické analýzy.....	45

5	Výsledky	49
5.1	Optimalizace primerů – teplotní gradientová elektroforéza.....	49
5.1.1	Primery pro detekci polymorfizmu insLQ.....	49
5.1.2	Primery pro sekvenaci 10. exonu.....	50
5.2	Polymorfizmus insLQ.....	51
5.2.1	Sekvenace úseku 1. exonu a detekce polymorfizmu insLQ.....	51
5.2.2	Distribuce polymorfizmu insLQ v závislosti na pohlaví.....	52
5.2.3	Srovnání výsledků populační studie polymorfizmu insLQ s ostatními evropskými studiiemi	53
5.2.4	Porovnání distribuce polymorfizmu insLQ u fertilních žen a pacientek s OHSS.....	54
5.2.5	Pacient P008A	55
5.3	Polymorfizmus Asn291Ser	56
5.3.1	Sekvenace 10. exonu a detekce polymorfizmu Asn291Ser	56
5.3.2	Distribuce polymorfizmu Asn291Ser v závislosti na pohlaví	57
5.3.3	Srovnání výsledků populační studie polymorfizmu Asn291Ser s ostatními evropskými studiiemi	58
5.3.4	Porovnání distribuce polymorfizmu Asn291Ser u fertilních žen a pacientek s OHSS.....	59
5.4	Polymorfizmus Ser312Asn	60
5.4.1	Sekvenace 10. exonu a detekce polymorfizmu Ser312Asn	60
5.4.2	Distribuce polymorfizmu Ser312Asn v závislosti na pohlaví	61
5.4.3	Srovnání výsledků populační studie polymorfizmu Ser312Asn s ostatními evropskými studiiemi	62
5.4.4	Porovnání polymorfizmu Ser312Asn u fertilních žen a pacientek s OHSS	63
5.5	Haplotypová analýza	64
6	Diskuze	66
7	Souhrn	73
8	Seznam použité literatury	74
9	Přílohy	I

Seznam zkratk

AC	adenylate cyclase	adenylát cykláza
AES	Androgen Excess Society	Spolek pro nadměrné množství Androgenů
AMP	adenosin monophosphate	adenosin monofosfát
ARO	Department of Anesthesiology and Resuscitation	anesteziologicko-resuscitační oddělení
ART	assisted reproduction techniques	techniky asistované reprodukce
ASRM	The American Society for Reproductive Medicine	Americká společnost pro reprodukční medicínu
COH	controlled ovarian hyperstimulation	kontrolovaná hyperstimulace ovarií
COS	fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue	buněčná linie podobná fibroblastům odvozená od ledvinných buněk kočkodana
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EPOS	Eindhoven Perimenopausal Osteoporosis Study	soubor bělošských žen s osteoporózou z Eindhovenu v Nizozemí
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology	Evropské společenství pro lidskou reprodukci a embryologii
FAM	fluorescein	fluorescein
FN Motol	University Hospital Motol	Fakultní nemocnice v Motole
FSH	follicle stimulating hormone	folikuly stimulační hormon
FSHR	follicle stimulating hormone receptor	receptor folikuly stimulačního hormonu
GnRH	gonadotropin releasing hormone	hormon uvolňující gonadotropiny
GPCR	G-protein coupled receptor	receptor spojený s G-proteiny
G-protein	guanine nucleotide regulatory protein	regulační protein obsahující guanin
hCG	controlled ovarian hyperstimulation	lidský choriový gonadotropin
HEK	human embryonic kidney	buněčná linie odvozená od lidských epiteliálních embryonálních ledvinných buněk
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium	Hardy-Weinbergova rovnováha
ICSI	intracytoplasmic sperm injection	intracytoplazmatická injekce se spermií
IL-6	interleukin 6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8	interleukin 8
IS	confidence interval	interval spolehlivosti
insLQ	insertion of leucine and glycine	inzerce leucinu a glycinu
IVF	in vitro fertilization	fertilizace in vitro
KB	1kbp DNA ladder	molekulární DNA žebřík s fragmenty lišícími se o 1kbp

LH	luteinizing hormone	luteinizační hormon
LHCGR	luteinizing hormone chorionic gonadotropin receptor	receptor luteinizačního hormonu a choriového gonadotropinu
LRR	leucine-rich repeats	opakující se oblasti bohaté na leucin
MGB	minor groove binder	molekula vázající se do malého žlábků DNA
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Národní centrum pro informace v oblasti biotechnologie
NFQ	non-fluorescence quencher	nefluorescenční zhášeč
NIH	National Institutes of Health	Národní institut zdraví
Ntc	no template control	kontrolní vzorek bez templátové DNA
OHSS	ovarian hyperstimulating syndrome	ovariální hyperstimulační syndrom
OR	odds ratio	poměr šancí
PCOS	polycystic ovary syndrome	syndrom polycystických ovarií
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
R	Rotterdam study	rotterdamská studie
RCOG	Royal College of Obstetrics and Gynecology	Královská společnost porodnictví a gynekologie
RFU	relative fluorescence unit	relativní fluorescenční jednotka
ROX™	karboxy-X-rhodamin	karboxy-X-rhodamin
SNP	single nucleotide polymorphism	záměna jednoho nukleotidu
Stp.	Stop codon	stop kodón, terminační kodón
STR	short tandem repeats	krátké tandemové repetice
TM	trans-membrane domain	trans-membránová doména
TSH	thyroid-stimulating hormone	tyreotropin
TSHR	thyroid-stimulating hormone receptor	tyreotropinový receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endoteliální růstový faktor
v-LH β	variant β subunit of luteinizing hormone	variantní β podjednotka luteinizačního hormonu
wt alela	wild-type allele	alela s referenční sekvencí

VIC fluorescenční barva patentovaná Applied Biosystems, její chemická struktura zatím není veřejně dostupná

Všeobecně známé zkratky (například jednotky SI a jednotky od nich odvozené, zkratky aminokyselin a bazí) zde nejsou vypsány.

1 Úvod

Podle současných odhadů postihuje neplodnost přibližně 15 % párů v reprodukčním věku (Altmae et al., 2011). Lze předpokládat, že toto číslo vzhledem k rozvoji takzvaných „civilizačních chorob“ jako je nadměrný stres, nespavost, kouření nebo špatná životospráva dále poroste. Ke snižování plodnosti přispívá i užívání genotoxických látek (drogy, cytostatika) nebo přítomnost hormonálních disruptorů v prostředí (pseudoeestrogeny ve vodě), ale také současné trendy moderního životního stylu odsouvající první dítě až do pozdějšího věku (průměrný věk prvorodičky v roce 2011 byl podle Českého statistického úřadu 27,8 let, pro porovnání: roku 2001 to bylo 25,3 a roku 1991 jen 22,4 let, www.czso.cz).

Techniky asistované reprodukce (ART, assisted reproduction techniques), tak stále nabývají na významnosti. Svědčí o tom i udělení Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu v roce 2010 prof. Robertu G. Edwardsovi za vývoj umělého oplodnění, které od té doby pomohlo milionům neplodných párů po celém světě. Již více než 25 let se techniky ART stále zdokonalují a dnes se ve vyspělých zemích pomocí in vitro fertilizace (IVF, in vitro fertilization, mimotělní oplodnění) rodí přibližně 2-3 % všech dětí (Gearhart & Coutifaris, 2011).

IVF probíhá v několika krocích. Prvním z nich je kontrolovaná hyperstimulace ovarií (COH, controlled ovarian hyperstimulation) při které je pomocí gonadotropinových hormonů (převážně pomocí folikuly stimulačního hormonu, FSH, follicle stimulating hormone) docíleno tvorby a zrání většího počtu Graafových folikulů (fyziologicky dozrává každý měsíc jeden s jedním oocytem). Pro finální maturaci oocytů je většinou aplikován lidský choriový gonadotropin (hCG, human chorionic gonadotropin). Následuje aspirace folikulární tekutiny s oocyty (odběr oocytů, oocyte pick-up) transvaginální punkcí vaječníků jehlou pod ultrazvukovou kontrolou v krátkodobé celkové anestezii. Získané oocyty jsou v laboratoři zkontrolovány a oplodněny – ať již prostým přidáním optimální dávky spermií nebo jednou konkrétní spermií pomocí intracelulární injekce (ICSI, intracytoplasmic sperm injection). Po několikadenní kultivaci (délka kultivace se liší dle použitého protokolu) jsou 1-3 vhodná embrya přenesena tenkou kanylou do dělohy (embryotransfer). Zbylá kvalitní embrya jsou uložena do tekutého dusíku (kryoprezervována) pro pozdější použití.

I přes neustálý vývoj musí být přibližně 15 % fertilizačních cyklů zrušeno kvůli velmi nízké odezvě ovarií na hormonální stimulaci (= maturují jen 3 folikuly nebo méně) nebo naopak kvůli vysokému riziku vzniku ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS, ovarian hyperstimulating syndrome), který je způsoben příliš bouřlivou reakcí na stimulaci (Courbiere et al., 2011). Přestože zrušení fertilizačního cyklu z důvodu nedostatečné ovariální odezvy je velmi nepříjemným krokem zatěžující psychiku pacientky, OHSS patří k vůbec nejzávažnějším

komplikacím provázejícím IVF, který ve svých závažných stupních může ohrozit i život ženy. Protože jeho přesná patogeneze není dosud zcela objasněna, je jeho léčba symptomatická a hlavní důraz je kladen především na prevenci. Cílem je identifikovat pacientky predisponované k nestandardní ovariální odezvě ještě před započítím léčby a individualizovat COH tak, aby úvodní dávka hormonů splnila terapeutický cíl a zároveň neohrožovala život pacientky.

Jednou z možných příčin individuální odezvy ovarií na stimulaci je různá citlivost receptoru folikuly stimulačního hormonu (FSHR, follicle stimulating hormone receptor), receptoru společného pro luteinizační hormon a lidský choriový gonadotropin (LHCGR, luteinizing hormone chorionic gonadotropin receptor) a vlastního luteinizačního hormonu (LH, luteinizing hormone). Protože mutace v těchto genech jsou velmi vzácné a většinou zásadně ovlivňují fertilitu mužů i žen, jsou tyto jemné rozdíly v citlivosti způsobené genovými polymorfizmy. Polymorfizmy v genu pro FSHR prokazatelně ovlivňují jeho citlivost a tím i ovariální odezvu v rámci COH. Je proto pravděpodobné, že budou mít podobný vliv na COH i polymorfizmy v genech pro LH a LHCGR, což doposud nebylo na dostatečně velkém počtu patientek vědecky prokázáno.

2 Cíle práce

- Stanovit prevalenci polymorfizmů insLQ (rs4539842), Asn291Ser (rs12470652) a Ser312Asn (rs2293275) v genu pro LHCGR v populaci českých fertálních žen a mužů.
- Zjistit, zda se liší získané genotypové a alelické frekvence mezi muži a ženami.
- Porovnat genotypové a alelické frekvence z české populace s výsledky z ostatních evropských studií.
- Stanovit prevalenci stejných polymorfizmů u 58 pacientek, u kterých se při IVF rozvinul III.–V.stupeň OHSS, výsledky porovnat s daty získanými u skupiny kontrolních žen a zjistit tak případný vliv těchto polymorfizmů na rozvoj OHSS.

3 Přehled literatury

3.1 Receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu (LHCGR)

3.1.1 Gen pro LHCGR

Gen pro LHCGR je umístěn na krátkém raménku 2. chromozomu - 2p21 (Rousseau-merck et al., 1990, Rodien et al., 1998), je dlouhý přes 70 kbp a obsahuje 11 exonů a 10 intronů. Prvních 10 exonů a část 11. exonu kóduje extracelulární doménu receptoru, zatímco celá transmembránová a intracelulární doména je kódována zbylou částí 11. exonu (Atger et al., 1995).

V lidských luteinizovaných granulózních buňkách a ve žlutém tělísku byly detekované čtyři různé sestřihové varianty LHCGR. Zdá se, že exprese kratších variant je regulovaná a ovlivňuje aktivitu a množství receptoru plné délky na povrchu buňky (Dickinson et al., 2009). Např. sestřihová varianta LHCGR bez 9. exonu produkovaná v ovariu zdravých žen s pravidelným menstruačním cyklem má nejspíše fyziologický význam pro modulaci aktivity LHCGR v průběhu menstruačního cyklu (Minegishi et al., 1997). Kratší forma LHCGR tvoří v endoplazmatickém retikulu komplexy s nematurovaným plně dlouhým LHCGR a redukuje tak jeho expresi na povrch buňky. Komplex takovýchto dvou receptorů je v lysozomu degradován (Nakamura et al., 2004).

Přítomnost určité kombinace sestřihových variant se u ženy ukazuje jako dobrý prediktivní marker úspěšného zakončení IVF cyklu těhotenstvím. Konkrétně kombinace sestřihových variant dlouhých 735bp a 621bp může regulací LHCGR plné délky přispívat k lepšímu mikroprostředí pro vývoj oocyty, což zvyšuje kvalitu vajíčka a následně i pravděpodobnost otěhotnění při IVF (Papamentzelopoulou et al., 2012).

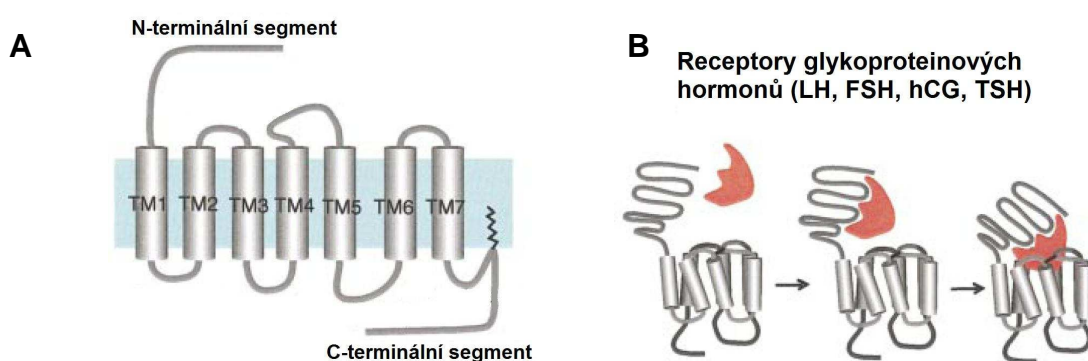
Varianty genu LHCGR s úplně chybějícím exonem 7, 8, 9 či 10 mají ale na fertilitu postižených jedinců závažný vliv (podrobněji v kapitole 3.1.4 Mutace LHCR, str. 16).

Z evolučního hlediska je LHCGR nejvíce podobný FSHR a receptoru tyreotropinu (TSHR, thyroid-stimulating hormone receptor). Všechny tři receptory patří do jedné z rodin receptorů spojených s G proteiny (G protein coupled receptor, GPCR; G protein = guanine nucleotide regulatory protein), pro kterou je charakteristická velká extracelulární N-terminální doména s oblastmi bohatými na leucin (leucine-rich repeats, LRR, Hsu, 2003). V nukleotidové sekvenci se v transmembránové doméně shodují v $\approx 70\%$, v extracelulární doméně v $\approx 40\%$ (Montanelli et al., 2004b). LHCGR a FSHR se v 7 transmembránových helixech sekvenčně shodují dokonce v 80% a v extracelulární doméně v 50% (Sprengel et al., 1990). Geny pro tyto dva receptory jsou na chromozomu umístěny 200 kbp od sebe

(Menon & Menon, 2012), což podporuje myšlenku vzniku těchto receptorů genovou duplikací.

3.1.2 Proteiová struktura LHCGR

Proteinový řetězec LHCGR se skládá z 699 aminokyselin (včetně krátkého signálního peptidu na N-konci proteinu), je velký 75,6 kDa (Minegish et al., 1990), maturovaný glykosylovaný protein prezentovaný na povrch buňky je velký 85-95 kDa (Ascoli et al., 2002). Proteinový řetězec se skládá z krátkého signálního peptidu, velké extracelulární N-terminální domény, 7 transmembránových α -helixů a krátké intracelulární C-terminální domény (obrázek 1, Ji et al., 1998, Minegish et al., 1990).



Obrázek 1. Obecná stavba receptorů spřažených s G-proteiny (A). Glykoproteinové hormony: luteinizační hormon (LH), folikuly stimulační hormon (FSH), lidský choriový gonadotropin (hCG) a tyreotropin (TSH) se váží na N-terminální segment receptoru. Segment s navázaným ligandem interaguje s exo-smyčkami transmembránové domény a generuje signál (B). TM značí transmembránové domény (Ji et al., 1998).

V extracelulární doméně LHCGR je 9 LRR ohraničených z obou stran oblastmi bohatými na cystein (Themmen, 2005). Zmíněné LRR jsou důležité pro vazbu ligandu, v tomto případě β -podjednotky LH nebo hCG. Po vazbě hormonu projde LHCGR konformační změnou a generuje signál (obrázek 1, Ji et al., 1998).

V buňce je přenosem signálu stimulována adenyl cycláza a při relativně vysoké koncentraci hormonu i fosfolipáza C. Předpokládá se, že je fosfolipáza C aktivována u žen jen těsně před ovulací nebo během těhotenství (Ascoli et al., 2002).

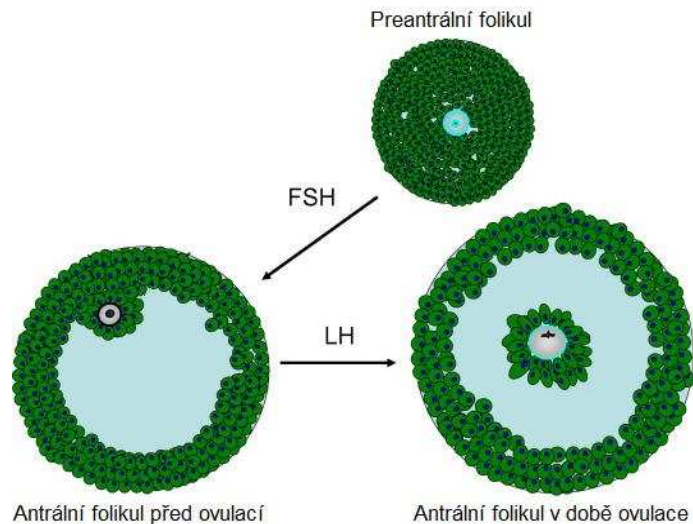
V LHCGR se vyskytují 4 typy posttranslačních modifikací: glykosylace, palmitoylace, fosforylace a ubiquitinylace. Glykosylace je zásadní pro správné složení proteinu díky interakci s chaperony. V LHCGR se vyskytuje 6 potencionálních glykosylačních míst na asparaginech. Palmitoylovány jsou dva konzervované cysteiny 643Cys a 644Cys na C-konci proteinu, což ovlivňuje cestu internalizovaného receptoru v buňce a umožňuje mu recyklaci zpět na buněčný povrch. Fosforylovány jsou nejčastěji serinové zbytky na C-konci receptoru po interakci s ligandem pod katalýzou GPCR kináz. Poslední posttranslační modifikací detekovanou u LHCGR je ubiquitinylace, která je obvykle spojována s degradací proteinu, ale je možné, že u LHCGR má roli i v endocytóze (Menon & Menon, 2012).

3.1.3 Funkce LHCGR

LHCGR je receptor společný pro LH (produkovaný hypofýzou) a hCG (produkovaný placentou v průběhu těhotenství). Rozdíl mezi LH a hCG je hlavně v době působení hormonu – LH má poločas života 25-30 min oproti přibližně 37 hodinám hCG. Jak elegantně formuloval Cole (2010), v mnoha ohledech je hCG „super LH“ produkované během těhotenství s 80x větší biologickou aktivitou než LH.

LHCGR je u žen primárně exprimovaný v granulózních a luteálních buňkách v ovariu, u mužů se nachází v Leydigových buňkách v testes, kde reguluje produkci testosteronu. Přítomnost LHCGR ale byla detekována i v některých tkáních mimo gonády: v játrech, děloze, nadledvinách, mozku nebo v kůži – zde je fyziologická funkce LHCGR předmětem výzkumu (Menon et al., 2005, Chui et al., 2009, Menon & Menon, 2012).

V ženských gonádách je LHCGR zcela zásadní pro maturaci oocytů a následnou ovulaci. Vývoj oocytů začíná v ovariu pod vlivem zvyšující se koncentrace FSH a estradiolu. To vede k postupné přeměně primárních folikulů v antrální a následně k indukci exprese LHCGR. LH zastavuje růst buněk závislých na FSH a aktivuje kaskádu procesů vedoucí k terminálnímu zrání folikulů, diferenciaci somatických buněk na luteální, k maturaci samotného oocytu a k ovulaci (obrázek 2). Ovulace je proces, při kterém se z ovaria uvolní vajíčko připravené na oplození. LH indukuje expresi genů potřebných k prasknutí folikulu a k přípravě děložní sliznice (Menon et al., 2005, Altmae et al., 2011, Conti et al., 2012). Podílí se také na tvorbě a udržení žlutého tělíska, ve kterém podporuje tvorbu progesteronu důležitého pro časnou fázi těhotenství (Buffet et al., 1998).

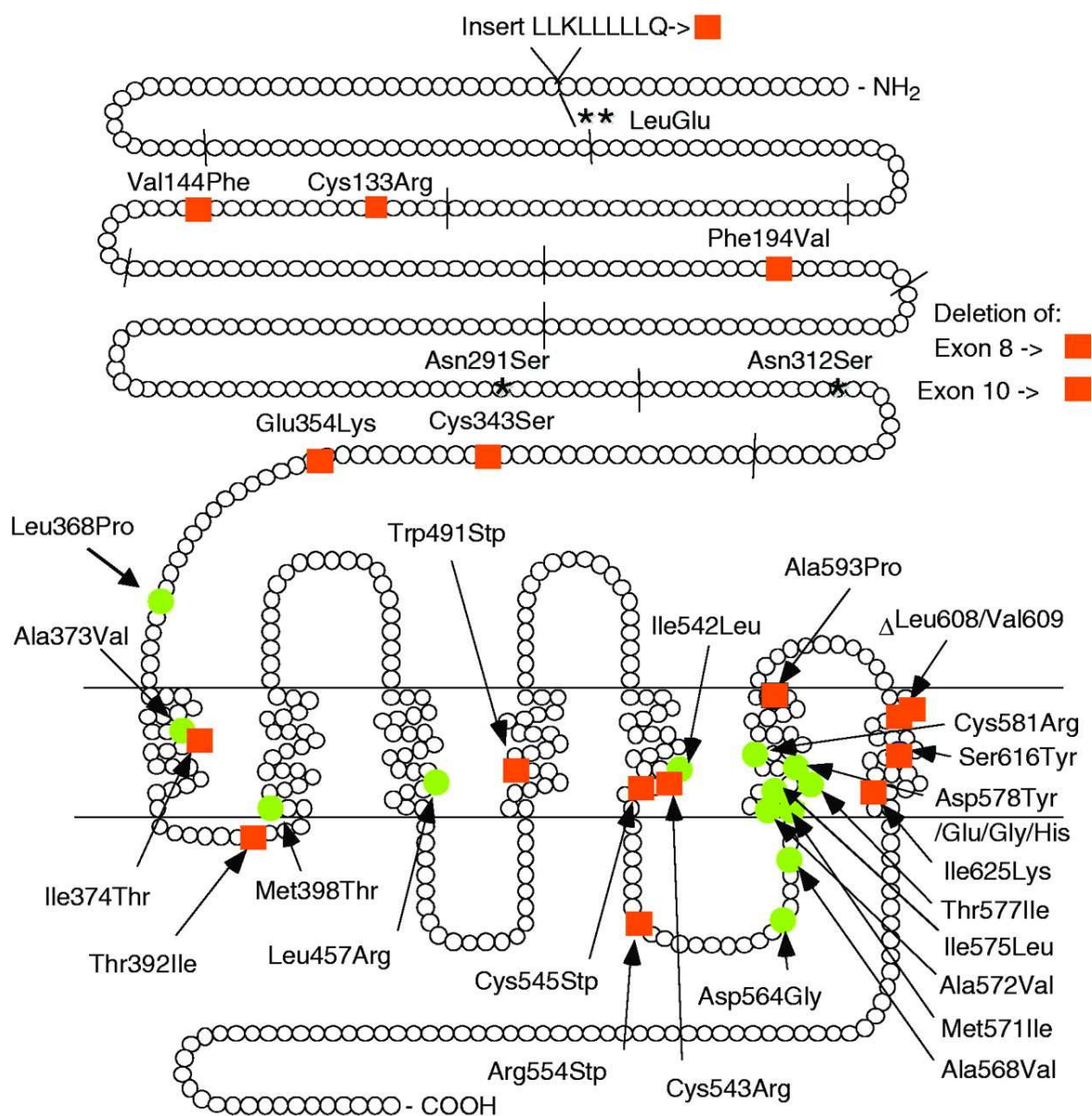


Obrázek 2. Schematická prezentace folikulů v různých stádiích vývoje s primárními regulačními signály. Preantrální folikuly reagují na FSH. Působení LH vede k rozvoji kumulárních buněk a zároveň ke zvětšení oocytu a znovuoobnovení meiózy. Zjednodušeno podle Conti et al. (2012).

Po oplození vajíčka přebírá úlohu tohoto hormonu hCG, který dále podporuje růst placenty spolu s plodem, stimuluje angiogenezi a produkci testosteronu, moduluje imunitní systém ženy a účastní se v dalších procesech důležitých pro udržení těhotenství (Cole, 2010).

3.1.4 Mutace LHCGR

Podle účinku na funkci receptoru se mutace v genu pro LHCGR dělí na inaktivační (narušují přenos signálu receptorem do buňky) a aktivační (aktivují receptor i bez stimulace ligandem). Polymorfizmů, které nemají na fenotyp nositele ani v homozygotním stavu ani u jednoho pohlaví zásadní vliv, je v kódující oblasti genu známo pouze několik. Známé mutace a polymorfizmy jsou zobrazeny na obrázku 3.



Obrázek 3. Mutace a polymorfizmy měnící sekvenci aminokyselin v genu pro receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu (LHCGR). Zelená kolečka značí aktivační mutace, červené čtverečky inaktivační mutace, černé hvězdičky polymorfizmy a Stp. vznik stop kodónu. Převzato z Themmen (2005).

Inaktivační mutace u mužů

Inaktivační mutace v genu pro LHCGR známe hlavně z příbuzenských sňatků nebo z malých vesnických komunit se zvýšeným rizikem pokrevní příbuznosti. U mužů vedou k autozomálně recesivní hypoplázii Leydigových buněk. Hypoplastické buňky nejsou schopné reagovat na mateřský hCG během embryonálního vývoje ani na LH v pubertě a produkovat tak testosteron pro vývoj mužského fenotypu a produkci spermatu. Pacienti s kompletní hypoplázií Leydigových buněk jsou XY muži s ženským fenotypem (mužský pseudohermafroditismus, Gromoll et al., 2000). U mírnějších forem se vyvíjí mikropenis (Latronico et al., 1996).

Inaktivační mutace jsou rozloženy v rámci celého proteinu (viz obrázek 3), nejčastěji se ale u pacientů vyskytují bodové mutace v 11. exonu (Kremer et al., 1995, Latronico et al., 1996, Richter-Unruh et al., 2002). Hypoplázii Leydigových buněk mohou způsobit i delece několika aminokyselin (delece 608Leu + 609Val v 7. transmembránovém helixu, Latronico et al., 1998) či celých exonů: exonu 7 (Qiao et al., 2009), exonu 8 (Laue et al., 1996b), exonu 9 (Nakamura et al., 2004) a exonu 10 (Gromoll et al., 2000). Jedna funkční alela LHCGR je ale pro normální fenotyp i fertilitu jedince dostatečná (Latronico et al., 1996, Gromoll et al., 2000).

Zajímavý je případ homozygotní delece 10. exonu u chlapce s mírnější formou hypoplázie Leydigových buněk – pacient byl fenotypově muž s hypogonadismem a narušenou tvorbou spermií. Desátý exon zasahuje extracelulární doménu zodpovědnou za specifickou vazbu hormonu a nejspíše za rozeznání LH od hCG. Mutovaný receptor byl stimulován mateřským hCG v průběhu těhotenství, proto se u pacienta vyvinul normální mužský fenotyp. Během puberty už ale receptor nebyl schopen na LH reagovat, což vedlo k hypogonadismu. U tohoto pacienta bylo možné zahájit léčbu podáváním hCG v dospělosti a zahájit tak spermatogenezi (Gromoll et al., 2000).

Inaktivační mutace způsobující hypoplázii Leydigových buněk mohou být způsobeny i insercemi, konkrétně insercí 33 nukleotidů mezi 54. a 55. nukleotid, způsobující vložení 11 aminokyselin mezi 18. a 19. aminokyselinu (Wu et al., 1998, Richter-Unruh et al., 2002), tedy do stejného místa, kde se vyskytuje běžná polymorfnní inserce leucinu a glycinu (Atger et al., 1995).

Inaktivační mutace u žen

Inaktivační mutace v genu pro LHCGR na první pohled fenotyp žen nenarušují – mají normální ženskou vizáž, v pubertě dochází ke spontánnímu růstu prsů a pubického ochlupení, menarche je normální nebo opožděná. V dospělosti ale mají nepravidelný menstruační cyklus, normální nebo zvětšená ovaria s cystami a díky chybějící ovulaci jsou

neplodné. Přirozeně se vyskytující homozygotní mutace v genu pro LHCGR jsou u žen velice vzácné, doposud byly dokumentovány pouze u 7 žen (Arnhold et al., 2009, Yariz et al., 2011, Bentov et al., 2012), z toho první 4 ženy byly zachyceny jen díky tomu, že jsou sestrami pacientů s hypoplázií Leydigových buněk a byly tedy analyzovány v rámci genotypizace celé rodiny (Arnhold et al., 2009).

V roce 2011 byl zveřejněn případ dvou neplodných sester z malé turecké vesnice, u kterých selhalo několik cyklů IVF s diagnózou syndromu prázdných folikulů. Tento syndrom se objevuje u ≤ 1 až u 7 % pacientek podstupující IVF a je charakterizován kvalitní odezvou na stimulaci FSH a následným neúspěchem odběru oocytů po podání hCG. To může mít mnoho různých příčin, jako jsou technické chyby při odběru, chyby ve stimulačním protokolu (ohledně množství i načasování dávek hormonů) a další. U těchto sester byla detekována homozygotní mutace Asp400Ser v genu pro LHCGR. In vitro studie odhalily neobvyklé skládání proteinu se sníženou afinitou receptoru k hCG (Yariz et al., 2011).

Doposud poslední případ ženy s inaktivační mutací v genu pro LHCGR pochází z USA. I u této ženy selhalo několik cyklů IVF a následně u ní byla detekovaná mutace v genu pro LHCGR – tentokrát inserce leucinu a prolinu za 18. aminokyselinou pozicí (CTGCCG) (Bentov et al., 2012). V této pozici se běžně vyskytuje polymorfni inserce leucinu a glycinu (CTGCAG), která na fertilitu jedince nemá zásadní vliv (Atger et al., 1995). Prolin má ale větší vliv na trojrozměrnou strukturu proteinu než glycin. Pacientka měla mutovanou pouze jednu alelu, druhá alela byla standardní (Bentov et al., 2012). To vysvětluje odběr alespoň několika oocytů po stimulaci, zároveň však pokládá otázku, proč měla jedna mutantní alela na fenotyp pacientky takový vliv, když od rodičů pacientů s hypoplázií Leydigových buněk víme, že jedna funkční alela je pro zdravý fenotyp a fertilitu jedince naprosto dostačující (Latronico et al., 1996, Gromoll et al., 2000). Je tedy možné, že pacientka měla 2. alelu genu pro LHCGR mutovanou v nesequenované oblasti.

Aktivační mutace u mužů

Aktivační mutace genu pro LHCGR se u mužů projevuje zvýšeným množstvím testosteronu v těle nezávisle na hladině LH v krvi. To má za následek předčasnou pubertu s nástupem do 3-4 let věku chlapce včetně předčasné maturace kostí, vývinu pubického ochlupení a zvětšení penisu. Při biopsii testes je zřejmá hyperplazmie Leydigových buněk. Jedná se o bodové mutace v 11. exonu, nejčastěji v VI. transmembránovém helixu (obrázek 3, Laue et al., 1995, Laue et al., 1996a), ale nedávno byla detekovaná i mutace v VII. transmembránovém helixu (Nagasaki et al., 2010). Všechny mutace vykazovaly autozomálně dominantní dědičnost.

Aktivační mutace u žen

U žen je výskyt aktivačních mutací v genu pro LHCGR doložen zatím pouze u matek chlapců s předčasnou pubertou (Rosenthal et al., 1996, Jeha et al., 2006). Na rozdíl od chlapců ale tato mutace zřejmě nemá na fenotyp ženy vliv – funkce ovaríí je normální, stejně jako hladiny LH, FSH a androgenů v průběhu menstruačního cyklu (Rosenthal et al., 1996, Jeha et al., 2006). Zdá se tedy, že u žen po pubertě působí nějaký záložní mechanismus, který reguluje funkci ovaríí a je schopen kompenzovat zvýšenou aktivitu LHCGR (Latronico et al., 1998).

Jediný zatím dokumentovaný případ aktivační mutace u ženy s patologickým vlivem na fenotyp pochází z roku 2000 od Akermana s kolegy (Akerman et al., 2000). Ti popisují ženu, u které se po spontánním početí samovolně rozvinul vážný stupeň OHSS. Pomocí porovnávání jejího vzoru na elektroforetogramu po amplifikaci několika páry primerů se vzorem zdravých jedinců určili přibližnou polohu aktivační mutace na rozhraní 10. intronu a 11. exonu genu pro LHCGR (Akerman et al., 2000). Tato mutace ale později nebyla blíže určena ani potvrzena, stejně jako nebyl doložen fenotyp chlapce, který se této ženě narodil (pokud by zdědil mutovanou alelu, měla by se u něj objevit předčasná puberta).

3.1.5 Polymorfizmy LHCGR

Mezi tři nejčastější polymorfizmy vyskytující se v genu pro LHCGR patří inserce 6 nukleotidů v 1. exonu genu vedoucí k inserci leucinu a glycinu za 18. aminokyselinu (v odborné literatuře věnující se tomuto tématu běžně označovaná jako insLQ) a dvě jednonukleotidové záměny v 10. exonu měnící sekvenci aminokyselin na 291. a 312. aminokyselinové pozici (Asn291Ser a Ser312Asn). Polymorfismus insLQ se nachází v sousedství signálního peptidu, Asn291Ser a Ser312Asn jsou lokalizovány v těsné blízkosti glykosylačních míst – tyto tři polymorfizmy tak mohou mít vliv na citlivost LHCGR k LH a hCG a byly proto vybrány pro studium ve vztahu k rozvoji OHSS.

Polymorfismus insLQ (rs4539842)

Inserce leucinu a glycinu za 18. aminokyselinovou pozici od N-konce proteinu v genu pro LHCGR (ins18LQ, běžně označované i zkráceně insLQ) je způsobena insercí 6 nukleotidů za 54. nukleotid (n.54insCTGCAG, obrázek 4), tedy blízko předpokládaného místa štěpení signální sekvence (Atger et al., 1995). V Evropě se vyskytuje v 26,4 – 29,2 % (Simoni et al., 2008, Capalbo et al., 2012), u Japonců úplně chybí (Rodien et al., 1998). Při srovnání s aminokyselinovou sekvencí LHCGR u kosmanů se zdá, že varianta genu s insercí insLQ je

evolučně původnější a její absence u Japonců je způsobena efektem zakladatele (Rodien et al., 1998).

11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26.
CTG AAG CTG CTG CTG CTG CTG CAG - - - - - CCG CCG CTG CCA CGA GCG CTG CGC
CTG AAG CTG CTG CTG CTG CTG CAG **CTG CAG** CCG CCG CTG CCA CGA GCG CTG CGC

Obrázek 4. Zobrazení polymorfizmu insLQ v nukleotidové sekvenci. První řádek označuje pozice aminokyselin v proteinu, ve druhém řádku je referenční sekvence receptoru, ve třetím řádku je sekvence receptoru s inzercí leucinu a glutaminu (insLQ), samotná inserce je zvýrazněna červeně.

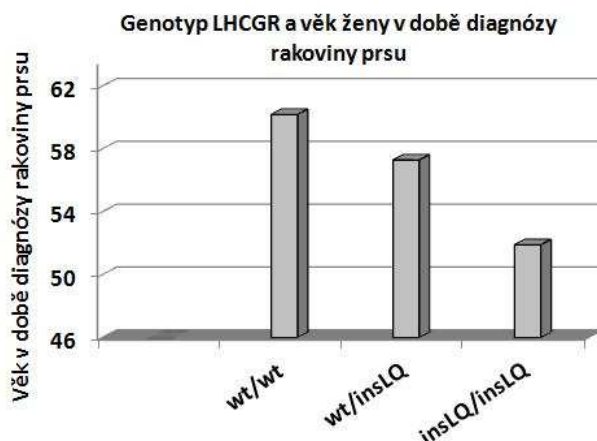
První studie *in vitro* na COS-7 buňkách (buněčná linie podobná fibroblastům odvozená od ledvinných buněk kočkodana) žádné funkční rozdíly mezi alelami bez a s inzercí neukázala (Rodien et al., 1998). Pozdější experimenty na HEK293 buňkách (buněčná linie odvozená od lidských embryonálních epiteliálních ledvinných buněk) prokázala zvýšenou aktivitu receptoru LHCGR s inzercí insLQ. Vazebná afinita k hCG přitom zůstal nezměněna. Jemná změna v hydrofobicitě způsobená insLQ tak zřejmě zvyšuje efektivitu signálního peptidu. To sice nezvyšuje expresi receptoru jako takovou, ale pravděpodobně mění kvalitu proteinu díky malým změnám ve skládání a glykosylaci (Piersma et al., 2006). Další, 33 nukleotidová inserce do stejného místa (Wu et al., 1998, Richter-Unruh et al., 2002) nejspíše mění sousedství signálního peptidu tak moc, že se signální peptid stává nefunkčním (Piersma et al., 2006).

Vliv alely insLQ na aktivitu LHCGR podporují i studie zaměřené na výskyt této alely u pacientek s hormonálně-dependentními nemocemi. Větší množství estrogenů produkovaných pod kontrolou LH má karcinogenní účinky na prsní tkáň (Piersma et al., 2006). Přítomnost alely insLQ sice samotné riziko vzniku rakoviny prsu neovlivňuje (Powell et al., 2003, Piersma et al., 2006, Piersma et al., 2007a), ale pokud už se rakovina u ženy objeví, jedná se o agresivnější formu (větší tumory, diagnóza rakoviny v nižším věku - obrázek 5, Powell et al., 2003). U pacientek s alelou insLQ byla zaznamenána i rychlejší recidiva této nemoci (Piersma et al., 2007a).

U pacientek se syndromem polycystických ovaríí (PCOS, polycystic ovary syndrome) spojení s výskytem insLQ alely nebylo prokázáno (Valkenburg et al., 2009, Capalbo et al., 2012), stejně jako nebylo prokázáno spojení s poruchou sestupu varlat do šourku v embryonálním vývoji u mužů (Simoni et al., 2008).

Ve vztahu k IVF a rozvoji OHSS byl polymorfismus insLQ studován zatím jen Kerkelou s kolegy ve Švédsku (Kerkela et al., 2007). V souboru 21 pacientek s vážným stupněm OHSS se sice insLQ alela vyskytovala častěji než u 51 kontrolních žen, které také podstoupily IVF ale OHSS se u nich nerozvinul (40,5 % oproti 27,5 %), závislost rozvoje OHSS na přítomnosti insLQ alely ale nebyla statisticky významná (Kerkela et al., 2007). To ale mohlo být

způsobeno příliš malou velikostí souboru, proto je v této diplomové práci pracováno s větším množstvím vzorků.



Obrázek 5. Genotyp receptoru pro luteinizační hormon a lidský choriový gonadotropin (LHCGR) a průměrný věk žen v době diagnózy rakoviny prsu. Ženy homozygotní pro alelu charakterizovanou inzercí LQ do genu pro LHCGR (insLQ) byly v době diagnózy rakoviny prsu mladší průměrně o 8,3 let oproti pacientkám homozygotním pro alelu s referenční sekvencí (wt, z anglického wild-type, převzato z Powell et al., 2003).

Polymorfismus Asn291Ser (rs12470652)

Polymorfismus Asn291Ser je způsoben jednonukleotidovou záměnou na 872. nukleotidové pozici (c.A872G) vedoucí k záměně serinu za asparagin na 291. aminokyselinové pozici (p.Asn291Ser). Výskyt 291Ser alely se velmi liší podle etnického původu. U evropského bělošského obyvatelstva se vyskytuje u 2,9 (ženy ze Sardinie, Capalbo et al., 2012) – 6,5 % (muži z Německa, Simoni et al., 2008). U Afro-Američanů se 291Ser alela vyskytuje v 0,9% a u obyvatel Číny nebyla detekována vůbec (Piersma et al., 2007b). Nepřítomnost alely 291Ser u Číňanů a její nízká prevalence u Afro-Američanů je pravděpodobně dána relativně nedávným vznikem tohoto polymorfismu mutací u bělošského obyvatelstva (Piersma et al., 2007b).

Transfekční studie na HEK293 buňkách odhalily mírné zvýšení citlivosti receptoru díky změněné glykosylaci 291Ser alely. Standardní 291Asn alela je glykosilována. Alela 291Ser glykosylaci postrádá a tím usnadňuje interakci transmembránové domény LHCGR s doménou vázající hormon (obrázek 1). Alela 291Ser přitom nemá vliv na míru exprese LHCGR ani na jeho afinitu k ligandu, zřejmě ovlivňuje pouze přenos signálu (Piersma et al., 2007b).

Přestože in-vitro studie ukazují změnu aktivity receptoru, studie zaměřené na vliv polymorfismu Asn291Ser na rozvoj rakoviny prsu (Piersma et al., 2007b), na PCOS u žen (Capalbo et al., 2012) a na vztah s maldescensus testis u mužů (Simoni et al., 2008) žádnou souvislost neprokázaly. To může být způsobeno vzácností 291Ser v populaci. Je možné, že při větším počtu pacientek by asociace byla zřetelná (Capalbo et al., 2012).

Polymorfismus Ser312Asn (rs2293275)

Polymorfismus Ser312Asn je způsoben záměnou jednoho nukleotidu na 935. nukleotidové pozici (c.G935A) vedoucí k záměně asparaginu za serin na 312. aminokyselinové pozici od N-konce proteinu (p.Ser312Asn). Výskyt Asn alely je silně etnicky závislý. U bělošského obyvatelstva z Evropy se vyskytuje ve 35 (ženy ze Sardinie, Capalbo et al., 2012) – 42,3 % (ženy z Nizozemí, Piersma et al., 2007b). U Afro-Američanů byla Asn alela detekována u 71,1 %, zatímco u Číňanů jen v 6,9 % (Piersma et al., 2007b).

Transfekční studie na HEK293 buňkách žádné změny v aktivitě LHCGR in vitro neukázaly (Piersma et al., 2007b), přesto je přítomnost 312Asn alely spojována s vyšším rizikem vzniku rakoviny prsu (Piersma et al., 2007b). Ve vztahu k rozvoji PCOS jsou výsledky zatím prvních dvou studií na toto téma protichůdné (Valkenburg et al., 2009, Capalbo et al., 2012). U mužů je výskyt alely 312Asn asociován s poškozením spermatogeneze (Simoni et al., 2008).

3.2 Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS)

OHSS je nejčastější iatrogení komplikací ART, v ojedinělých případech se ale může objevit i po spontánním početí (Ayhan et al., 1996, Chae et al., 2001, Cepni et al., 2006, Di Carlo et al., 2012). V rámci ART je způsoben bouřlivou reakcí na stimulaci ovaríí gonadotropními hormony v první fázi IVF. Ve svém středně závažném stupni se OHSS vyskytuje v 5,9 – 9,4 % (Serour et al., 1998, Wang et al., 2002), v těžkém stupni v 1,1 – 4,2 % všech IVF cyklů (Enskog et al., 1999, Papanikolaou et al., 2005, Courbiere et al., 2011). Jde o dynamický stav, který se postupně vyvíjí a v těžkém stupni může skončit až smrtí pacientky (Serour et al., 1998, Memarzadeh, 2010).

3.2.1 Příznaky a klasifikace OHSS

OHSS má řadu různých příznaků od slabé nevolnosti a mírné bolesti břicha až po život ohrožující stav vyžadující hospitalizaci (ASRM, 2008). Hlavním rysem OHSS jsou zvětšená ovária a zvýšená permeabilita kapilár. S rostoucí závažností OHSS roste i počet zasažených orgánů, v kritické fázi jsou díky hemokoncentraci a snížené perfuzi zasaženy ledviny, játra, srdce a mozek, což může vést k jejich selhání a smrti ženy (Fiedler & Ezcurra, 2012). K tomu se připojují další komplikace jako syndrom dechové tísně, krvácení z prasknutého ovaria nebo tromboembolické příhody (Chen et al., 2012).

Pro včasné rozeznání zhoršujícího se stavu a nastavení odpovídající léčby bylo postupně sestaveno několik klasifikací OHSS. Původní systém založený na laboratorních a klinických parametrech (Rabau et al., 1967) byl s rozvojem transvaginální ultrasonografické techniky a postupu měření koncentrace estradiolu a progesteronu v krevním séru několikrát přepracován (Schenker & Weinstein, 1978, Golan, 1989, Navot et al., 1992, Mathur, 2005). I poslední doporučovaná klasifikace z roku 2009 (tabulka 1, Golan & Weissman, 2009a), která byla použita pro určení stupně OHSS u pacientek v této studii, je stále předmětem diskuze (Golan & Weissman, 2009a, Golan & Weissman, 2009b, Mathur & Jenkins, 2009).

Druhou možností klasifikace OHSS je jeho dělení dle doby nástupu příznaků na časnou a pozdní formu. Časná forma OHSS se vyskytuje v 1,2 – 5,6 %, pozdní forma u 0,9 – 3,7 % všech IVF cyklů (Mathur et al., 2000, Papanikolaou et al., 2006, Mishra et al., 2013).

Časná forma OHSS se projevuje do 9. dne od odběru oocytů a je způsobena reakcí na dávku injikovaného hCG pro finální maturaci oocytů. Je spojovaná s větším množstvím odebraných oocytů a tím i s větší citlivostí ovaríí na stimulaci (Mathur et al., 2000, Papanikolaou et al., 2005, Mishra et al., 2013). Zároveň se u ní objevuje i vyšší riziko preklinických potratů (Papanikolaou et al., 2005). K časně formě OHSS jsou náchylnější pacientky s PCOS (Mathur et al., 2000).

Klasifikace OHSS podle závažnosti	
Stupeň OHSS	Příznaky
Mírný OHSS	
I	Napnutá stěna břišní, mírná bolest břicha
II	Příznaky I. stupně plus: Nevolnost Zvracení a/nebo průjem Zvětšená ovária dosahující velikosti 5-12 cm
Střední OHSS	
III	Příznaky II. stupně plus: Ultrazvukové známky ascitu
Těžký OHSS	
IV	Příznaky III. stupně plus: Klinické známky ascitu a/nebo hydrothorax Potíže s dýcháním
V	Příznaky IV. stupně plus: Změny objemu krve Zvýšená viskozita krve díky hemokonztraci Abnormality ve srážení krve Snížená perfuze ledvin a i tím jejich omezená funkce
VI	Příznaky V. stupně plus: Oligurie/Anurie (vytvoření méně než 500 ml/žádné moči za 24h) Ascites s napnutou stěnou břišní Anasarka (vodnatelnost a povšechný otok tkání) Kritická hemokonztrace (hematokrit > 55%) Trombóza cév Syndrom dechové tísně Selhání ledvin

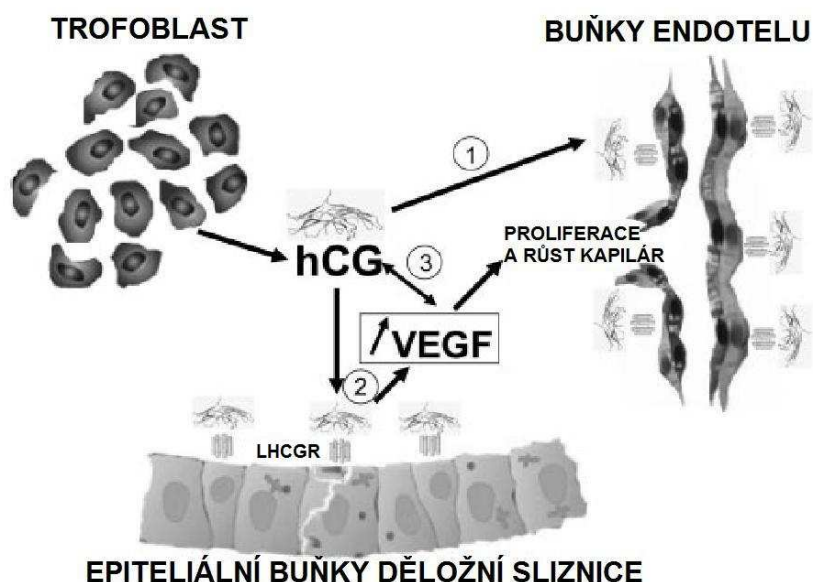
Tabulka 1. Klasifikace závažnosti ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS) podle nové úpravy z roku 2009. Pro zařazení do určitého stupně syndromu se u pacientky nemusí objevit všechny obecně uznávané příznaky. Zároveň je potřeba brát v úvahu i to, že je OHSS dynamický stav, který se může rychle změnit. (Golan & Weissman, 2009a).

Pozdní forma OHSS se vyskytuje 10. den od odběru oocytů nebo později a je spojena s těhotenstvím, zvláště vícečetným. Je způsobena endogenním hCG produkovaným implantujícím se embryem/embryi, případně hCG podaným později pro podporu luteální fáze. Pozdní forma OHSS se častěji rozvine do závažných stupňů.

Klasifikace OHSS na časnou a pozdní formu je výhodná zvláště pro prognózu dalšího vývoje stavu pacientky (Mathur et al., 2000, Papanikolaou et al., 2005, Mishra et al., 2013).

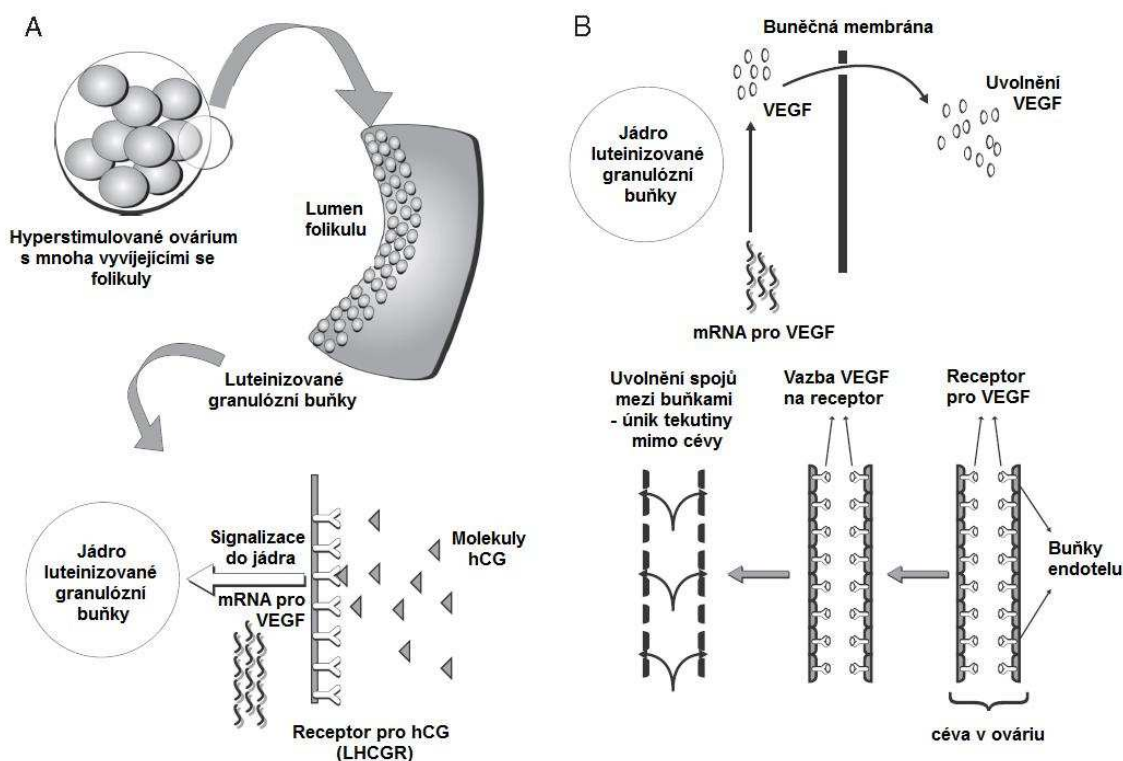
3.2.2 Patogeneze OHSS

Přesná patogeneze OHSS není ani přes rozsáhlý výzkum zcela objasněna. Hlavními složkami OHSS jsou zvětšená ovária a zvýšená kapilární permeabilita (Levin et al., 1998). Zvětšená ovária jsou způsobena hlavně hyperstimulací v rámci IVF. Kapilární permeabilitu má na svědomí zvýšená produkce angiogenních molekul, kterou stimuluje hCG (ať už endogenního či exogenního původu) a hraje tak roli ve spouštění OHSS (Mishra et al., 2013). Vliv hCG je pro úspěšný vývoj embrya ale zásadní, ve spontánním těhotenství je proto produkován trofoblastem ještě před implantací, aby podpořil extenzivní angiogenezi v endometriu v blízkosti místa implantace. Vše je založeno na precizní synchronizaci. Stimulace angiogeneze tak může být výsledkem parakrinního dialogu mezi trofoblastem, epiteliálními a endoteliálními buňkami pomocí hCG a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor, obrázek 6, Berndt et al., 2006).



Obrázek 6. hCG hraje klíčovou roli v synchronizaci trofoblastu, endotelu a epitelu děložní sliznice. Angiogenická aktivita hCG během implantace: 1) přímý efekt hCG na angiogenezi přes interakci s LHCGR na povrchu endotelu. 2) nepřímý efekt hCG na angiogenezi přes smyčku zahrnující zvýšenou produkci VEGF děložní sliznicí. 3) přídavný efekt hCG a VEGF ve stimulaci růstu kapilár. hCG = lidský choriový gonadotropin, LHCGR = receptor společný pro luteinizační hormon a hCG, VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor. Převzato z Berndt et al. (2006).

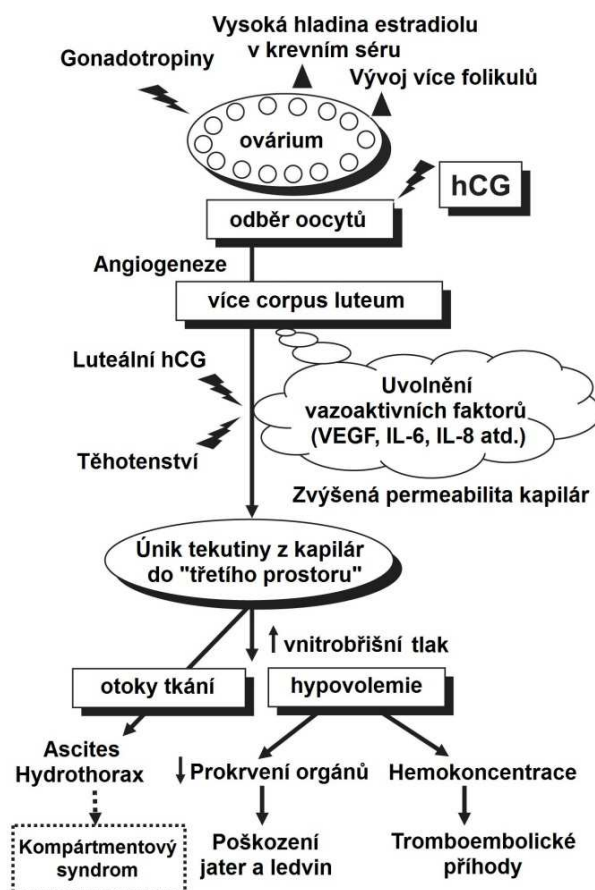
Při ART se hCG pacientce podává pro indukci finální maturace oocytů (Cerrillo et al., 2011). Za hlavní angiogenní molekulu způsobující akutní nárůst kapilární permeability byl označen VEGF, který prokazatelně stimuluje proliferaci endotelu a angiogenezi, zrovň jeho hladina v krvi koreluje se stupněm ovariální odezvy a případně se závažností OHSS (Levin et al., 1998, McClure et al., 1994). VEGF je v luteinizovaných granulózních buňkách produkován pod přímým vlivem hCG (obrázek 7, Wang et al., 2002, Lee et al., 1997).



Obrázek 7. Efekt VEGF produkovaného pod vlivem hCG. Lidský choriový gonadotropin (hCG, human chorionic gonadotropin) stimuluje velké množství granulóznic, což vede ke zvýšené produkci mRNA vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor, **A**). Působení hCG zároveň stimuluje produkci receptoru VEGF na granulóznicích a endoteliálních buňkách. Velké množství VEGF uvolňované granulózními buňkami se váže na své receptory na membránách endoteliálních buněk a následná signalizace zvyšuje vaskulární permeabilitu (**B**). LHCGR = receptor luteinizačního hormonu a zároveň hCG, mRNA = mediátorová ribonukleová kyselina. Upraveno podle Fiedler & Ezcurra (2012).

Vysoká permeabilita kapilár u OHSS umožňuje přesun tekutin z krevního řečiště do „třetího prostoru“ (hlavně do břišní dutiny). To má za následek tvorbu ascitu (volná tekutina v břišní dutině), případně hydrothoraxu (tekutina v pleurální dutině na plicích), dehydrataci a hemodynamické změny. Nižší krevní tlak může způsobit tachykardii (zrychlení srdeční frekvence), snížené prokrvení ledvin a hemokoncentraci vedoucí k tromboembolickým příhodám a elektrolytické nerovnováze. Ascites zvyšuje tlak uvnitř břišní dutiny, což ovlivňuje homeostázu dýchacího, trávicího a kardiovaskulárního ústrojí, ledvin a jater (obrázek 8, Chen et al., 2011). Množství přesunutá tekutiny určuje míru závažnosti OHSS.

Přestože hlavní linie patogeneze OHSS již byla načrtnuta, nelze zapomínat, že se jedná o velmi komplexní onemocnění, jehož vznik a průběh mohou ovlivňovat i další faktory včetně zánětlivých mediátorů, estradiolu nebo renin-angiotensinového systému (Nastri et al., 2010).



Obrázek 8. Patofyziologie ovariálního hyperstimulačního syndromu. hCG = lidský choriový gonadotropin, human chorionic gonadotropin; IL-6 = interleukin 6; IL-8 = interleukin 8; VEGF = vaskulární růstový endoteliální faktor, vascular endothelial growth factor. Převzato z Chen et al. (2011).

3.2.3 Léčba a prevence OHSS

Většina případů OHSS odezní spontánně do několika dní, ale mohou trvat i déle – zvláště, pokud žena otěhotní (ASRM, 2008). Mírný a většinu středních stupňů OHSS lze léčit ambulantně léky na zmírnění nevolnosti a bolesti, dokud syndrom samovolně neodezní. Důležité jsou pravidelné kontroly, ve kterých je případně včas rozeznán přechod do těžkého stupně s nutnou hospitalizací (RCOG, 2006).

Zcela nejspolehlivější léčbou pacientky s těžkým stupněm OHSS je umělé přerušení těhotenství, to je ale vzhledem k psychické i finanční zátěži ženy až poslední volbou (Gera et al., 2010, Fiedler & Ezcurra, 2012). Standardní léčba i těžkých stupňů je proto jen symptomatická, vyžaduje však hospitalizaci na oddělení ARO (anesteziologicko-resuscitační oddělení).

Důraz je proto kladen především na prevenci, která spočívá ve včasném rozeznání rizikových faktorů ještě před zahájením léčby a vede k individualizaci počáteční dávky gonadotropinů tak, aby bylo podáno minimální možné množství pro úspěšnou COH (Ocal et al., 2011). Zcela klíčová je přitom dobrá informovanost obou partnerů a pozorná péče ošetřujícího lékaře.

3.2.4 Rizikové faktory OHSS

Americká společnost pro reprodukční medicínu (ASRM, The American Society for Reproductive Medicine) udává ve své vzdělávací příručce 6 rizikových faktorů (ASRM, 2008):

- PCOS
- výskyt OHSS v anamnéze pacientky
- nízký věk
- nízká tělesná váha
- vyšší dávka exogenních gonadotropinů podaných při COH (FSH)
- vysoká absolutní hladina estradiolu v krevním séru nebo její prudký nárůst

Většina rizikových faktorů je stále předmětem diskuse, všeobecně uznávané jsou zatím pouze předchozí epizody OHSS u pacientky a PCOS (Papanikolaou et al., 2006, Delvigne, 2009, Swanton et al., 2010). Nízká tělesná váha je v některých studiích s rizikem výskytu OHSS spojována (Courbiere et al., 2011), jiné studie tuto závislost nepotvrzují (Enskog et al., 1999, Papanikolaou et al., 2006, Ocal et al., 2011). Podobná situace je i u využití nízkého věku jako rizikového faktoru, kde je problém i s určením věkové hranice (Delvigne, 2009).

Kromě hladiny estradiolu v krevním séru, která v některých studiích s rozvojem OHSS souvisí (Leeh et al., 2008) a v jiných ne (Papanikolaou et al., 2006), se ukazuje jako dobrá známka míry ovariální odezvy i počet antrálních folikulů (Ocal et al., 2011, Alviggi et al., 2012) a hladina anti-müleriálního hormonu v séru (Nakhuda et al., 2006, Leeh et al., 2008, Ocal et al., 2011).

Nebezpečí rozvoje OHSS bylo spojováno i se zvýšeným výskytem alergií mezi pacientkami s OHSS (Enskog et al., 1999), s hladinou VEGF v krvi v den podání hCG (Manau et al., 2007), s nízkou hladinou nebo nedetekovatelným komplexem LH-LHCGR cirkulujícího v krvi (Chambers et al., 2011) a s krevní skupinou A u bělošských žen u časně formy OHSS (Binder et al., 2008b). Význam těchto markerů je nutné ještě potvrdit v dalších studiích. Nově byl také studován proteom z folikulární tekutiny s cílem odhalit proteiny s rozdílnou expresí u pacientek se závažným stupněm OHSS a bez OHSS. Skupina postupně identifikovala tři kandidátní proteiny (ceruloplasmin, komplement C3 a kininogen-1), které dále podrobně zkoumají (Jarkovska et al., 2011).

3.2.5 Genetické faktory ovlivňující OHSS

I přes dobré výsledky testů před IVF některé ženy neodpovídají na stimulaci v rámci COH přiměřeně, mají nízkou míru implantace a počet otěhotnění. Jednou z příčin mohou být genetické predispozice, jemně modelující ovariální odezvu pacientky a tím i váhu a interpretaci ostatních biomarkerů. Protože gonadotropiny se využívají v průběhu COH

a varianty v jejich genech mají vliv na plodnost, jsou právě tyto geny dobrými kandidáty pro další studium.

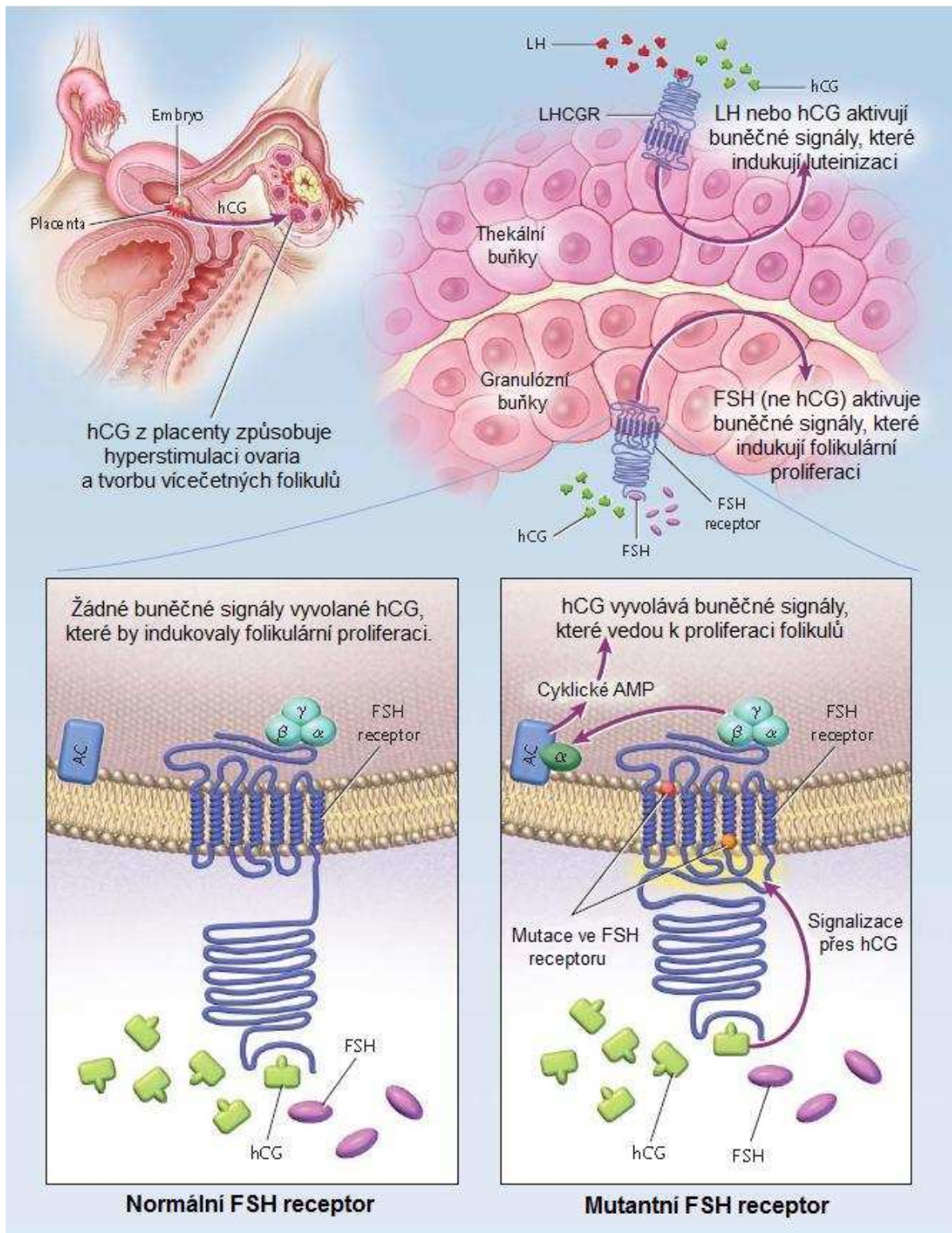
Nejnámější je vliv mutací v genu pro FSHR na rozvoj spontánní formy OHSS. Ve třech případech měly pacientky heterozygotní aktivační mutaci v transmembránové doméně receptoru (Thr449Ala, Thr449Ile a Asp567Asn), zvyšující bazální aktivitu receptoru a zároveň umožňující jeho aktivaci nejen pomocí FSH, ale i hCG a TSH. Podle všech zpráv se OHSS rozvinulo i v těhotenství všech sester pacientek se stejnou mutací (Smits et al., 2003, Vasseur et al., 2003, Montanelli et al., 2004a). Pravděpodobný princip působení mutací v genu pro FSHR vystihuje obrázek 9.

Akerman s kolegy dokumentuje i případ spontánní formy OHSS způsobené heterozygotní aktivační mutací v genu pro LHCGR u pacientky těhotné s jedním dítětem (Akerman et al., 2000). Tato mutace ale nebyla přesně určena a její vliv na spontánní formu OHSS nebyl potvrzen (podrobněji v kap. 3.1.4 Mutace LHCGR, strana 18).

Protože mutace mají zásadní vliv na funkci receptoru, je pravděpodobné, že individuální rozdíly v ovariální odezvě při COH budou způsobovat spíše genové polymorfizmy. Nejvíce studované polymorfizmy se vztahem k rozvoji OHSS jsou v genu pro FSHR.

Polymorfismus n.A2093G způsobující substituci p.Asn680Ser (rs6166) umístěný uvnitř buňky na C-konci FSHR je nejstudovanější genetickou variantou ve vztahu k odezvě ovarií na COH vůbec. I přes rozsáhlý výzkum je význam tohoto polymorfizmu ale spíše diskutabilní. Některé práce spojují genotyp 680Ser/680Ser se zvýšenou dávkou exogenního FSH potřebnou k úspěšné stimulaci ovarií a tím se sníženou citlivostí receptoru ke stimulaci (Mayorga et al., 2000, Jun et al., 2006) a naopak genotyp 680Asn/680Asn se zvýšenou citlivostí receptoru a tím i s vyšším rizikem rozvinutí OHSS (Macek et al., 2010) či se závažnějšími symptomy již rozvinutého OHSS (Daelemans et al., 2004, Macek et al., 2010). V jiných studiích ale tato souvislost zjištěna nebyla (d'Alva et al., 2005, Binder et al., 2008a, Mohiyiddeen et al., 2012), případně byl označen jako nejcitlivější heterozygotní genotyp 680Asn/680Ser (Loutradis et al., 2006). Závěry nejnovější studie na 427 bělošských ženách dokonce došly k naprosto protichůdným výsledkům a určují za ke stimulaci nejcitlivější genotyp 680Ser/680Ser (Boudjenah et al., 2012). Je pravděpodobné, že má tento polymorfismus vliv na COH v souvislosti s dalšími polymorfizmy a proto jsou výsledky dosavadních studií rozporuplné.

Dalším významným polymorfizmem v genu pro FSHR je záměna n.A919G způsobující substituci p.Thr307Ala před 1. transmembránovým helixem vně buňky (rs6165). Genotyp 307Thr/307Thr je spojen se zvýšenou citlivostí ovaria na COH a se zvýšeným rizikem rozvoje



Obrázek 9. Patogeneze dědičné spontánní formy OHSS způsobené mutací v genu pro FSH receptor. Buňky vyvíjející se placenty v těhotenství syntetizují lidský choriový gonadotropin (hCG, human chorionic gonadotropin), který následně působí na ovárium. V běžném těhotenství je působení hCG omezeno na receptor společný pro luteinizační hormon a hCG (LHCGR). Stimulace LHCGR v corpus luteum podporuje tvorbu progesteronu a umožňuje tak udržení těhotenství. Mutace v receptoru pro folikuly stimulační hormon (FSH, follicle stimulating hormone, mutace na obrázku oranžový a červený bod) dovolují aktivaci receptoru a následnou vnitrobuněčnou signalizaci i při navázání hCG. To vede ke stimulaci FSH receptorů v granulózních buňkách vyvíjejících se folikulů, které díky tomu rostou a zvětšují se. AC označuje adenylát cyklázu, α , β , γ podjednotky G-proteinů, FSH folikuly stimulační hormon. Převzato z Kaiser (2003).

OHSS (Achrekar et al., 2009a). Protože jsou oba polymorfizmy v téměř kompletní vazbě (307Thr + 680Asn, 307Ala + 680Ser, d'Alva et al., 2005), omezuje se studium těchto polymorfizmů většinou jen na jeden z nich (Loutradis et al., 2006), i když ve studii na Indkách je dokumentovaný vztah s COH pouze se polymorfizmem p.Thr307Ala a nikoliv s p.Asn680Ser (Achrekar et al., 2009a). Zastoupení obou zmíněných polymorfizmů v populaci je přitom silně etnicky závislé (Mayorga et al., 2000, Jun et al., 2006, Macek et al., 2010).

Další významný polymorfizmus v genu pro FSHR spojovaný s rozvojem OHSS se nachází v konzervované promotorové oblasti genu na pozici -29 (c.G-29A, rs1394205). Genotyp A/A je spojen s vyšší dávkou exogenního FSH potřebnou pro indukci ovulace a s nižším počtem odebraných folikulů (Achrekar et al., 2009b).

Gen pro FSHR byl studován i ohledně dalších polymorfizmů a mutací, které by mohly ovlivňovat riziko vzniku nebo závažnost OHSS, žádný z nich ale nedosáhl statistické významnosti (Binder et al., 2008a). I přes intenzivní výzkum jsou tak výsledky o vlivu polymorfizmů v genu pro FSHR na OHSS spíše rozporuplné.

Dalšími kandidátními geny ve vztahu k rozvoji OHSS jsou polymorfizmy v genech pro LH a LHCGR. Podílejí se na luteinizaci ovarií, což vede k uvolňování vazoaktivních mediátorů včetně VEGF (McClure et al., 1994). LH se skládá ze dvou podjednotek, z α společné všem gonadotropním hormonům, a z β podjednotky jedinečné pro LH. Nejvýznamnějším polymorfizmem LH jsou dva SNPs p.Trp8Arg (rs1800447) + p.Ile15Thr (rs34349826) ve druhém exonu v genu pro β podjednotku LH, dávající společně vznik tzv. variantní β podjednotce LH (v-LH β). Aktivita LH s v-LH β se in vitro značně liší od standardního LH (účinnější produkce progesteronu ale kratší poločas života hormonu, Suganuma et al., 1995). Přítomnost v-LH β je spojena s nízkou ovariální odezvou na COH (Alviggi et al., 2009). Je pravděpodobné, že tyto ženy budou mít nízké i riziko rozvinutí OHSS.

Zvýšená frekvence v-LH β alely byla pozorována u obézních pacientek s PCOS ve Velké Británii (Rajkhowa et al., 1995), což je zajímavé hlavně proto, že PCOS je jedním z hlavních rizikových faktorů OHSS (ASRM, 2008). Tato souvislost ale nebyla na populaci žen z Turecka potvrzena (Elter et al., 1999), což může být způsobeno malým souborem pacientek (zvláště v turecké studii – jen 30 pacientek s PCOS a 30 kontrol).

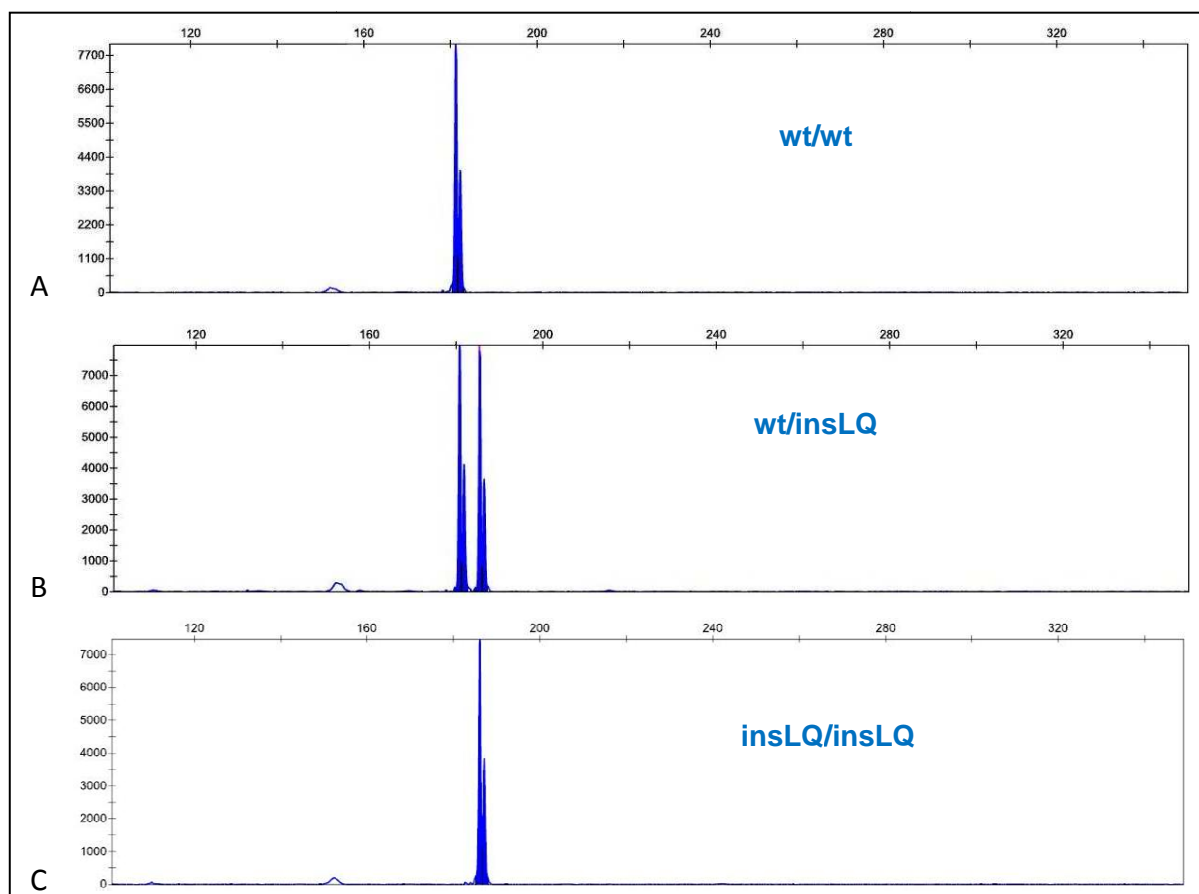
Ve vztahu k rozvoji OHSS byly studovány i polymorfizmy v genech pro VEGF (Hanevik et al., 2012), pro protein p53, anti-müleriální hormon a další (Boudjenah et al., 2012), vliv ostatních polymorfizmů je ale ještě nutné potvrdit v dalších studiích.

Polymorfizmy v genu pro LHCGR ve vztahu k OHSS jsou podrobně popsány v kapitole 3.1.5 Polymorfizmy LHCGR, strana 18. Testy genetických polymorfizmů zatím nemohou nahradit klasické testování ovariálních rezerv, mohou však postupně přispět k individualizaci léčby (Loutradis et al., 2006).

3.3 Principy vybraných používaných metod

3.3.1 Fragmentační analýza

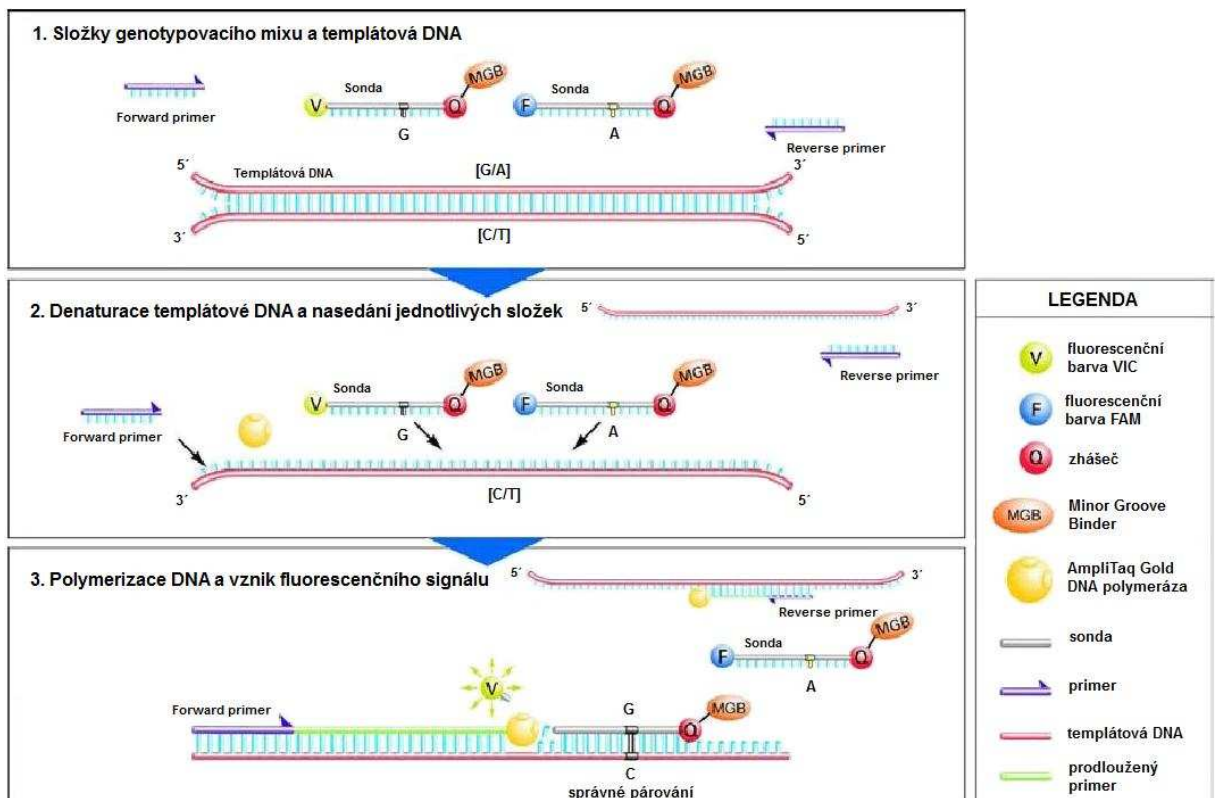
Vzorky byly amplifikovány pomocí PCR s fluorescenčně značeným přímým primerem (značeno kovalentně připojeným fluoresceinem FAM). Získané fragmenty byly rozděleny podle velikosti na kapilární elektroforéze. Na výsledných grafech lze po počítačovém vyhodnocení pomocí vnitřního molekulového standardu odečíst délku amplifikovaných fragmentů. Metoda je vhodná k odlišení genotypů lišících se délkou fragmentů, tedy insercí a delecí – v našem případě rozlišíme přítomnost/nepřítomnost 6 nukleotidové inserce insLQ (obrázek 10). Jde o stejný princip, jaký se používá k detekci krátkých tandemových repetic (STR, short tandem repeats) ve forenzní genetice (Lazaruk et al., 1998, Butler et al., 2004).



Obrázek 10. Výsledné grafy z fragmentační analýzy při genotypizaci polymorfizmu insLQ v genu pro LHGR. Fragmenty DNA bez inserce (wt alela) doputují oproti fragmentům s 6 nukleotidovou insercí (insLQ alela) při kapilární elektroforéze do jiné vzdálenosti od startu. Na výsledných grafech lze po počítačovém vyhodnocení odečíst délku amplifikovaných fragmentů a rozlišit tak jednotlivé genotypy: homozygot wt se všemi fragmenty o velikosti 181 nt (a), heterozygot s fragmenty o velikostech 181 nt (wt alela) a 187 nt (insLQ alela; b) a homozygot insLQ se všemi fragmenty o velikosti 187 nt (c). V tomto případě byl použit jako vnitřní molekulový standard GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems, ROX™ = karboxy-X-rhodamin) a vyhodnocení proběhlo v programu GeneMapper® Software version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Osa x zobrazuje velikost analyzovaných DNA fragmentů, osa y intenzitu fluorescence v RFU (relative fluorescence unit, relativní fluorescenční jednotka).

3.3.2 Genotypizace pomocí TaqMan® MGB™ sond

Genotypizace SNPs pomocí TaqMan®MGB™ sond využívá 5'-3' exonukleázovou aktivitu Taq DNA polymerázy. Polymeráza prodlužuje primery ohraničující úsek s výskytem námi vybraného SNP a přitom je schopna před sebou odbourávat úseky DNA párující s templátem, v tomto případě TaqMan® sondy. Každá TaqMan®MGB™ sonda má na 5' konci kovalentně navázaný fluorofor a na 3' konci nefluorescenční zhášec (non-fluorescence quencher, NFQ), který udržuje fluorofor v neaktivní podobě. Součástí NFQ je MGB (minor groove binder, molekula vázající se do malého žlábků DNA), která stabilizuje párování sondy k templátové DNA a zvyšuje teplotu tání. Jakmile je sonda narušena Taq DNA polymerázou, fluorofor se uvolní do roztoku a tím se aktivuje, tudíž je možné detekovat fluorescenční signál (obrázek 11). Obvykle se využívá kombinace 2 různě značených sond (pro každou alelu jedna) a podle kvality detekovaného signálu jsme schopni určit genotyp SNP ve vzorku. Množství detekovaného signálu je přímo úměrné množství fluoroforu uvolněného z DNA přítomné v PCR reakci. Princip metody umožňuje odečítat signál v průběhu PCR amplifikace a vyhodnotit výsledky bez nutnosti přenosu vzorků do jiného přístroje, jedná se proto o vhodnou metodu i pro genotypizaci velkého množství vzorků (Ranade et al., 2001, Shi, 2001).



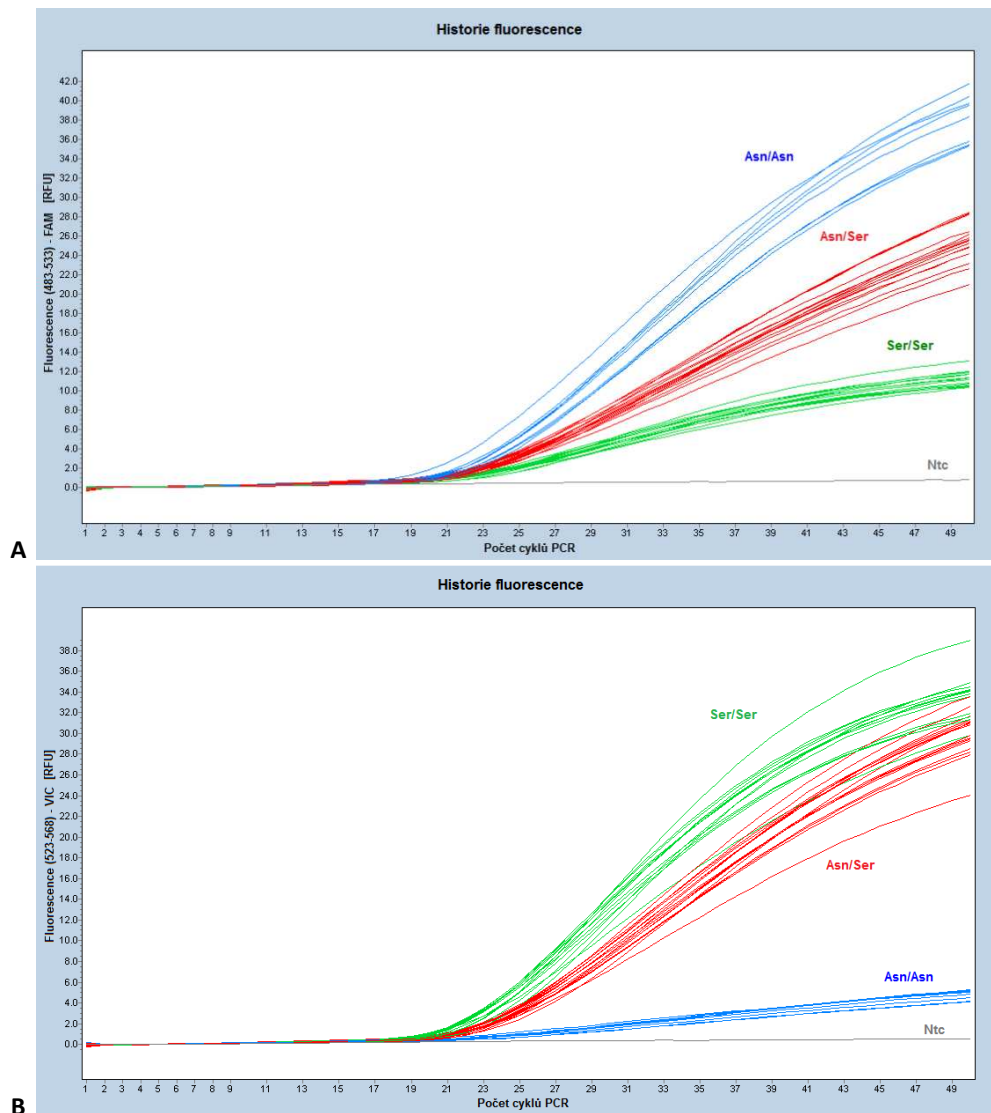
Obrázek 11. Princip genotypizace jednonukleotidových polymorfizmů pomocí TaqMan®MGB™ sond.

1. Komponenty TaqMan® analýzy (1) nasedají na denaturovaný DNA templát (2). Polymeráza prodlužuje F-primer ve směru 5'→3' a zároveň před sebou odbourává DNA sondu. Tím je do roztoku uvolněn fluorofor a generuje se fluorescenční signál (3). MGB - minor groove binder, molekula vázající se do malého žlábků DNA.

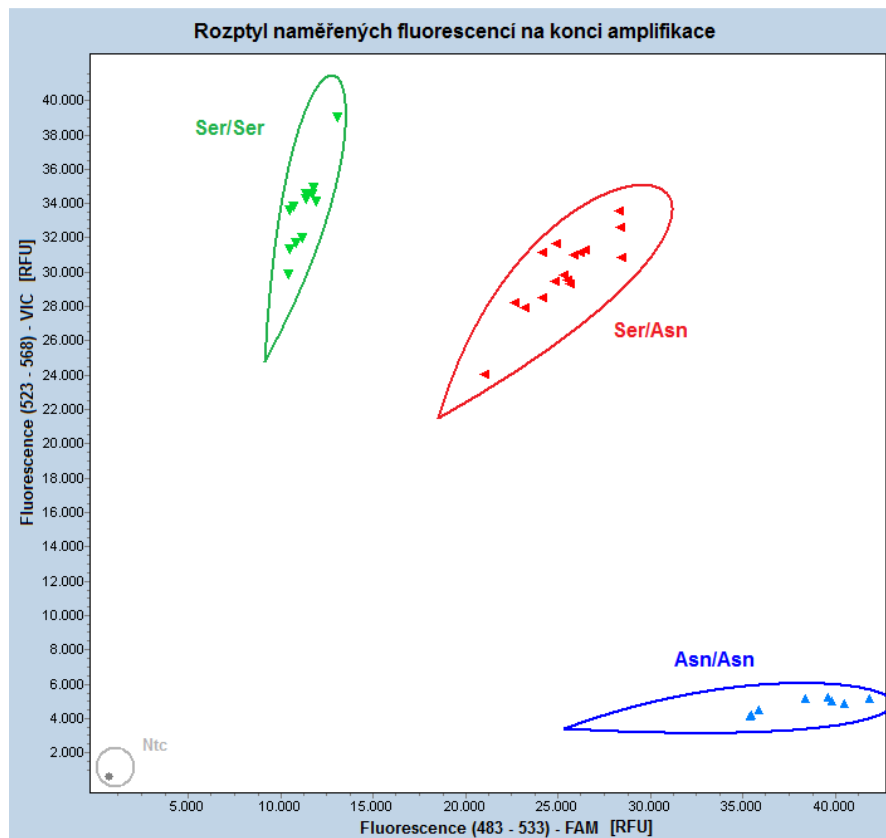
Převzato z manuálu PN4387784C na www.appliedbiosystems.com.

Průběh amplifikace a výsledná genotypizace

Při vypracování této diplomové práce probíhala amplifikace na přístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR Instrument (Roche, Mannheim, Německo). Měření intenzity fluorescence probíhalo na konci každého z 50 cyklů PCR. Získané hodnoty byly vyhodnoceny pomocí LightCycler® 480 Software release 1.5.0 SP4 (Roche, Mannheim, Německo). Jednotlivé genotypy se lišily tvarem amplifikační křivky (obrázek 12), pro finální rozlišení byly vzorky analyzovány funkcí Endpoint Genotyping, kdy jsou vzorky bodově vyneseny do grafu podle poměru fluorescence obou použitých fluoroforů (FAM a VIC, obrázek 13).



Obrázek 12. Záznam měření fluorescence při amplifikaci vzorků pro genotypizaci polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR. Amplifikační křivky se liší podle genotypů. Hodnoty fluorescence na ose y byly měřeny v rozmezí 483-533 nm (v tomto rozmezí se nachází emisní maximum FAM, **A**) a v rozmezí 523-568 nm (v tomto rozmezí se nachází emisní maximum VIC, **B**). V obou grafech je na ose x znázorněn počet cyklů PCR, vzorky s genotypem Asn/Asn jsou zobrazeny modře, s genotypem Ser/Asn červeně a s genotypem Ser/Ser zeleně. Kontrolní vzorek bez templátové DNA (Ntc) je zobrazen šedou barvou. LHCGR = receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu, RFU = relativní fluorescenční jednotka, relative fluorescence unit.



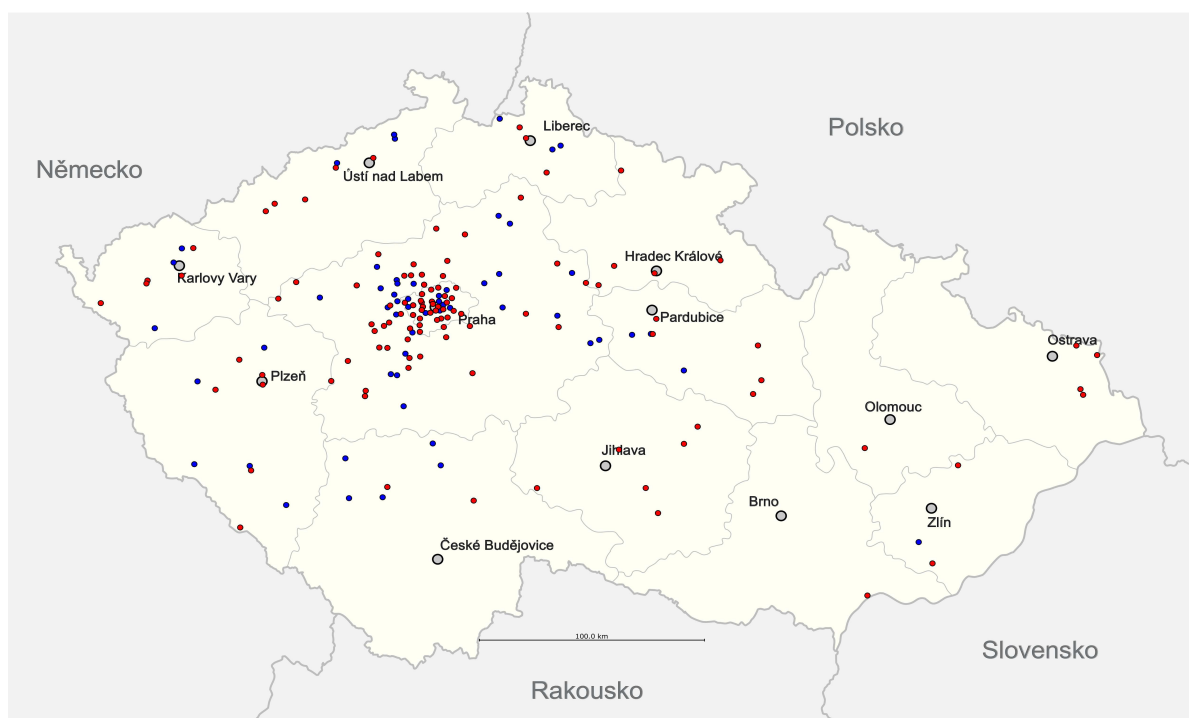
Obrázek 13. Endpoint Fluorescence Scatter Plot – Rozptyl naměřených fluorescencí na konci amplifikace při genotypizaci polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR. Na ose x je znázorněna naměřená hodnota fluorescence v rozmezí 483-533 nm (v tomto rozmezí se nachází emisní maximum FAM, kterým byly značené sondy detekující alelu Asn) a na ose y intenzita fluorescence v rozmezí 523-568 nm (v tomto rozmezí se nachází emisní maximum VIC, kterým byly značené sondy detekující alelu Ser). Vzorky s genotypem Asn/Asn jsou zobrazeny modře, s genotypem Ser/Asn červeně a s genotypem Ser/Ser zeleně. Kontrolní vzorek bez templátové DNA (Ntc) je zobrazen šedou barvou. RFU = relativní fluorescenční jednotka.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorky DNA

K analýze byly použity vzorky lidí (*Homo sapiens sapiens* Linné) z DNA banky na Ústavu biologie a lékařské genetiky ve Fakultní nemocnici v Motole (FN v Motole). Jako kontroly byly použity DNA vzorky 149 žen a 102 mužů s potvrzenou paternitou a maternitou (u všech mužů i žen je dokumentovaná přítomnost minimálně dvou potomků, původ žen a mužů podle místa bydliště je zobrazen na obrázku 14).

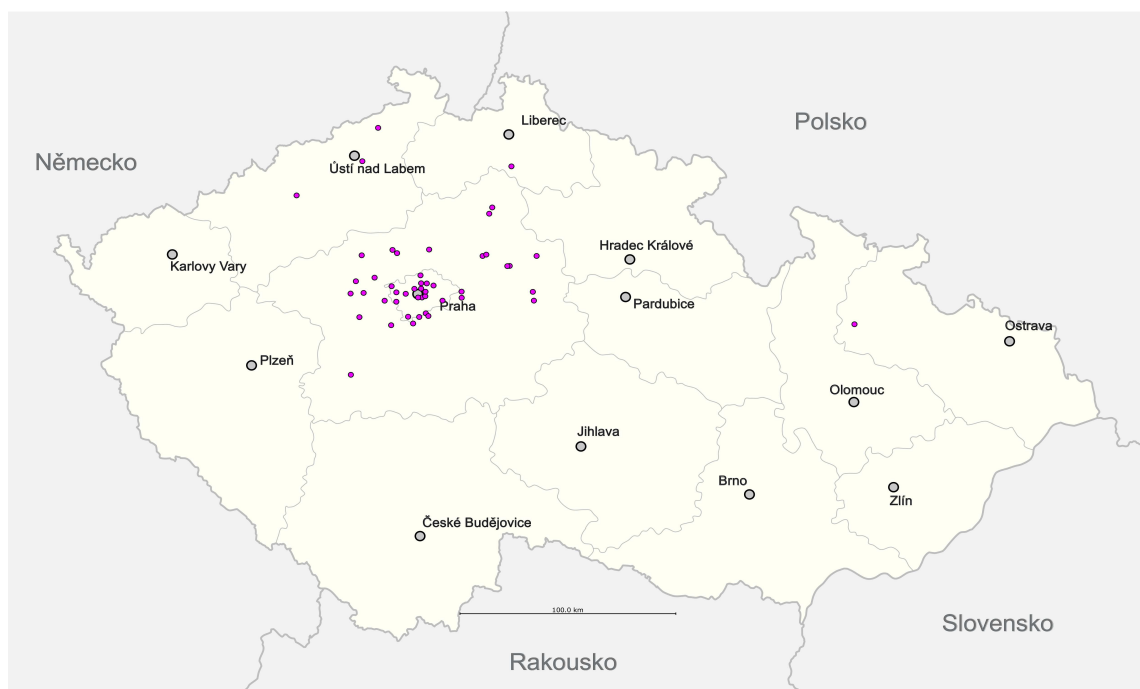


Obrázek 14. Původ mužů a žen sloužících v této studii jako kontroly podle místa bydliště. Ženy jsou na mapě zobrazeny červenými body, muži modrými body. Tato mapka byla použita s laskavým svolením MUDr. Marka Turnovce.

Vzorky pacientek s OHSS pochází od žen, u kterých se v letech 2008 - 2012 v průběhu IVF ve FN v Motole rozvinul III-V stupeň OHSS (klasifikace dle Golana, 2009, tabulka 1, strana 23). Průměrný věk pacientek při IVF byl 32 let (nejmladší pacientce bylo 24 a nejstarší 44 let, 67 % pacientek bylo 29-35 let), původ pacientek podle místa bydliště je zobrazen na obrázku 15.

Rozdělení pacientek podle stupně OHSS	
stupeň OHSS	počet analyzovaných pacientek
III	31
IV	13
IV-V	6
V	8
Celkem analyzovaných pacientek s OHSS	58

Tabulka 2. Rozdělení analyzovaných pacientek podle stupně OHSS.



Obrázek 15. Místa bydliště pacientek analyzovaných v této práci, u kterých se rozvinul ovariální hyperstimulační syndrom (zobrazeny jako fialové body). Tato mapka byla použita s laskavým svolením MUDr. M. Turnovce.

4.1.2 Chemikálie

Acetátový pufr, 3 mol/l, pH 5,2 (Lékárna FN Motol)

Agaróza - Agarose SFR™ (Amresco®)

Voda pro injekční účely (B. Braun)

Destilovaná voda pro laboratorní účely (Lékárna FN Motol)

Etanol 95% [m/m] (Lékárna FN Motol)

Etidiumbromid – 1% roztok ve vodě (Merck)

Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)

Chlorid hořečnatý, MgCl₂, 25mM (Roche)

Orange G (Sigma)

Voda bez přítomnosti nukleáz (Fermentas)

4.1.3 Roztoky

TBE pufr 0,5% (10x koncentrovaný TBE pufr naředěný Destilovanou vodou pro laboratorní účely na 0,5% roztok [V/V])

TBE pufr 10x koncentrovaný (složení na litr: 54 g Tris, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5M EDTA s pH 8, 0; Lékárna FN Motol)

TE pufr (10mM Tris-HCl o pH 8, 1mM EDTA-NaOH o pH 8; Nimble Gen, Roche)

Upravený acetát (3,8 % 3M acetátového pufru, 78,1 % etanolu, 18,1 % dH₂O [V/V])

4.1.4 Komerční pufrы a roztoky nezahrnuté v soupravách

AmpliTaQ Gold[®] 360 Buffer (10x koncentrovaný; Applied Biosystems)

GeneAmp[®] dNTPs (obsahuje: 10mM roztok dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP a 10mM dTTP ve vodě, každý dotitrován roztokem NaOH na pH 7,0; Applied Biosystems)

PCR Master Mix (2x koncentrovaný, obsahuje: 0,05 U/μl Taq DNA polymerázy, reakční pufr, 4mM MgCl₂, 0,4mM od každého dNTP – dATP, dCTP, dGTP a dTTP; Fermentas)

TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2x koncentrovaný, obsahuje: AmpliTaq Gold DNA polymerázu, dNTPs včetně dUTP, Passive Reference, optimalizované komponenty pufru; Applied Biosystems)

4.1.5 Komerční soupravy

BigDye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

4.1.6 Enzymy

AmpliTaQ Gold[™] DNA Polymerase (5U/μl, Roche)

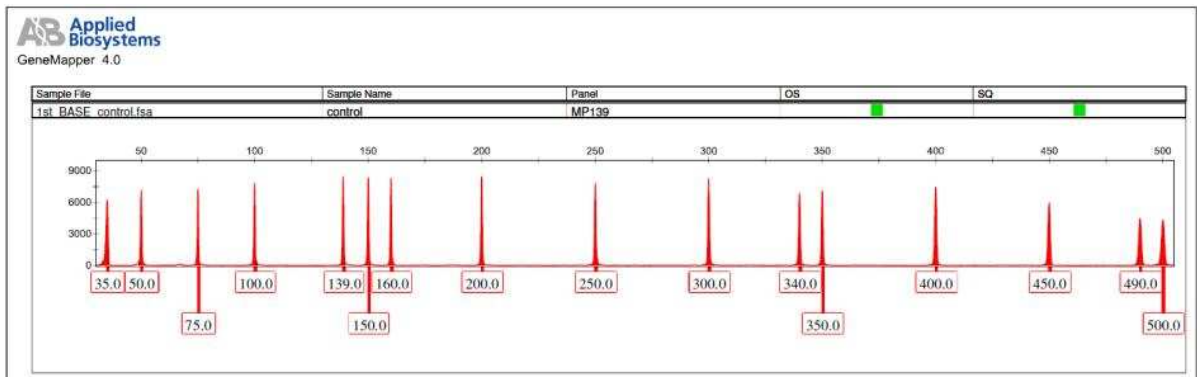
ExoI Exonuclease I, E. coli (20U/μl, Fermentas)

FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1U/μl, Thermo Scientific)

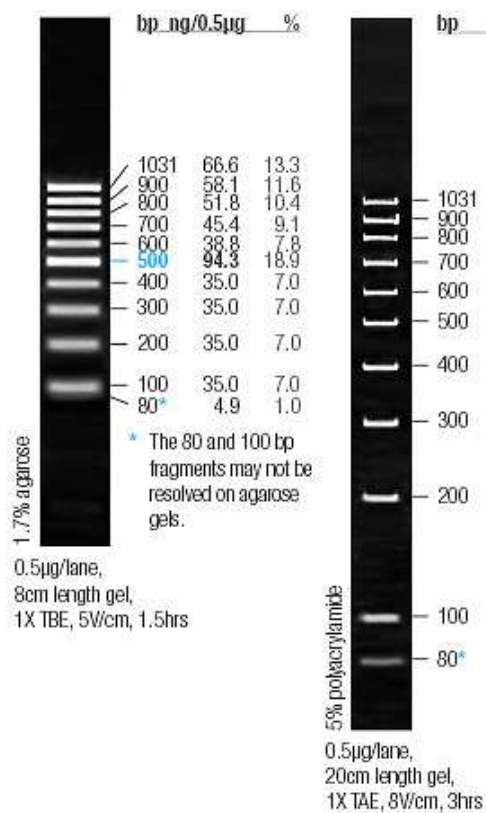
4.1.7 Standardy molekulových hmotností

GeneScan[™] – 500 ROX[™] Size Standard (Applied Biosystems, obrázek 16)

6x Loading Dye Solution (100bp DNA Ladder, Fermentas, obrázek 17)



Obrázek 16. Standardy molekulových hmotností GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard. Na ose x je zobrazena velikost detekovaných fragmentů DNA, na ose y relativní jednotky míry intenzity fluorescence detekované barvy. Převzato z www.base-asia.com/fragment_analysis/.



Obrázek 17. Standardy molekulových hmotností - 6x Loading Dye Solution (100bp DNA Ladder), převzato z www.thermoscientificbio.com.

4.1.8 Oligonukleotidové primery (Microsynth)

- pro fragmentační analýzu polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR

insLQ_F_FAM: 5´- 6-FAM- GCAAGCCGAGAAGCCCAGT -3´
insLQ_R: 5´- TCGAGTGAGACCGGCCGTGG -3´

- pro sekvenaci polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR

insLQ_F: 5´- GCAAGCCGAGAAGCCCAGT -3´
insLQ_R: 5´- TCGAGTGAGACCGGCCGTGG -3´

- pro sekvenaci polymorfizmů Asn291Ser a Ser312Asn v genu pro LHCGR

ex.10_F: 5'- TAGACGCACAGTCAGGTTTAGC -3'

ex.10_R: 5'- TGCAACAGCTCCGTAACCAA -3'

4.1.9 TaqMan®MGB™ sondy a primery k detekci SNPs v genu pro LHCGR

TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems)

- pro SNP Asn291Ser - Assay ID: C____460918_20
- pro SNP Ser312Asn - Assay ID: C____460917_1_

4.2 Metody

4.2.1 Práce s DNA

Měření koncentrace DNA

Všechny analyzované DNA vzorky byly naředěny vodou pro injekční účely (B. Braun) na koncentraci 50-100 ng/μl. Přesnost ředění byla zkontrolována za využití programu NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) na mikrokapilárním spektrofotometru NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) v objemu 2 μl. Jako blank byla vždy použita destilovaná voda, do které byly vzorky ředěny.

Agarózová elektroforéza DNA

Příprava gelu

- Na agarózové elektroforéze byly oddělovány fragmenty o velikosti 180 – 262 nt, proto byl používán 3% gel složený z 3,0 g agarózy Agarose SFR™ (Amresco®) a 100 ml TBE pufu.
- Agaróza byla zahřátím rozpuštěna v pufu a následně ochlazena na cca 60°C.
- Ochlazený gel byl nalit do vaničky a byl do něj zasunut hřeben pro vytvarování jamek.
- Po ztuhnutí byl gel ihned použit nebo uložen v nádobce s 0,5 % TBE pufem při 2 °C.

Elektroforéza

- Gel byl vložen do nádoby elektroforetického přístroje Horizon® 58 (Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersbutg, MD, USA) s 0,5% TBE puřrem a do jamiček byly naneseny vzorky smíchané s Orange G.
- Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí Lightning Volf Power Supply OSP-300 (Polysciences, Neles, IL, USA) s nastavenými hodnotami na 6 V/cm.
- Po 30 min byl gel obarven ponořením do 0,0002% roztoku EtBr na 15-20 min.
- Obarvený gel byl vyfocen pod UV světlem z transluminátoru Electronic Translluminator Dual Light (Ultralum, Claremont, CA, USA) fotoaparátem Kodak Elektronik (Eastman Kodak Company, Orchester, NY, USA) za využití systému Kodak ID Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Orchester, NY, USA).

Teplotní gradientová PCR

U každé dvojice nově navržených primerů byla pro stanovení optimální teploty nasedání primerů provedena teplotní gradientová PCR. Bylo namícháno 12 stejných směsí PCR dle rozpisu, který byl následně používán k vlastní genotypizaci vzorků (u polymorfizmu insLQ rozpis pro fragmentační analýzu, viz níže) nebo k sekvenaci studovaného lokusu (u polymorfizmů v 10. exonu, strana 43). Poté byly vzorky amplifikovány na cykléru Peltier Thermal Cycler PTC 200, MJ Research (San Francisco, CA, USA), který umožňuje nastavit v každé zkumavce jinou teplotu nasedání primerů. Účinnost PCR reakce byla ověřena elektroforeticky.

Fragmentační analýza

I) PCR

Rozpis chemikálií pro amplifikaci jednoho vzorku

Voda bez přítomnosti nukleáz (Fermentas)	5,7 μ l
2x PCR Master Mix (Fermentas)	7,5 μ l
F-primer insLQ_F_FAM (5 pmol/ μ l)	0,1 μ l
R-primer insLQ_R (5 pmol/ μ l)	0,1 μ l
<u>DNA (50-100 ng/μl)</u>	<u>1,6 μl</u>
Celkový reakční objem	15 μ l

Program PCR

95 °C	– 2 min	
95 °C	– 1 min	} 30 cyklů
62,5 °C	– 1 min	
72 °C	– 1 min 50 s	
72 °C	– 20 min	
4 °C	– do odvolání	

Amplifikace proběhla na přístroji XP cycler (Bioer Technology, Hangznou, China).

II) Kapilární elektroforéza

Úspěšnost amplifikace byla ověřena gelovou DNA elektroforézou. Vzorky s detekovatelným signálem byly připraveny dle následujícího rozpisu do platíčka na kapilární elektroforézu:

Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)	9 μl
GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems)	0,5 μl
<u>Roztok PCR</u>	<u>1 μl</u>
Celkové množství připraveného roztoku	10,5 μl

Vzorky byly analyzovány na kapilární elektroforéze ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) za využití programu 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, aplikace GeneMapper-B02448).

III) Vyhodnocení výsledků

Velikost fragmentů byla vyhodnocena pomocí vnitřního molekulového standardu GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) v programu GeneMapper® Software version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Genotypizace pomocí TaqMan®MGB™ sond

I) PCR

Rozpis chemikálií pro genotypizaci jednoho vzorku:

TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x, Applied Biosystems)	8 µl
TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x, Applied Biosystems)	0,8 µl
Voda pro injekční účely (B. Braun)	4 µl
<u>DNA (50 – 100 ng/µl)</u>	<u>3,2 µl</u>
Celkový reakční objem	16 µl

Program PCR:

95 °C – 10 min

92 °C – 15 s

60 °C – 90 s



50 cyklů

37 °C – 5 min

Amplifikace proběhla na přístroji LightCycler® 480 Real-Time PCR Instrument (Roche, Mannheim, Německo).

II) Průběh amplifikace a výsledná genotypizace

Naměřené hodnoty fluorescence byly vyhodnoceny pomocí LightCycler® 480 Software release 1.5.0 SP4 (Roche, Mannheim, Německo).

Sekvenace

I) PCR

- Sekvenace 1. exonu s výskytem polymorfizmu insLQ

Při sekvenaci úseku genu s polymorfizmem insLQ byla první PCR provedena s neznačenými primery dle rozpisu a amplifikačního protokolu, který byl používán ke genotypizaci vzorků fragmentační analýzou.

- Sekvenace 10. exonu v genu pro LHCGR s výskytem polymorfizmů Asn291Ser a Ser312Asn

Protože se oba polymorfizmy nachází blízko sebe, byly sekvenovány zároveň v rámci jednoho PCR amplikonu. První PCR probíhalo dle následujícího protokolu:

Rozpis chemikálií pro sekvenaci jednoho vzorku (sekvenace 10. exonu):

Voda pro injekční účely (B. Braun)	16 µl
AmpliAq Gold® 360 Buffer (10x; Applied Biosystems)	2,5 µl
MgCl ₂ Solution, 25mM (Roche)	2 µl
F-primer ex.10_F (10 pmol/µl)	1 µl
R-primer ex.10_R (10 pmol/µl)	1 µl
GeneAmp® dNTPs (Applied Biosystems)	1,25 µl
AmpliAq Gold™ DNA Polymerase (5U/µl, Roche)	0,25 µl
<u>DNA (50-100 ng/µl)</u>	<u>1 µl</u>
Celkový reakční objem	25 µl

Program PCR

95 °C	– 2 min	
95 °C	– 1 min	} 35 cyklů
65 °C	– 1 min	
72 °C	– 2 min	
72 °C	– 5 min	
4 °C	– do odvolání	

Amplifikace proběhla na přístroji Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nebo XP cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China).

II) Agarózová elektroforéza

Úspěšnost amplifikace byla ověřena na agarózové elektroforéze. Od tohoto kroku již bylo pracováno se všemi sekvenovanými vzorky totožně.

III) Enzymatické přečištění PCR produktů pomocí systému EXOSAP**Rozpis na enzymatické přečištění jednoho vzorku**

FastAP Thermosensitive Alkaline phosphatase (1U/µ, ThermoScientific)	3 µl
ExoI Exonuclease I, E. coli (20U/µ, Fermentas)	0,5 µl
<u>Roztok PCR</u>	<u>10 µl</u>
Celkový reakční objem	13,5 µl

Teplotní režim

37 °C	– 60 min
80 °C	– 20 min
4 °C	– do odvolání

Inkubace vzorků probíhala v cykléru Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nebo Gene AMP PCR System 2400 Termocycler, Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA).

IV) Sekvenační PCR

PCR s fluorescenčně značenými dideoxy-nukleotidy byla provedena pomocí soupravy BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Rozpis chemikálií na sekvenační PCR jednoho vzorku

Big Dye™ Terminator Kit	2 µl
R nebo F primer (2,5 pmol/µl)	1 µl
<u>PCR produkt</u>	<u>4 µl</u>
Celkový reakční objem	7 µl

Program sekvenačního PCR

96 °C	– 1 min	} 25 cyklů
96 °C	– 10 s	
50 °C	– 5 s	
60 °C	– 4 min	
4 °C	– do odvolání	

PCR proběhla na cykléru Gene AMP PCR System 2400 Termocycler (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) nebo Termocycler Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

V) Přečištění DNA etanolovou precipitací

PCR produkty po sekvenčním PCR byly přečištěny etanolovou precipitací dle následujícího postupu:

1. K PCR produktu bylo přidáno 40 µl vychlazeného upraveného acetátu, směs byla promíchána a přenesena do popsaných 1,5ml zkumavek.
2. Zkumavky byly při pokojové teplotě vloženy do centrifugy MiniSpin plus, Eppendorf (Hamburg, Německo) na 20min odstředění při 11300xg.
3. Supernatant byl ihned po dotočení odsát odsávačkou chemických látek Gilson® Safe Aspiration Station (Gilson, Middleton, WI, USA) a k sedimentu bylo přidáno 200 µl vychlazeného 70% etanolu, vše bylo důkladně promícháno.
4. Zkumavky byly při pokojové teplotě vloženy do centrifugy MiniSpin plus, Eppendorf (Hamburg, Německo) na 10min odstředění při 11300xg.

5. Všechny supernatant byl důkladně odsát odsávací stanicí chemických látek Gilson® Safe Aspiration Station (Gilson, Middleton, WI, USA) a k sedimentu bylo přidáno 25 µl Hi-Di™ Formamidu (Applied Biosystems).
6. Po důkladném promíchání byl roztok přenesen do platíčka pro následnou analýzu kapilární elektroforézou.

VI) Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza proběhla na přístroji ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, Aplikace: Sequencing Analysis) za využití programu 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

VII) Vyhodnocení výsledků

Získaná data z kapilární elektroforézy byla vyhodnocena pomocí programu Sequencing Analysis Software v5.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.2.2 Bioinformatické analýzy

- Příprava map s původem analyzovaných mužů a žen:
Inkscape, verze 0.48.4 (Inkscape.org)

- Navrhování vlastních primerů:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

- Statistické analýzy:

The R Project for Statistical Computing

(R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>)

Polymorfismus insLQ bude ve statistických analýzách považován stejně jako jednonukleotidové záměny.

Ověření Hardy-Weinbergovy rovnováhy pomocí Pearsonova χ^2 testu

Pomocí Pearsonova χ^2 testu byly pro každou skupinu u daného polymorfismu porovnány pozorované genotypové frekvence s očekávanými, vypočtenými na základě alelických frekvencí podle vzorce:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p, q = počty alel

Tyto dva získané soubory byly následně porovnány Pearsonovým χ^2 testem dobré shody, který porovnává odchylky ve skupinách genotypů dle následujícího vzorce:

$$\chi^2 = \frac{(n_{AA} - Np^2)^2}{np^2} + \frac{(n_{AB} - N2pq)^2}{n2pq} + \frac{(n_{BB} - Nq^2)^2}{nq^2}$$

n_{AA} , n_{AB} , n_{BB} = počty genotypů AA, AB, BB

N = celkový počet vzorků

p, q = počty alel

V programu R byla použita funkce *HWE.chisq()* z balíčku *genetics*.

Pro statisticky významné odchýlení od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HWE, Hardy-Weinberg equilibrium) byla stanovena hladina významnosti $P \leq 0,05$.

Ověření HWE pomocí exaktního testu

HWE byla ověřována pomocí exaktního testu u těch souborů, kde bylo více než 80 % hodnot ≤ 5 .

Základní vzorec:

$$P(N_{AB} = n_{AB} | N_A = n_A) = \frac{n! n_A! n_B! 2^{n_{AB}}}{(2n)! n_{AB}! \left(\frac{1}{2}(n_A - n_{AB})\right)! \left(\frac{1}{2}(n_B - n_{AB})\right)!}$$

n = počet analyzovaných genotypů

n_A , n_B = počty alel A,B

n_{AB} = počet heterozygotů AB

Tímto vzorcem byla vypočítána pravděpodobnost P u analyzovaného souboru. Následně byl použit oboustranný test (ve studované populaci se nevyskytuje příbuzenské křížení) ve kterém byly spočítány P pro všechny možné genotypové frekvence při dodržení alelických frekvencí ($P_{\text{teoretický } 1}$, $P_{\text{teoretický } 2}$... $P_{\text{teoretický } n}$). Výsledná exaktní P hodnota je pak podíl P našeho analyzovaného souboru a všech teoretických P, které jsou menší nebo rovné našemu P.

$$P_{\text{exaktní}} = \frac{P_{\text{analyzovaného souboru}}}{P_{\text{teoretický } 1} + P_{\text{teoretický } 2} + \dots + P_{\text{teoretický } n}}$$

V programu R byla použita funkce *HWE.exact()* z balíčku *genetics*.

Pro statisticky významné odchýlení od Hardy-Weinbergovy rovnováhy byla stanovena hladina významnosti $P \leq 0,05$.

Studium asociace pomocí Pearsonova χ^2 testu

Pearsonův χ^2 test byl použit pro určení, zda je rozdíl v distribuci genotypů u dvou různých skupin.

$$\chi_{DF}^2 = \sum \frac{(p - t)^2}{t}$$

DF = počet stupňů volnosti

p = pozorovaná četnost

t = teoretická četnost

Při porovnávání četností u dvou souborů byly četnosti v jednom souboru považované za pozorované, ve druhém za teoretické.

V programu R byla k výpočtu použita funkce *chisq.test()*, která rovnou uvádí i hodnoty P. Pro statistické potvrzení rozdílného rozložení genotypů mezi dvěma porovnávanými skupinami byla stanovena hladina významnosti $P \leq 0,05$.

Fisherův exaktní test

Fisherův exaktní test byl použit pro ověření vztahu mezi dvěma skupinami vzorků v případě, že 80 % porovnávaných hodnot bylo ≤ 5 nebo pokud některá z hodnot byla menší než 2. Při porovnávání genotypů je test založen na kontingenční tabulce 2x3 (tabulka 3).

Kontingenční tabulka s četnostmi genotypů				
	Genotyp AA	Genotyp AB	Genotyp BB	Celkem
Skupina 1	a	c	e	a + c + e
Skupina 2	b	d	f	b + d + f
celkem	a + b	c + d	e + f	a + b + c + d + e + f

Tabulka 3. Kontingenční tabulka 2x3.

Základní vzorec:

$$P = \frac{\frac{(a+b)! \cdot (c+d)! \cdot (e+f)!}{a! \cdot b! \cdot c! \cdot d! \cdot e! \cdot f!}}{\frac{(a+b+c+d+e+f)!}{(a+c+e)! \cdot (b+d+f)!}}$$

I v tomto exaktním testu jsou počítány hodnoty P pro další kombinace genotypů, přičemž se postupuje tak dlouho, dokud se v jedné z buněk nedosáhne nulové četnosti. Výsledná hodnota P je pak součtem všech dílčích P. Pro statistické potvrzení rozdílného rozložení genotypů mezi dvěma porovnávanými skupinami byla stanovena hladina významnosti $P \leq 0,05$.

Tento test byl použit také pro všechny čtyřpolní tabulky (vycházel tedy z jednodušší kontingenční tabulky 2x2).

V programu R byla k výpočtu použita funkce *fisher.test()*.

Poměr šancí

Poměr šancí (OR, odds ratio) vyjadřuje poměr šance výskytu daného znaku v jedné skupině oproti druhé, v našem případě šanci výskytu určité alely u pacientek s OHSS oproti kontrolní skupině žen. Nabývá hodnot od 0 do nekonečna, přičemž neutrální hodnota je 1. Hodnoty nižší než jedna se vyskytují u protektivních alel a hodnoty větší než jedna u alel zvyšující riziko výskytu daného onemocnění. Výpočet opět vychází z kontingenční tabulky (tabulka 4):

Kontingenční tabulka s četnostmi alel			
	Kontroly	Pacienti	Celkem
alela A	a	c	a + c
alela B	b	d	b + d
Celkem	a + b	c + d	a + b + c + d

Tabulka 4. Kontingenční tabulka 2x2.

Vzorec:

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

Pro výpočet OR u genotypových alel byl vzorec rozšířen podle zvětšené kontingenční tabulky 2x3.

Při testování OR je spočítán interval spolehlivosti (IS), který ve výsledku udává spodní a horní hraniční hodnotu při 95% spolehlivosti. IS je počítán dle Woolfovy metody vzorcem:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \quad 95\% \text{ IS} = [OR \cdot e^{-1,96\sigma} \cdot OR \cdot e^{1,96\sigma}]$$

V programu R byla pro výpočet OD použita funkce *oddsratio()* z balíčku *epitools*, která ve výsledku rovnou uvádí i 95% IS.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace primerů – teplotní gradientová elektroforéza

5.1.1 Primery pro detekci polymorfizmu insLQ

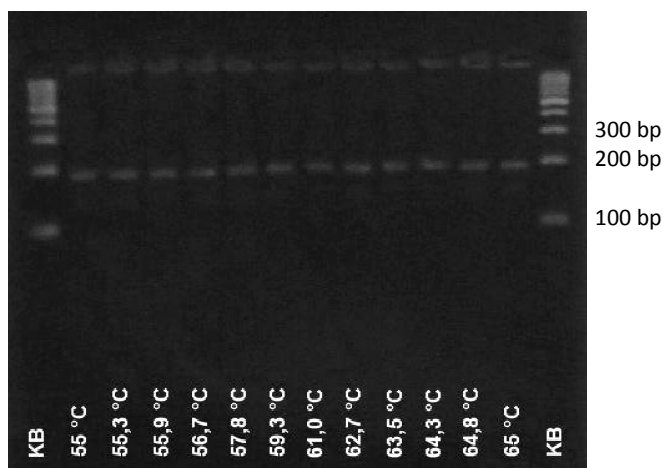
Primery pro fragmentační analýzu

Teoretická teplota nasedání primerů podle Národního centra pro informace v oblasti biotechnologie (NCBI, National Center for Biotechnology Information) a podle výrobce primerů:

F-primer insLQ_F_FAM: - 61,6 °C (Microsynth)

R-primer insLQ_R: 60,59 °C (NCBI) 63,6 °C (Microsynth)

Byl proveden teplotní gradient v rozmezí 55 °C – 65 °C (obrázek 18).



Obrázek 18. Teplotní gradientová elektroforéza s primery pro detekci polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR fragmentační analýzou (F-primer značený FAM). KB označuje pozici jamky s naneseným molekulovým žebříkem, v tomto případě žebřík s fragmenty lišícími se o 1kbp (100bp žebřík).

Pro fragmentační analýzu polymorfizmu insLQ byla stanovena teplota nasedání primerů na 62,5 °C.

Primery pro sekvenaci

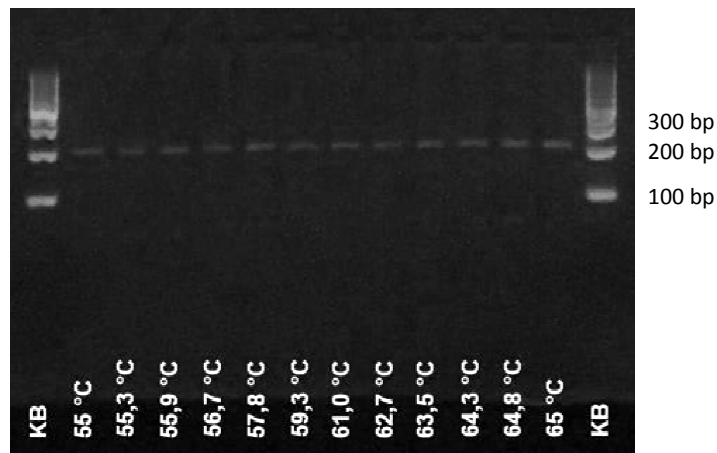
Primery pro sekvenace mají stejnou sekvenci, jako primery pro fragmentační analýzu, F-primer ale není značený fluorescenční značkou. Proto byl proveden teplotní gradient zvláště pro tyto primery.

Teoretická teplota nasedání primerů podle NCBI a podle výrobce primerů:

F-primer insLQ_F: 60,25 °C (NCBI) 61,6 °C (Microsynth)

R-primer insLQ_R: 60,59 °C (NCBI) 63,6 °C (Microsynth)

Byl proveden teplotní gradient v rozmezí 55 °C – 65 °C (obrázek 19).



Obrázek 19. Teplotní gradientová elektroforéza s primery pro sekvenaci úseku 1. exonu s výskytem polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR. KB označuje pozici jamky s naneseným molekulovým žebříkem, v tomto případě žebřík s fragmenty lišícími se o 1kbp (100bp žebřík).

Pro sekvenaci úseku 1. exonu genu LHCGR s výskytem polymorfizmu insLQ byla stanovena teplota nasedání primerů na 62,5 °C.

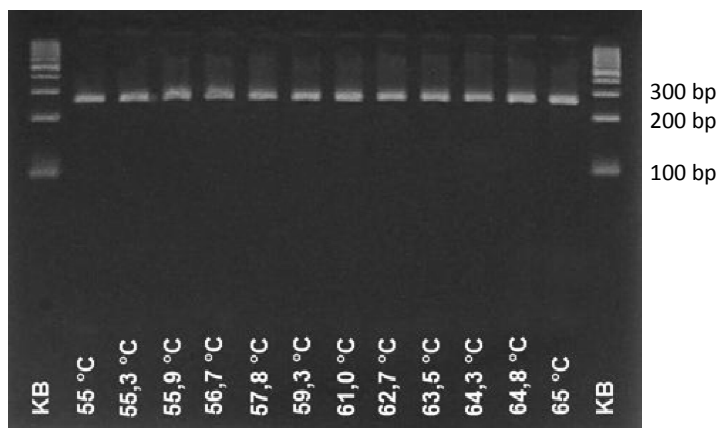
5.1.2 Primery pro sekvenaci 10. exonu

Teoretická teplota nasedání primerů

F-primer ex.10_F: 60,35 °C (NCBI) 57,7 °C (Microsynth)

R-primer ex.10_R: 60,18 °C (NCBI) 55,4 °C (Microsynth)

Byl proveden teplotní gradient v rozmezí 55 °C – 65 °C (obrázek 20).



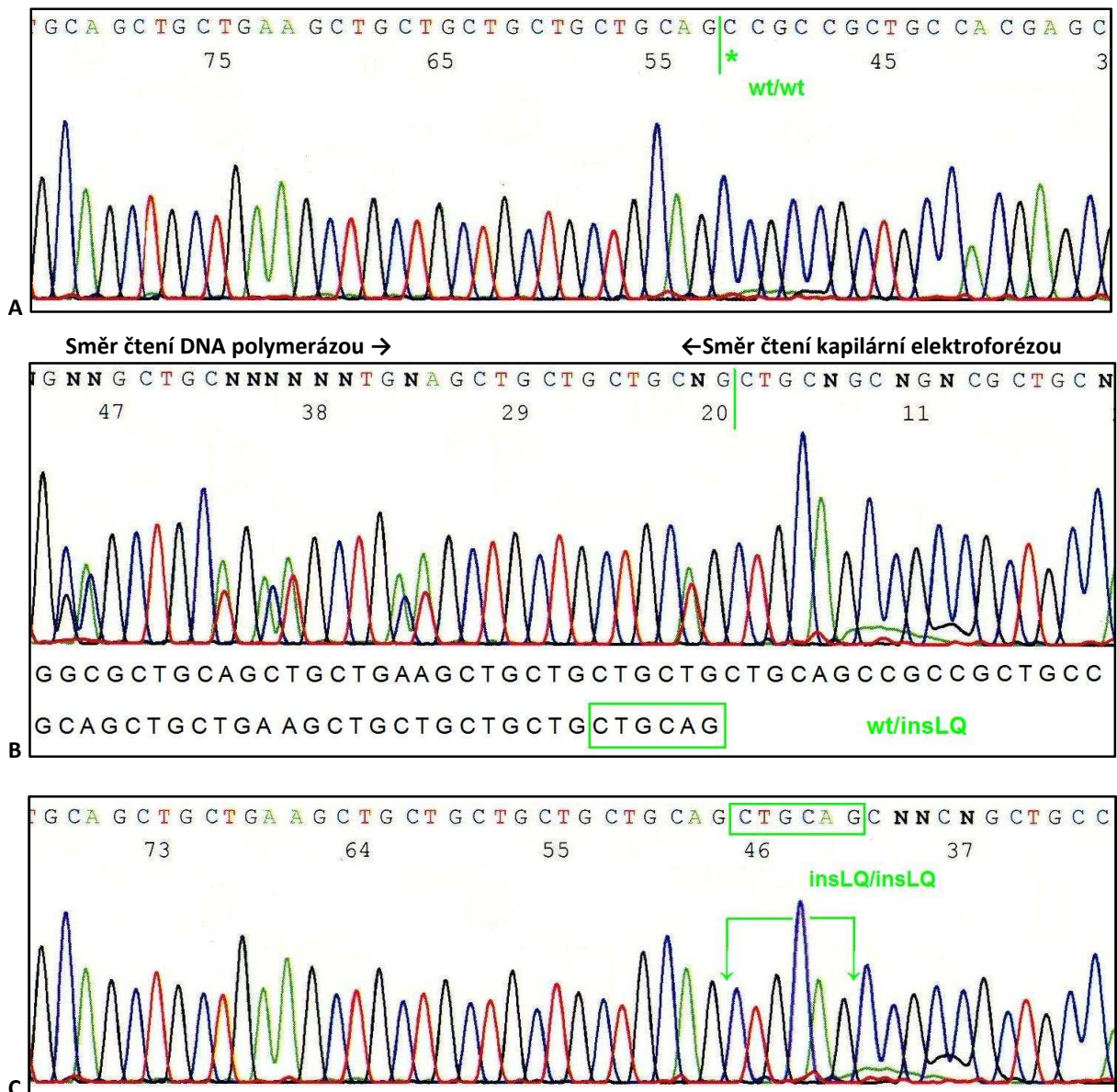
Obrázek 20. Teplotní gradientová elektroforéza s primery pro sekvenaci 10. exonu genu pro LHCGR. KB označuje pozici jamky s naneseným molekulovým žebříkem, v tomto případě žebřík s fragmenty lišícími se o 1kbp (100bp žebřík).

Pro sekvenaci 10. exonu genu LHCGR s výskytem polymorfizmů Asn291Ser a Ser312Asn byla stanovena teplota nasedání primerů na 65 °C.

5.2 Polymorfismus insLQ

5.2.1 Sekvence úseku 1. exonu a detekce polymorfizmu insLQ

Sekvenováno bylo celkem 21 vzorků pro ověření spolehlivosti genotypizace pomocí fragmentační analýzy a u vzorku P008A k bližšímu určení delší inserce (viz podkapitola 5.2.5, strana 54). Výsledné elektroforetogramy z kapilární elektroforézy jsou znázorněny na obrázku 21.



Obrázek 21. Výsledek sekvenace úseku prvního exonu s výskytem polymorfizmu insLQ: homozygotní jedinec s oběma alelami s referenční sekvencí (wt/wt, **A**), heterozygot s jednou alelou bez inserce (wt) a druhou s insercí (insLQ, **B**) a homozygot s oběma alelami s insercí (insLQ/insLQ, **C**). Hvězdička označuje místo, kam je u insLQ alely vkládána inserce, vložená inserce je zvýrazněna zeleným rámečkem. Wt = alela s referenční sekvencí (z anglického wild-type).

5.2.2 Distribuce polymorfizmu insLQ v závislosti na pohlaví

Následující výsledky byly získány fragmentační analýzou (vzorový výsledný graf z fragmentační analýzy je na obrázku 10, strana 31). Ve skupině mužů byl z dalších analýz pro tento polymorfismus vyřazen vzorek P008A, který vykazoval heterozygotní genotyp s jednou alelou s referenční sekvencí bez inserce (wt, z anglického wild-type) a s druhou alelou s dlouhou insercí. Tomuto vzorku je věnovaná vlastní podkapitola 5.2.5 (strana 55).

V následující tabulce je porovnána distribuce polymorfizmu insLQ v závislosti na pohlaví mezi kontrolními ženami a muži (tabulka 5). Statisticky byl rozdíl v genotypových frekvencích mezi muži a ženami vyhodnocen Pearsonovým χ^2 testem, u alelických frekvencí Fisherovým exaktním testem. Rozložení genotypů nevybočuje z HWE ($P = 0,523$ pro skupinu kontrolních žen, $P = 0,271$ pro skupinu kontrolních mužů, hladina významnosti byla stanovena pro $P \leq 0,05$, ověřeno Pearsonovým χ^2 testem). Je vidět, že se frekvence genotypů ani alel mezi ženami a muži neliší.

Distribuce polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR v závislosti na pohlaví			
	Kontrolní ženy (N=149)	Kontrolní muži (N=101*)	P
genotypy			
wt/wt	55,7 % (83)	59,4 % (60)	0,8329
wt/insLQ	36,2 % (54)	32,7 % (33)	
insLQ/insLQ	8,1 % (12)	7,9 % (8)	
alely			
wt	73,8 % (220)	75,7 % (152)	0,6763
insLQ	26,2 % (78)	24,3 % (49)	

Tabulka 5. Porovnání distribuce polymorfizmu insLQ v genu pro receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu (LHCGR) v závislosti na pohlaví. Rozložení genotypových frekvencí bylo vyhodnoceno pomocí Pearsonova χ^2 testu, alelické frekvence Fisherovým exaktním testem, hladina významnosti byla stanovena pro $P \leq 0,05$. *Vzorek P008A byl z dalších analýz pro tento polymorfismus vyřazen.

Zda se frekvence genotypů nachází v HWE bylo ověřeno i u sloučené skupiny kontrolních mužů a žen dohromady a ani zde rozložení genotypů z HWE nevybočovalo ($P = 0,2431$, ověřeno Pearsonovým χ^2 testem).

5.2.3 Srovnání výsledků populační studie polymorfizmu insLQ s ostatními evropskými studii

Porovnání s ostatními studii z Evropy shrnuje tabulka 6 a 7. V tabulce 6 jsou porovnány frekvence genotypů a alel u českých žen s jinými evropskými ženami, porovnání mužů je věnována tabulka 7.

Distribuce polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR u českých a evropských žen											
	Kontrolní ženy ČR (N=149)	Piersma, 2006 EPOS (N=1759)	P Češky X EPOS	Piersma, 2006 R (N=3640)	P Češky X R	Kerkelä, 2007 Švédsko (N=51)	P Češky X Švédky	Valkenbur g, 2009 Nizozemí (N=2344)	P Češky X Nizozem.	Capalbo, 2012 Sardinie (N=174)	P Češky X Sardiňan.
genotypy											
wt/wt	55,7 % (83)	51,3 % (903)	0,582	51,8 % (1887)	0,649	51,0 % (26)	0,647	52,0 % (1220)	0,664	51,7 % (90)	0,236
wt/insLQ	36,2 % (54)	40,3 % (708)		39,6 % (1443)		43,1 % (22)		39,8 % (934)		43,7 % (76)	
insLQ/insLQ	8,1 % (12)	8,4 % (148)		8,5 % (310)		5,9 % (3)		8,1 % (190)		4,6 % (8)	
alely											
wt	73,8 % (220)	71,5 % (2514)	0,422	71,7 % (5217)	0,432	72,5 % (74)	0,796	72,0 % (3374)	0,506	73,6 % (256)	1
insLQ	26,2 % (78)	28,5 % (1004)		28,3 % (2063)		27,5 % (28)		28,0 % (1314)		26,4 % (92)	

53

Tabulka 6. Porovnání zastoupení jednotlivých genotypů a alel polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR u českých žen s obdobnými studii na ženách v Evropě. Pro větší přehlednost jsou v tabulce uvedené jen zkrácené citace (bez formulace „et al“). Charakteristika evropských souborů: EPOS = soubor bělošských žen s osteoporózou z Eindhovenu v Nizozemí (Eindhoven Perimenopausal Osteoporosis Study) s vyloučením všech žen s historií rakoviny prsu; R = rotterdamská studie, ženy žijící v Rotterdamu v Nizozemí s vyloučením žen s historií rakoviny prsu (Piersma et al., 2006); švédské ženy, které při léčbě neplodnosti podstoupily hormonální stimulaci a nevyvinul se u nich ovariální hyperstimulační syndrom (Kerkela et al., 2007); ženy z rotterdamské studie s vyloučením žen, u kterých se dostavila menopauza ve 45 letech a dříve (Valkenburg et al., 2009); ženy ze Sardinie bez výskytu syndromu polycystických ovarií (Capalbo et al., 2012). Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, hladina významnosti byla stanovena na $P \leq 0,05$.

Distribuce polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR u českých a evropských mužů			
	Kontrolní muži ČR (N=101)	Simoni, 2008 Německo (N=271)	P porovnání s našimi výsledky
genotypy			
wt/wt	59,4 % (60)	48,7 % (132)	0,127
wt/insLQ	32,7 % (33)	44,3 % (120)	
insLQ/insLQ	7,9 % (8)	7,0 % (19)	
alely			
wt	75,7 % (152)	70,8 % (384)	0,231
insLQ	24,3 % (49)	29,2 % (158)	

Tabulka 7. Porovnání zastoupení jednotlivých genotypů a alel polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR u českých mužů s obdobnými studii na mužích v Evropě (tedy pouze s Němci). Porovnávání Němci neměli symptomy neplodnosti (Simoni et al., 2008). Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, hladina významnosti byla stanovena na $P \leq 0,05$.

5.2.4 Porovnání distribuce polymorfizmu insLQ u fertilních žen a pacientek s OHSS

V tabulce 8 jsou porovnány frekvence výskytu genotypů a alel u kontrolních žen s doloženou fertilitou a u pacientek, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS.

Výskyt polymorfizmu insLQ u fertilních žen a u pacientek s OHSS					
	Kontrolní ženy (N=149)	Pacientky s OHSS (N=58)	OR	95% IS	P
wt/wt	55,7 % (83)	53,4 % (31)	1	referenční	0,667
wt/insLQ	36,2 % (54)	41,4 % (24)	1,19	0,626 – 2,247	
insLQ/insLQ	8,1 % (12)	5,2 % (3)	0,694	0,143 – 2,407	
wt alela	73,8 % (220)	74,1 % (86)	1	referenční	1
insLQ alela	26,2 % (78)	25,9 % (30)	0,986	0,598 – 1,599	

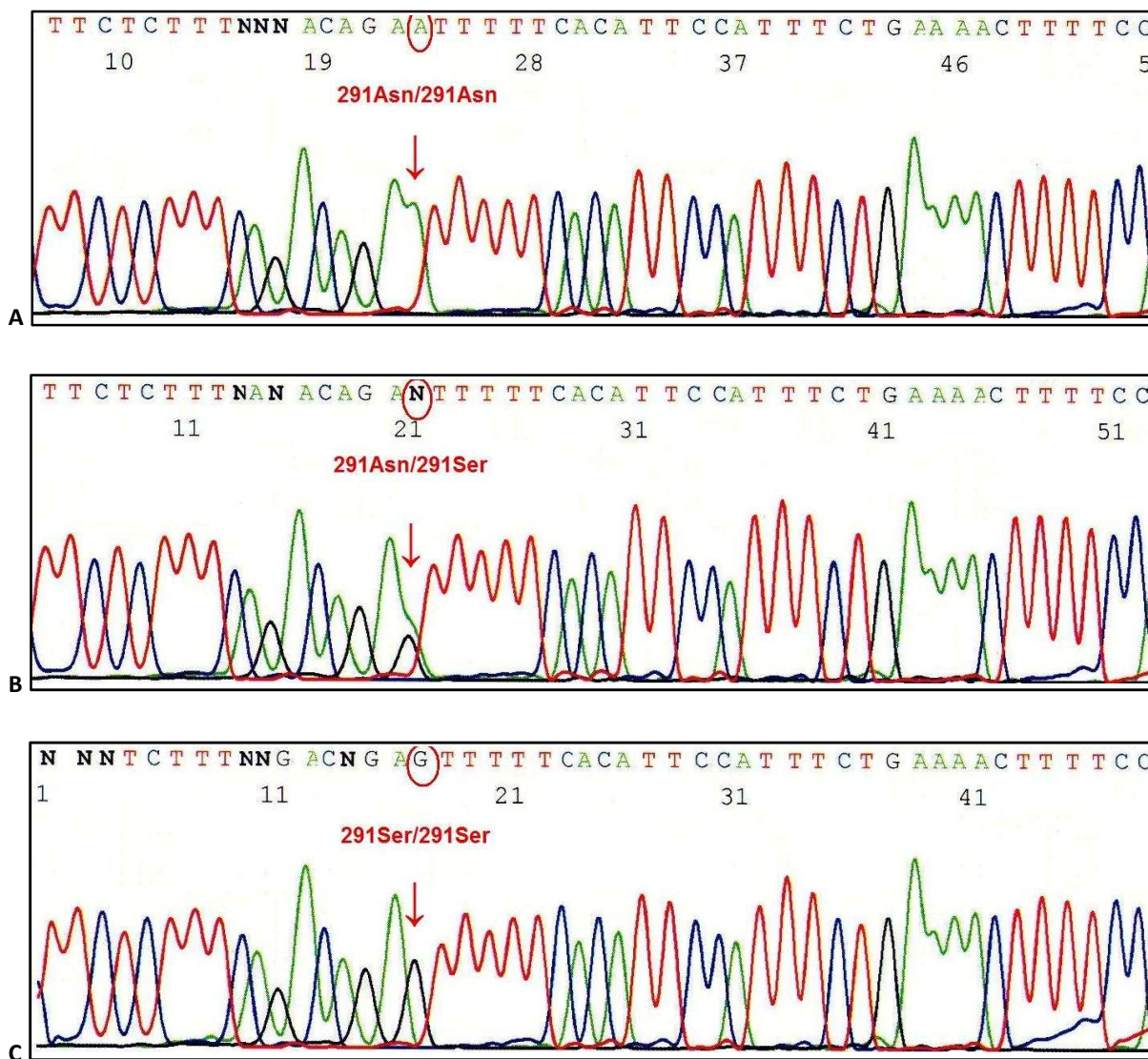
Tabulka 8. Porovnání výskytu polymorfizmu insLQ v genu pro LHCGR u fertilních žen a pacientek s OHSS. Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, hladina významnosti byla stanovena na $P \leq 0,05$. OR = poměr šancí, 95% IS = 95% interval spolehlivosti.

Rozložení genotypů u kontrolních žen ani u pacientek s OHSS ($P = 0,737$ – pro pacientky s OHSS, hladina významnosti byla stanovena pro $P \leq 0,05$, ověřeno exaktním testem na HWE) nevybočuje z HWE. Genotypové ani alelické frekvence se mezi fertilními ženami a pacientkami s OHSS neliší, což potvrzují i získané hodnoty pravděpodobnosti. OR pro genotypové ani pro alelické frekvence také žádnou souvislost se vztahem alely insLQ k rozvoji OHSS nenaznačuje.

5.3 Polymorfismus Asn291Ser

5.3.1 Sekvence 10. exonu a detekce polymorfizmu Asn291Ser

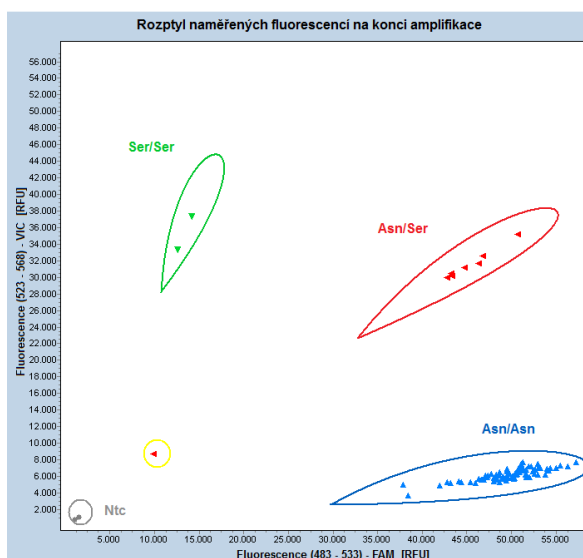
Sekvenováno bylo celkem 20 vzorků pro ověření spolehlivosti genotypizace pomocí TaqMan® MGB™ sond. Výsledné elektroforetogramy z kapilární elektroforézy jsou znázorněny na obrázku 24.



Obrázek 24. Výsledek sekvenace 10. exonu s detekcí polymorfizmu Asn291Ser homozygotního jedince s genotypem c.872A/c.872A (Asn/Asn, **A**), heterozygot s genotypem c.872A/c.872G (Asn/Ser, **B**) a homozygot s oběma alelami c.872G (Ser/Ser, **C**). Místo výskytu polymorfizmu je zvýrazněno červeně.

5.3.2 Distribuce polymorfizmu Asn291Ser v závislosti na pohlaví

Následující výsledky byly získány genotypizací pomocí TaqMan®MGB™ sond. Příkladem výsledného grafu z genotypizace je obrázek 25.



Obrázek 25. Endpoint Fluorescence Scatter Plot – Rozptyl naměřených fluorescencí na konci amplifikace při genotypizaci polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR. Na ose x je naměřená hodnota fluorescence v rozmezí 483-533 nm (emisní maximum FAM, kterým byly značené sondy detekující alelu Asn), na ose y je intenzita fluorescence v rozmezí 523-568 nm (emisní maximum VIC, kterým byly značené sondy detekující alelu Ser). Vzorky s genotypem Asn/Asn jsou zobrazeny modře, s genotypem Asn/Ser červeně a s genotypem Ser/Ser zeleně. Kontrolní vzorek bez templátové DNA (Ntc) a jeden vzorek, u kterého selhala amplifikace, je zobrazen šedou barvou, ve žlutém kroužku je vzorek s nejasným genotypem – analýza tohoto vzorku byla zopakována. RFU = relativní fluorescenční jednotka.

V tabulce 9 je distribuce polymorfizmu Asn291Ser mezi kontrolními ženami a muži. Odlišnosti v pozorovaných genotypových a alelických frekvencích byly ověřeny Fisherovým exaktním testem, který rozdíl mezi pohlavími neodhalil. Rozložení genotypů nevybočuje z HWE ($P = 0,4579$ pro kontrolní ženy, $P = 0,2066$ pro kontrolní muže, $P = 0,19$ pro obě skupiny dohromady, hladina významnosti $P \leq 0,05$, ověřeno exaktním HWE testem).

Distribuce polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR v závislosti na pohlaví			
	Kontrolní ženy (N=149)	Kontrolní muži (N=102)	P
genotypy			
Asn/Asn	87,9 % (131)	91,2 % (93)	0,593
Asn/Ser	11,4 % (17)	7,8 % (8)	
Ser/Ser	0,7 % (1)	1 % (1)	
alely			
Asn	93,6 % (279)	95,1 % (194)	0,562
Ser	6,4 % (19)	4,9 % (10)	

Tabulka 9. Distribuce polymorfizmu Asn291Ser v genu pro receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu (LHCGR) v závislosti na pohlaví. Statistické porovnání proběhlo pomocí Fisherova exaktního testu. P hodnoty $\leq 0,05$ byly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní (zde žádné).

5.3.3 Srovnání výsledků populační studie polymorfizmu Asn291Ser s ostatními evropskými studii

Porovnání se studii z Evropy shrnuje tabulka 10 a 11. V tabulce 10 jsou porovnány genotypové a alelické frekvence polymorfizmu Asn291Ser u českých žen s obdobnými studii na ženách z Evropy, mužům je věnována tabulka 11.

Distribuce polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR u českých a evropských žen									
	Kontrolní ženy ČR (N=149)	Piersma, 2007 EPOS (N=1776)	P Češky X EPOS	Piersma, 2007 R (N=3551)	P Češky X R	Valkenburg, 2009 Nizozemí (N=2929)	P Češky X Nizozemky	Capalbo, 2012 Sardinie (N=174)	P Češky X Sardiňanky
genotypy									
Asn/Asn	87,9 % (131)	89,0 % (1580)	0,514	89,2 % (3169)	0,587	89,9 % (2630)	0,515	94,1 % (144)	0,082
Asn/Ser	11,4 % (17)	10,7 % (190)		10,2 % (363)		9,7 % (283)		5,9 % (9)	
Ser/Ser	0,7 % (1)	0,3 % (6)		0,5 % (19)		0,5 % (16)		0,0 % (0)	
alely									
Asn	93,6 % (279)	94,3 % (3350)	0,604	94,4 % (6701)	0,608	94,6 % (5543)	0,432	97,1 % (297)	0,053
Ser	6,4 % (19)	5,7 % (202)		5,6 % (401)		5,4 % (315)		2,9 % (9)	

Tabulka 10. Porovnání našich výsledků zastoupení jednotlivých genotypů a alel polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR v České republice s obdobnými studii v Evropě. Pro větší přehlednost jsou v tabulce uvedené jen zkrácené citace (bez formulace „et al“). Charakteristika evropských souborů: EPOS = soubor bělošských žen s osteoporózou z Eindhoven v Nizozemí (Eindhoven Perimenopausal Osteoporosis Study) s vyloučením žen s historií rakoviny prsu; R = rotterdamská studie, ženy žijící v Rotterdamu v Nizozemí s vyloučením žen s historií rakoviny prsu (Piersma et al., 2007b); ženy z rotterdamské studie s vyloučením žen, u kterých se dostavila menopauza ve 45 letech a dříve (Valkenburg et al., 2009); ženy ze Sardinie bez výskytu syndromu polycystických ovarií (Capalbo et al., 2012). Statistické porovnání proběhlo pomocí Fisherova exaktního testu. P hodnoty $\leq 0,05$ byly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní (zde žádné). Jistý trend ukazuje pouze porovnání českých žen s obyvatelkami Sardinie (zvýrazněno modře), to může být ale způsobeno příliš nízkou frekvencí Ser alely obecně.

Distribuce polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR u českých a evropských mužů			
	Kontrolní muži ČR (N=102)	Simoni, 2008 Německo (N=271)	P porovnání s našimi výsledky
genotypy			
Asn/Asn	91,2 % (93)	88,6 % (240)	0,882
Asn/Ser	7,8 % (8)	10,0 % (27)	
Ser/Ser	1 % (1)	1,5 % (4)	
alely			
Asn	95,1 % (194)	93,5 % (507)	0,493
Ser	4,9 % (10)	6,5 % (35)	

Tabulka 11. Porovnání zastoupení jednotlivých genotypů a alel polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR u českých mužů s obdobnými studii na mužích v Evropě (tedy pouze s Němci). Porovnávání Němci neměli symptomy neplodnosti (Simoni et al., 2008). Statisticky byly hodnoty porovnány Fisherovým exaktním testem (P hodnoty $\leq 0,05$ byly vyhodnoceny statisticky signifikantní – zde tedy žádné).

5.3.4 Porovnání distribuce polymorfizmu Asn291Ser u fertálních žen a pacientek s OHSS

V tabulce 12 jsou porovnány frekvence výskytu genotypů a alel u kontrolních žen s doloženou fertilitou a u pacientek, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS. Rozložení genotypů nevybočuje z HWE ani u kontrolních žen, ani u pacientek s OHSS ($P = 1$ – pro pacientky s OHSS, hladina významnosti byla stanovena pro $x \leq 0,05$, ověřeno exaktním testem na HWE). Statistické vyhodnocení odlišností v zastoupení alel a genotypů Fisherovým exaktním testem žádný rozdíl mezi kontrolními ženami a pacientkami s OHSS neukázalo.

Výskyt polymorfizmu Asn291Ser u fertálních žen a pacientek s OHSS					
	Kontrolní ženy (N=149)	Pacientky s OHSS (N=58)	OR	95% IS	P
Asn/Asn	87,9 % (131)	91,4 % (53)	-	-	0,730
Asn/Ser	11,4 % (17)	8,6 % (5)	-	-	
Ser/Ser	0,7 % (1)	0 % (0)	-	-	
Asn alela	93,6 % (279)	95,7 % (111)	1	referenční	0,491
Ser alela	6,4 % (19)	4,3 % (5)	1,477	0,573 – 4,634	

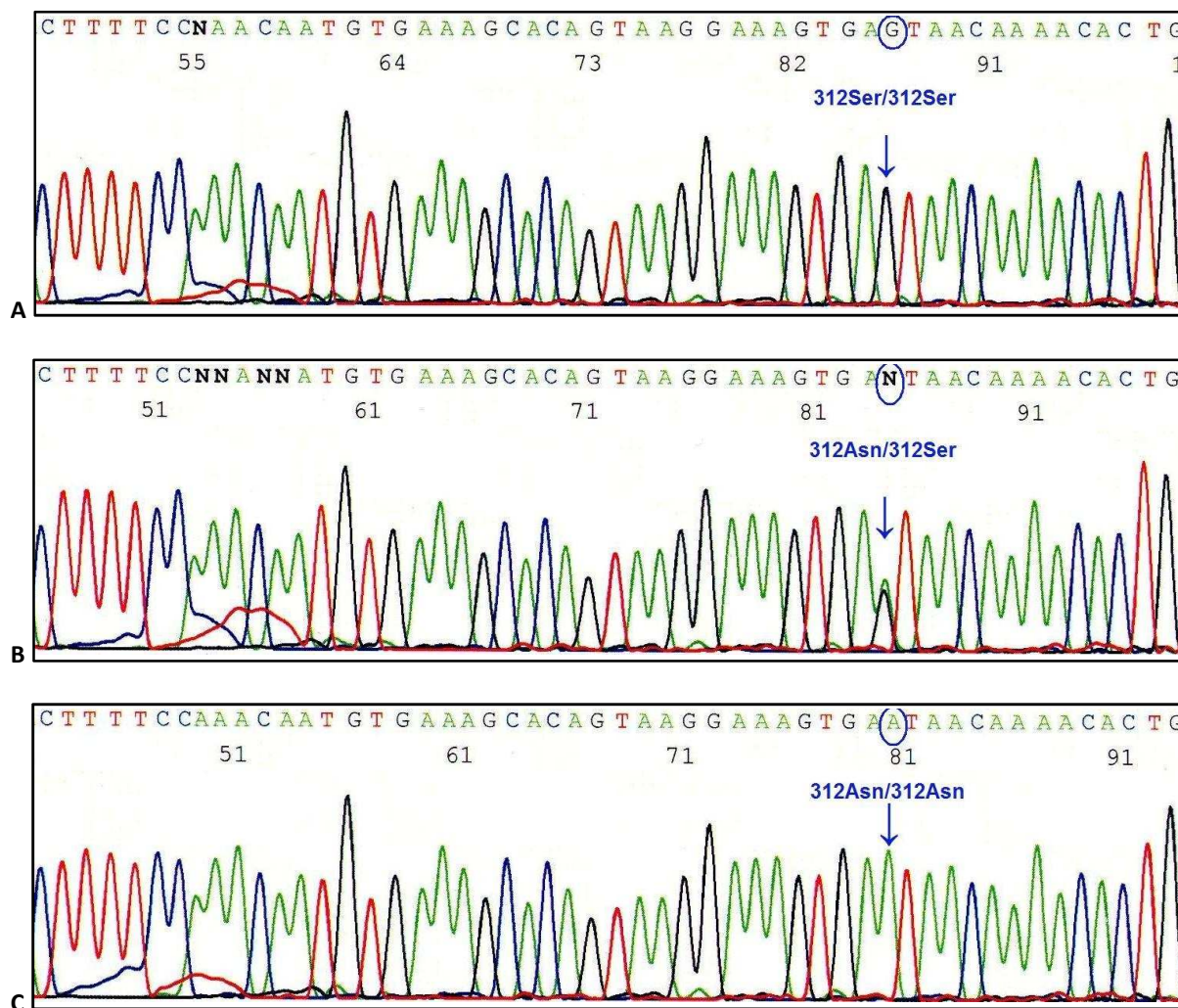
Tabulka 12. Porovnání výskytu polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR u fertálních žen a pacientek s ováriální hyperstimulačním syndromem (OHSS). Porovnání výskytu genotypů a alel proběhlo pomocí Fisherova exaktního testu. P hodnoty $\leq 0,05$ byly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní. OR u genotypových frekvencí bylo pod rozlišitelností testu. OR = poměr šancí, 95% IS = 95% interval spolehlivosti.

OR u alelických frekvencí pacientek s OHSS a kontrolních žen naznačuje mírně zvýšené riziko rozvinutí OHSS v přítomnosti Ser alely, vzhledem k šíři IS a velmi nízké četnosti této alely v populaci to však není příliš pravděpodobné.

5.4 Polymorfismus Ser312Asn

5.4.1 Sekvence 10. exonu a detekce polymorfizmu Ser312Asn

Pro ověření spolehlivosti genotypizace pomocí TaqMan® MGB™ sond bylo sekvenováno celkem 20 vzorků. Výsledné elektroforetogramy z kapilární elektroforézy jsou znázorněny na obrázku 26.



Obrázek 26. Výsledek sekvenace 10. exonu s detekcí polymorfizmu Ser312Asn homozygotního jedince s genotypem c.935G/c.935G (Ser/Ser, **A**), heterozygot s genotypem c.935G/c.935A (Ser/Asn, **B**) a homozygot s oběma alelami c.935A (Asn/Asn, **C**). Místo výskytu polymorfizmu je zvýrazněno modře.

5.4.2 Distribuce polymorfizmu Ser312Asn v závislosti na pohlaví

Následující výsledky byly získány genotypizace pomocí TaqMan® MGB™ sond (příkladem výsledného grafu z genotypizace je obrázek 13, str. 34). V následující tabulce je porovnána distribuce polymorfizmu Ser312Asn v závislosti na pohlaví mezi kontrolními ženami a muži (tabulka 13). Statisticky byl rozdíl v genotypových frekvencích mezi muži a ženami vyhodnocen Pearsonovým χ^2 testem, u alelických frekvencí Fisherovým exaktním testem. Je vidět, že se frekvence genotypů ani alel mezi ženami a muži nijak významně neliší. Rozložení genotypů nevybočuje z HWE ($P = 1$ pro skupinu kontrolních žen, $P = 1$ pro skupinu kontrolních mužů, $P = 0,895$ pro obě skupiny dohromady, hladina významnosti byla stanovena pro $P \leq 0,05$, ověřeno Pearsonovým χ^2 testem).

Distribuce polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR v závislosti na pohlaví			
	Kontrolní ženy (N=149)	Kontrolní muži (N=102)	P
genotypy			
Ser/Ser	33,6 % (50)	37,3 % (38)	0,792
Asn/Ser	48,3 % (72)	47,1 % (48)	
Asn/Asn	18,1 % (27)	15,7 % (16)	
alely			
Ser	57,7 % (172)	60,8 % (124)	0,519
Asn	42,3 % (126)	39,2 % (80)	

Tabulka 13. Výsledky genotypizace polymorfizmu Ser312Asn v genu pro receptor luteinizačního hormonu a lidského choriového gonadotropinu (LHCGR) pomocí TaqMan® MGB™ sond. Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, hladina významnosti byla stanovena na $P \leq 0,05$.

5.4.3 Srovnání výsledků populační studie polymorfizmu Ser312Asn s ostatními evropskými studii

Porovnání se studii z Evropy shrnuje tabulka 14 a 15. V tabulce 14 jsou genotypové a alelické frekvence u analyzovaných žen porovnány s obdobnými studii na ženách z Evropy, porovnání mužů je věnována tabulka 15.

Distribuce polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR u českých a evropských žen									
	Kontrolní ženy ČR (N=149)	Piersma, 2007 EPOS (N=1776)	P Češky X EPOS	Piersma, 2007 R (N=3794)	P Češky X R	Valkenburg, 2009 Nizozemí (N=2344)	P Češky X Nizozemky	Capalbo, 2012 Sardinie (N=174)	P Češky X Sardiňanky
genotypy									
Ser/Ser	33,6 % (50)	35,4 % (628)	0,790	33,4 % (1269)	0,999	33,5 % (978)	0,983	57,2 % (103)	1,884 · 10 ⁻⁵
Asn/Ser	48,3 % (72)	48,5 % (862)		48,5 % (1840)		48,9 % (1426)		36,1 % (65)	
Asn/Asn	18,1 % (27)	16,1 % (286)		18,1 % (685)		17,6 % (512)		6,7 % (12)	
alely									
Ser	57,7 % (172)	59,6 % (2118)	0,539	57,7 % (4378)	1	58,0 % (3382)	0,952	75,3 % (271)	1,892 · 10 ⁻⁶
Asn	42,3 % (126)	40,4 % (1434)		42,3 % (3210)		42,0 % (2450)		24,7 % (89)	

Tabulka 14. Porovnání zastoupení jednotlivých genotypů a alel polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR v České republice s obdobnými studii v Evropě. Pro větší přehlednost jsou v tabulce uvedené jen zkrácené citace (bez formulace „et al“). Charakteristika evropských studovaných souborů: EPOS = soubor bělošských žen s osteoporózou z Eindhoven v Nizozemí (Eindhoven Perimenopausal Osteoporosis Study) s vyloučením žen s historií rakoviny prsu; R = rotterdamská studie, ženy žijící v Rotterdamu v Nizozemí s vyloučením žen s historií rakoviny prsu (Piersma et al., 2007b); ženy z rotterdamské studie s vyloučením žen, u kterých se dostavila menopauza ve 45 letech a dříve (Valkenburg et al., 2009); ženy ze Sardinie bez výskytu polycystického ovariálního syndromu (Capalbo et al., 2012). Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, hladina významnosti byla stanovena na $P \leq 0,05$ (statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny žlutě).

Distribuce polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR u českých a evropských mužů			
	Kontrolní muži ČR (N=102)	Simoni, 2008 Německo (N=271)	P porovnání s našimi výsledky
genotypy			
Ser/Ser	37,3 % (38)	26,2 % (71)	0,0666
Ser/Asn	47,1 % (48)	50,2 % (136)	
Asn/Asn	15,7 % (16)	23,6 % (64)	
alely			
Ser	60,8 % (124)	51,3 % (278)	0,0212
Asn	39,2 % (80)	48,7 % (264)	

Tabulka 15. Porovnání zastoupení jednotlivých genotypů a alel polymorfizmu Asn291Ser v genu pro LHCGR u českých mužů s obdobnými studii na mužích v Evropě (tedy pouze s Němci). Porovnávání Němci neměli symptomy neplodnosti (Simoni et al., 2008). Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, statisticky významné hodnoty ($P \leq 0,05$) jsou zvýrazněny žlutě, výsledky naznačující pouze trend modře.

U polymorfizmu Ser312Asn bylo provedeno ještě porovnání kontinentálních Evropanek proti ženám ze Sardinie, které se od ostatních žen nezvykle lišily (tabulka 16). Do „kontinentálních Evropanek“ byly zahrnuty ženy z ČR, z EPOS a z rotterdamské studie (Piersma et al., 2007b). Výsledky od Valkenburga s kolegy (2009) nebyly do vytvořené skupiny zařazeny, protože se jejich soubor žen z části překrývá se souborem studovaným Piersmou s kolegy v rámci rotterdamské studie (Piersma et al., 2007b).

Porovnání polymorfizmu Ser312Asn u „kontinentálních Evropanek“ a u Sardiňanek			
	„Kontinentální Evropanky“ (N = 5719)	Capalbo, 2012 ženy ze Sardinie (N = 174)	P kontinentální Evropanky X ženy ze Sardinie
genotypy			
Ser/Ser	34,0 % (1947)	57,2 % (103)	2,285 . 10 ⁻¹⁰
Ser/Asn	48,5 % (2774)	36,1 % (65)	
Asn/Asn	17,5 % (998)	6,7 % (12)	
alely			
Ser	58,3 % (6668)	75,3 % (271)	4,439 . 10 ⁻¹¹
Asn	41,7 % (4770)	24,7 % (89)	

Tabulka 16. Porovnání frekvencí genotypů a alel polymorfizmu Ser312Asn v genu pro LHCGR u žen ze Sardinie se skupinou „kontinentálních Evropanek“, která vznikla sloučením výsledků z EPOS (Eindhoven Perimenopausal Osteoporosis Study) a rotterdamské studie (Piersma et al., 2007b) s výsledky získanými na Češkách v této diplomové práci. Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, statisticky významné hodnoty ($P \leq 0,05$) jsou zvýrazněny žlutě.

5.4.4 Porovnání polymorfizmu Ser312Asn u fertilních žen a pacientek s OHSS

V tabulce 17 jsou porovnány frekvence výskytu genotypů a alel polymorfizmu Ser312Asn u kontrolních žen s doloženou fertilitou a u pacientek, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS. Rozložení genotypů u pacientek s OHSS nevybočuje z HWE ($P = 1$, hladina významnosti byla stanovena pro $P \leq 0,05$, ověřeno Pearsonovým χ^2 testem)

Výskyt polymorfizmu Ser312Asn u fertilních žen a pacientek s OHSS					
	Kontrolní ženy (N=149)	Pacientky s OHSS (N=58)	OR	95% IS	P
Ser/Ser	33,6 % (50)	43,1 % (25)	1	referenční	0,3519
Asn/Ser	48,3 % (72)	44,8 % (26)	0,724	0,373 – 1,403	
Asn/Asn	18,1 % (27)	12,1 % (7)	0,528	0,187 – 1,339	
Ser alela	57,7 % (172)	65,5 % (76)	1	referenční	0,1802
Asn alela	42,3 % (126)	34,5 % (40)	0,72	0,457- 1,122	

Tabulka 17. Porovnání výskytu polymorfizmu Ser312Asn u fertilních žen a pacientek s ovariálním hyperstimulačním syndromem (OHSS). Statistické porovnání genotypových frekvencí proběhlo pomocí Pearsonova χ^2 testu, u alelických frekvencí byl použit Fisherův exaktní test, hladina významnosti byla stanovena na $P \leq 0,05$. OR = poměr šancí, 95% IS = 95% interval spolehlivosti.

OR u alelických frekvencí pacientek s OHSS a kontrolních žen naznačuje mírný ochranný efekt Asn alely, vzhledem k rozsahu IS tento výsledek ale nemusí být významným.

5.5 Haplotypová analýza

Cílem haplotypové analýzy je ověřit možný kombinovaný efekt studovaných polymorfizmů na určitý jev, v našem případě na rozvoj ovariálního hyperstimulačního syndromu. Při této analýze se ale počty porovnávaných vzorků výrazně redukuje a tak třebaže měl být z této analýzy vyřazen polymorfismus Asn291Ser (kvůli příliš nízkému zastoupení 291Ser alely ve studované populaci - 6,4% u kontrolních žen a 4,1 % u pacientek s OHSS), byly výsledné počty v jednotlivých skupinách tak nízké, že z nich nelze usuzovat žádné závěry (pro ilustraci tabulka 18).

Studovaný počet vzorků v této diplomové práci je pro tento typ analýzy příliš nízký, aby mohla být provedena s nadějí na smysluplné výsledky.

Kontingenční tabulka haplotypů polymorfizmů insLQ a Ser312Asn v genu pro LHCGR										
Haplotypy polymorfizmů insLQ a Asn312Ser										
	wt/wt Asn/Asn	wt/insLQ Asn/Asn	insLQ/insLQ Asn/Asn	wt/wt Asn/Ser	wt/insLQ Asn/Ser	insLQ/insLQ Asn/Ser	wt/wt Ser/Ser	wt/insLQ Ser/Ser	insLQ/insLQ Ser/Ser	Celkem
Kontrolní ženy										
N	16	7	4	38	30	4	29	17	4	149
%	10,7	4,7	2,7	25,5	20,1	2,7	19,5	11,4	2,7	100
Pacientky s OHSS										
N	4	3	0	9	15	2	18	6	1	58
%	6,9	5,2	0	15,5	25,9	3,4	31,0	10,3	1,7	100

Tabulka 18. Kontingenční tabulka haplotypů polymorfizmů insLQ a Ser312Asn. V řádce s haplotypy je nahoře uveden genotyp polymorfizmu insLQ a pod ním genotyp polymorfizmu Ser312Asn. N označuje řádek s absolutním počtem vzorků, řádek pod ním jsou procenta. Zkratka insLQ označuje polymorfnní inserci leucinu a glycinu za 18. aminokyselinovou pozici, wt je zkratka odvozená od anglického “wild type” a označuje alelu s referenční sekvencí (tedy bez inserce insLQ).

6 Diskuze

Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS) je závažná komplikace ART, která může ohrozit život pacientky. Je velmi důležité včas rozeznat rizikové faktory a případnou hypersenzitivitu ženy k hormonální stimulaci a podle toho léčbu upravit. Individualizované stimulační protokoly by zvýšily efektivitu léčby za současného snížení rizika nepříznivého výsledku a komplikací (Alviggi et al., 2012). Bohužel, navzdory intenzivnímu výzkumu v této oblasti a měření mnoha různých biomarkerů, zatím neexistuje systém testů umožňující spolehlivě odhadnout citlivost ovarií před COH. Je pravděpodobné, že hormonální regulaci ovarií modulují genetické polymorfizmy hormonálních receptorů, což může být atraktivním tématem pro studium nejen kvůli individualizaci COH. To ale vyžaduje další systematické studie početnějších vyšetřovaných souborů k odhalení jejich jemné interakce (Achrekar et al., 2009a, Boudjenah et al., 2012).

Receptory pro LH a FSH, stejně jako samotný LH, jsou dobrými kandidáty, protože jsou přímo zahrnuty v odpovědi na hormonální stimulaci. Zatímco polymorfizmy v genu pro FSHR jsou již delší dobu intenzivně studovány, studium polymorfizmů v genu pro LHCGR ve vztahu k ART je zatím na počátku. O tom svědčí i skutečnost, že je tato studie první, která analyzuje možnou souvislost těchto polymorfizmů u více než 50 žen s OHSS.

V této diplomové práci byly stanoveny genotypy tří vybraných polymorfizmů (insLQ, Asn291Ser a Ser312Asn) v genu pro LHCGR u 149 kontrolních žen a 102 kontrolních mužů s ověřenou paternitou a maternitou. Tato studie tak prozatím patří k ojedinělým studiím evropského obyvatelstva, která u jedné populace současně tyto polymorfizmy zkoumá u mužů i u žen. Dále byly stejné polymorfizmy analyzovány i u 58 pacientek, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS s cílem zjistit, zda tyto polymorfizmy mají vliv na rozvoj OHSS – ať už samostatně nebo v kombinaci.

Polymorfismus insLQ

Polymorfismus insLQ (rs4539842) se nachází na N-konci proteinu blízko signální sekvence. Byl analyzován u 149 kontrolních žen a 101 kontrolních mužů pomocí fragmentační analýzy. Spolehlivost metody byla ověřena sekvenací 20 vybraných vzorků. Genotypové ani alelické frekvence se mezi pohlavími neliší ($P = 0,833$, $P = 0,676$; v tomto pořadí). Naše výsledky jsou ve shodě s prevalencí tohoto polymorfizmu z jiných evropských studií.

Není jasné, zda přítomnost insLQ ovlivňuje aktivitu nebo funkci proteinu, přestože svou blízkostí u signálního peptidu může ovlivňovat zrání receptoru v buňce a jeho umístování na membránu, jak ukazuje i 33 nukleotidová inserce do stejného místa (Wu et al.,

1998, Richter-Unruh et al., 2002). První studie in vitro na COS-7 buňkách žádnou změnu v aktivitě LHCGR při přítomnosti insLQ nezjistila (Rodien et al., 1998), následná studie na HEK293 buňkách ale přítomnost insLQ spojuje se zvýšenou aktivitou LHCGR (Piersma et al., 2006). Vliv přítomnosti insLQ na aktivitu LHCGR podporují i práce dokládající vliv tohoto polymorfizmu na agresivitu rakoviny prsu (Powell et al., 2003, Piersma et al., 2007a).

Při porovnání genotypových a alelických frekvencí kontrolních žen s ověřenou fertilitou s pacientkami, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS nebyla zjištěna žádná souvislost polymorfizmu insLQ s rozvojem OHSS ($P = 0,6672$, $P = 1$; v tomto pořadí). OR také žádnou souvislost tohoto polymorfizmu s rozvojem OHSS nenaznačuje.

Tuto souvislost zatím zjišťovala jen skupina vědců ze Švédska na 21 ženách, u kterých se rozvinul závažný stupeň OHSS, v porovnání s 51 zdravými ženami, které podstoupily hormonální stimulaci pro IVF/ICSI ale OHSS se u nich nerozvinul. V jejich výsledcích sice frekvence mezi pacientkami (genotypové frekvence: wt/wt 38,1 %, wt/insLQ 42,9 %, insLQ/insLQ 19,0 %; alelické frekvence: wt 59,5 %, insLQ 40,5 %) a kontrolními ženami (genotypové frekvence: wt/wt 51%, wt/insLQ 43,1 %, insLQ/insLQ 5,9 %; alelické frekvence: wt 72,5 %, insLQ 27,5 %) naznačovaly větší zastoupení insLQ alely u pacientek s OHSS, po vyhodnocení Fischerovým exaktním testem ale tento trend nedosáhl statistické významnosti (Kerkela et al., 2007). To bylo způsobeno příliš malým testovaným souborem. Soubor pacientek s OHSS i kontrolních žen genotypovaných v rámci této diplomové práce byl třikrát větší a přesto se žádnou souvislost polymorfizmu insLQ s rozvojem OHSS nepodařilo prokázat.

Pacient P008A

Ve skupině kontrolních mužů byl analyzován i pacient P008A. Při genotypizaci polymorfizmu insLQ v 1. exonu genu pro LHCGR u něj fragmentační analýza a následná sekvenace odhalili inzerci dlouhou 18 nukleotidů vedoucí k vložení 6 aminokyselin kousek od místa běžné inserce insLQ (obrázek 27). Tato delší inserce n.42insCAGCTGCTGAAGCTGCTG neposunuje čtecí rámec a vede k proteinové inzerci p.ins14QLLKLL.

Takováto inserce v literatuře zatím nebyla popsána. Je ale pravděpodobné, že bude mít na funkci receptoru stejný vliv jako inserce 33 nukleotidů za 54. nukleotid (tedy do místa běžné inserce insLQ, na obrázku 27 znázorněno zelenou hvězdičkou). Tato 33 nukleotidová inserce vedoucí ke vložení 11 aminokyselin také neposouvá čtecí rámec, a přesto je díky ní receptor inaktivní. Transfekční studie na HEK buňkách u ní ukázaly změněnou expresi mutantního receptoru, kdy nebylo možné mutantní receptor na povrchu buňky vůbec detekovat. To je nejspíše způsobeno tím, že inserce leží v těsné blízkosti místa štěpení signálního peptidu, který v tomto případě zřejmě nebyl rozeznán a odštěpen.

Genotypové ani alelické frekvence se mezi pohlavími neliší ($P = 0,593$, $P = 0,562$; v tomto pořadí) a jsou ve shodě i s výsledky z ostatních evropských populačních studií. Mírný trend v obohacení alely 291Ser u českých žen byl zaznamenán pouze v porovnání s ženami ze Sardinie ($P = 0,082$ pro genotypové, $P = 0,053$ pro alelické frekvence), což může být ale způsobeno nízkou frekvencí alely 291Ser v populaci obecně. Pro ověření tohoto jevu by bylo vhodné zvětšit soubory porovnávaných žen.

Při porovnání genotypových a alelických frekvencí kontrolních žen s ověřenou fertilitou s pacientkami, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS, nebyla zjištěna žádná souvislost polymorfismu Asn291Ser s rozvojem OHSS ($P = 0,730$ pro genotypové frekvence, $P = 0,491$ pro alelické frekvence). OR bylo u alelických frekvencí stanoveno na 1,4774 (95% IS = 0,573 – 4,634), což sice naznačuje, že přítomnost Ser alely mírně zvyšuje pravděpodobnost vzniku OHSS, vzhledem k šíři IS a velmi nízké frekvenci této alely v populaci ale nelze činit žádné závěry.

Vliv tohoto polymorfismu byl studován zatím pouze na rozvoj rakoviny prsu (Piersma et al., 2007b) a PCOS u žen (Capalbo et al., 2012) a na poruchu sestupu varlat u mužů (Simoni et al., 2008), žádná souvislost ale ani v jedné studii zjištěna nebyla. To může být způsobeno příliš nízkým výskytem Asn291Ser v populaci. Počet analyzovaných vzorků je však příliš malý pro zjištění klinicky významných výsledků.

Polymorfismus Ser312Asn

Polymorfismus Ser312Asn (rs2293275) je umístěn ve velké N-terminální doméně LHCGR. Je v silné genové vazbě s Asn291Ser ležícím také v 10. exonu genu pro LHCGR, přesto jsou ale tyto dva polymorfizmy díky velmi odlišným frekvencím v populaci jen málo korelovány. Distribuce polymorfismu Ser312Asn byla detekována v kontrolní skupině 149 žen a 102 mužů pomocí TaqMan®MGB™ sond, spolehlivost metody byla ověřena sekvenací 20 vzorků. Genotypové ani alelické frekvence se mezi pohlavími neliší ($P = 0,792$, $P = 0,519$ v tomto pořadí). Naše výsledky jsou u žen ve shodě s prevalencí tohoto polymorfismu z jiných evropských zemí, významně se lišily pouze od výsledků z populace žen na Sardinii (Capalbo et al., 2012), tyto výsledky byly ale samy o sobě odlišné od ostatních evropských studií.

U mužů se liší výsledky mezi Čechy a Němci (Simoni et al., 2008). Genotypové frekvence u Němců ukazují oproti Čechům trend k obohacení genotypu Asn/Asn, při vyhodnocení alelických frekvencí je obohacení Asn alely statisticky průkazné ($P = 0,0212$). Tento rozdíl může být způsoben malým počtem analyzovaných vzorků Čechů, jiným výběrem mužů pro analýzu (v této studii byla plodnost mužů ověřena přítomností minimálně dvou dětí, Němci byly podrobena důkladným testům včetně analýzy spermatu) nebo etnickými

rozdíly mezi Čechy a západními Němci (v německé studii byly analyzovány vzorky mužů pocházející ze západního Německa, ústní sdělení), tento rozdíl by ale měl být minimální.

Přítomnost alely 312Asn je asociovaná s vyšším rizikem vzniku rakoviny prsu u žen (Piersma et al., 2007b) a s poškozením spermatogeneze u mužů (Simoni et al., 2008). Pro ART je ale významná hlavně spojitost tohoto polymorfizmu s PCOS, protože tento syndrom je jedním z hlavních predisponujících faktorů k rozvoji OHSS. Spojitost Ser312Asn s PCOS studovaly zatím ale jen dvě studie a došly k protichůdným závěrům.

Valkenburg s kolegy (2009) studoval výskyt Ser312Asn na 518 pacientkách s PCOS a 2916 kontrolních ženách z „běžné populace“. Kontrolní ženy pochází z rotterdamské studie, jedná se tedy o starší bělošské ženy (v době odběru vzorků starší 55 let) žijící ve městě Ommoord blízko Rotterdamu v Nizozemí. Do studie byly přítom vybrány jen vzorky žen, u kterých nastala menopauza ve více než 45 letech. Žádnou souvislost polymorfizmu Ser312Asn s PCOS ale nedetekovali (Valkenburg et al., 2009).

Totéž studoval i Capalbo s kolegy na Sardinii na 198 pacientkách s PCOS. Jako kontroly vybrali 187 žen bez známek PCOS a menstruačních poruch. V tomto případě detekovali silnou asociaci přítomnosti alely 312Ser s rizikem PCOS. Výskyt alespoň jedné alely 312Ser zvyšovala riziko vzniku PCOS 2x, u homozygotů 312Ser/312Ser bylo riziko větší 2,73x, oproti ženám s genotypem 312Asn/312Asn (Capalbo et al., 2012).

Rozdílné závěry obou studií mohou být způsobeny velikostí souboru, odlišným životním stylem žen nebo nejpravděpodobněji, rozdílným výběrem kontrolní skupiny žen. Valkenburg s kolegy (2009) z kontrolní skupiny nevyřadil ženy s PCOS, které se podle něj v běžné populaci vyskytují v 5 - 8 %, zatímco Capalbo s kolegy (2012) tyto ženy z kontrolní skupiny vyřadil, protože se podle nich v populaci vyskytují v přibližně 15 %. Přestože obě skupiny uvádějí, že PCOS definovaly podle stejných, rotterdamských kritérií, může být problém právě zde. Pro porovnání jsou v tabulce 19 shrnuty výsledky ze dvou studií, které uvádějí prevalence PCOS podle všech tří v dnešní době používaných definicí PCOS na stejném souboru pacientek (March et al., 2010, Yildiz et al., 2012).

Dalším možným důvodem k rozdílným výsledkům je jiná frekvence 312Ser alely u žen z kontinentální části Evropy a ze Sardinie (podrobně tabulky 14 a 16, strana 62 a 63). Přestože Sardinie není geograficky vzdálená od pobřeží Itálie, je díky životnímu stylu místních obyvatel relativně izolovaná s omezeným genovým tokem. Tuto izolaci a samostatný vývoj některých oblastí Sardinie potvrzují i genealogické studie. Jedna z posledních takovýchto studií přinesla několik modelů vývoje mitochondriální DNA na Sardinii za posledních 2500 let a nejpravděpodobnější scénář ukazuje na přímou linii dnešních obyvatel jedné z oblastí na Sardinii (Ogliastra) s předky Sardiňanů z doby bronzové (Ghirotto et al., 2010). Bylo by zajímavé ověřit možnost, že je polymorfismus Ser312Asn starou mutací charakteristickou

pro pravěké předky, která se zakonzervovala na tomto ostrově, i na dalších relativně izolovaných populacích v Evropě jako jsou např. Baskové ve Španělsku.

Prevalence PCOS			
Výzkumná skupina (počet žen)	Definice PCOS podle		
	NIH	rotterdamská kritéria	AES
March et al., 2010 (N=728), Austrálie*	8,7 %	17,8 %	12,0 %
Yildiz et al., 2012 (N=392), Turecko	6,1 %	19,9 %	15,3 %

Tabulka 19. Prevalence PCOS podle různých kritérií pro definici syndromu. Kritéria podle: NIH = Národního institutu zdraví (National Institutes of Health, 1992), rotterdamská kritéria = podle semináře v Rotterdamu zaměřeného na PCOS (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004), AES = podle Spolku pro nadměrné množství androgenů (Androgen Excess Society, 2006). Přesná kritéria jsou uvedena v příslušných manuálech, jejich rozbor není náplní této diplomové práce. * Studované ženy v Austrálii byly z 94% evropského původu, třetina z nich pocházela ze Středomoří, PCOS = syndrom polycystických ovaríí, ESHRE = European Society of Human Reproduction and Embryology, Evropské společenství pro lidskou reprodukci a embryologii (March et al., 2010, Yildiz et al., 2012).

Je zajímavé, že ačkoliv u polymorfizmu Ser312Asn in-vitro studie neprokázaly žádný rozdíl v aktivitě LHCGR, je tento polymorfizmus asociovaný s hormonálně dependentními nemocemi (Piersma et al., 2007b, Simoni et al., 2008). To může být způsobeno tím, že polymorfizmus Ser312Asn nemusí být kauzální mutací, ale může být ve vazbě s jiným polymorfizmem (Simoni et al., 2008). Mohlo by se jednat o tichou mutaci rs11125179 nezpůsobující změnu v aminokyselinové sekvenci (Asp355Asp) v 11. exonu blízko intron/exonového rozhraní, případně o některý SNP v intronu (Piersma et al., 2007b). Možností jsou také varianty v genu pro izoformu 2 transkripčního faktoru TFIIA- α/β (NM_172196), který se s genem pro LHCGR částečně překrývá právě v místě 10. exonu genu pro LHCGR, pouze je umístěn na opačném vlákně DNA. Tento transkripční faktor je specificky transkribován ve spermatocytech a haploidních spermatidách, což by mohlo vysvětlovat souvislost polymorfizmu Ser312Asn s poškozenou spermatogenezí (Simoni et al., 2008), spojení s rakovinou prsu a PCOS u žen ale nevysvětluje. Bylo by přínosné zopakovat in-vitro transfekční studie a ještě jednou ověřit vliv 312Ser a 312Asn alel na aktivitu LHCGR.

Při porovnání genotypových a alelických frekvencí kontrolních žen s ověřenou fertilitou s pacientkami, u kterých se rozvinul III.-V. stupeň OHSS ale žádná statisticky významná souvislost s rozvojem OHSS zjištěna nebyla ($P = 0,352$, $P = 0,180$; v tomto pořadí). OR bylo u alelických frekvencí stanoveno na 0,72 (95% IS = 0,457 – 1,122), což naznačuje mírně ochranný vliv alely 312Asn před rozvinutím OHSS, tento výsledek ale není i vzhledem k šířce IS dostatečně statisticky významný, aby z něj bylo možné činit závěry. Bylo by proto vhodné ověřit tutěž závislost na větším souboru pacientek i kontrol.

Haplotypová analýza

Kombinovaný efekt studovaných polymorfizmů na rozvoj OHSS se ověřuje haplotypovou analýzou, při které se ale výrazně redukuje počty porovnávaných vzorků. Počet vzorků dostupných pro tuto diplomovou práci tak nebyl pro tento typ analýzy ani po vyřazení jednoho z polymorfizmů dostatečný.

Závěr

Výsledky získané v této diplomové práci nemohou prokázat žádnou souvislost studovaných polymorfizmů (insLQ, Asn291Ser, Ser312Asn) se zvýšeným rizikem vzniku OHSS. Polymorfismus insLQ byl v této souvislosti studován na malém počtu pacientek ve Švédsku, kde spojení alely insLQ s rozvojem OHSS také nedosáhlo statistické významnosti (Kerkela et al., 2007). Zbylé dva polymorfizmy zatím v souvislosti s rozvojem OHSS studovány nebyly. Výsledky této diplomové práce tak budou korigovány dalším systematickým studiem možné asociace s polymorfizmy v genech pro LH a FSHR. Získané výsledky by bylo vhodné doplnit i nezávislými studii.

Za přenos signálu do buňky může nejen receptor, ale i vazba hormonu. V návaznosti na tuto práci proto budou genotypovány i vybrané polymorfizmy v genu pro LH a získané výsledky budou analyzovány společně s již zjištěnými polymorfizmy v genu pro LHCGR.

OHSS je velmi komplexní onemocnění. Pokud rozeznáme prediktivní faktory citlivosti ovarií, podaří se pacientky díky individualizované COH léčit i bez nežádoucích komplikací typu OHSS nebo naopak nutnosti zrušit fertilizační cyklus z důvodu nedostatečné odpovědi ovarií na léčbu. V současnosti však zůstává nejdůležitější stránkou prevence OHSS zkušená péče a pozorování ošetřujícího lékaře s dobrou informovaností pacientky a jejího partnera o možných rizicích hormonální terapie.

7 Souhrn

- Byl určen genotyp polymorfizmů insLQ (rs4539842), Asn291Ser (rs12470652) a Ser312Asn (rs2293275) v genu pro LHCGR u 149 fertálních žen, 102 fertálních mužů a 58 pacientek se III.-V. stupněm OHSS.
- Genotypové ani alelické frekvence se mezi kontrolními ženami a muži u žádného ze studovaných polymorfizmů neliší.
- Prevalence studovaných polymorfizmů u českých žen a mužů jsou ve shodě s výsledky z ostatních evropských studií, statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze u polymorfismu Ser312Asn mezi českými a německými muži a mezi českými ženami a obyvatelkami Sardinie.
- Nebyl zjištěn rozdíl v prevalenci detekovaných polymorfizmů u kontrolních žen a u pacientek s OHSS.
- Při genotypizaci polymorfismu insLQ byla u jednoho z kontrolních mužů objevena zatím nepopsaná inserční mutace. Fertilita pacienta byla v pořádku. Klinický význam této mutace bude nutné ověřit v dalších studiích.
- Části této práce byly prezentovány formou plakátu na konferencích:
 - 8. - 11. 11. 2012: Ovarian Club II: The fertilization process of the oocyte and embryo development in relation to various clinical conditions, Praha příloha I
 - 13. – 14. 11. 2012: 11. Česko-slovenská konference Reprodukční medicíny - 22. symposium Asistované reprodukce 2012, Brno příloha II
 - Práce byla přijata na konferenci ESHRE 7. – 10. 7. 2013, Londýn k prezentaci plakátovým sdělením (The prevalence of insLQ, Asn291Ser and Ser312Asn polymorphisms of luteinizing hormone receptor gene in Czech population and patients with ovarian hyperstimulation syndrome)

8 Seznam použité literatury

- Achrekar, S. K., Modi, D. N., Desai, S. K., Mangoli, V. S., Mangoli, R. V. & Mahale, S. D. 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., Modi, D. N., Desai, S. K., Mangoli, V. S., Mangoli, R. V. & Mahale, S. D. 2009b. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. *Reproductive Biomedicine Online*, **18**, 509-515.
- Akerman, F. M., Lei, Z. M., Rao, C. V. & Nakajima, S. T. 2000. A case of spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome with a potential mutation in the hCG/LH receptor gene. *Fertility and Sterility*, **74**, 403-404.
- Altmae, S., Hovatta, O., Stavreus-Evers, A. & Salumets, A. 2011. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? *Human Reproduction Update*, **17**, 813-828.
- Alvaggi, C., Clarizia, R., Pettersson, K., Mollo, A., Humaidan, P., Strina, I., Coppola, M., Ranieri, A., D'Uva, M. & De Placido, G. 2009. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reproductive Biomedicine Online*, **18**, 9-14.
- Alvaggi, C., Humaidan, P. & Ezcurra, D. 2012. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **10**.
- Arnhold, I. J., Lofrano-Porto, A. & Latronico, A. C. 2009. Inactivating Mutations of Luteinizing Hormone beta-Subunit or Luteinizing Hormone Receptor Cause Oligo-Amenorrhea and Infertility in Women. *Hormone Research*, **71**, 75-82.
- Ascoli, M., Fanelli, F. & Segaloff, D. L. 2002. The lutropin/chorionic gonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*, **23**, 141-174.
- ASRM 2008. Ovarian hyperstimulation syndrome. In: MEDICINE, A. S. F. R. (Ed.), Fertility and Sterility.
- Atger, M., Misrahi, M., Sar, S., Leflem, L., Dessen, P. & Milgrom, E. 1995. Structure of the human luteinizing-hormone choriogonadotropin receptor gene - unusual promoter and 5'-noncoding-regions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **111**, 113-123.
- Ayhan, A., Tuncer, Z. S. & Aksu, A. T. 1996. Ovarian hyperstimulation syndrome associated with spontaneous pregnancy. *Human Reproduction*, **11**, 1600-1601.
- Bentov, Y., Kenigsberg, S. & Casper, R. F. 2012. A novel luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mutation associated with amenorrhea, low oocyte yield, and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, **97**, 1165-1168.
- Berndt, S., d'Hauterive, S. P., Blacher, S., Pequeux, C., Lorquet, S., Munaut, C., Applanat, M., Herve, M. A., Lamande, N., Corvol, P., van den Brule, F., Frankenne, F., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., Geenen, V., Noel, A., *et al.* 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., Dittrich, R., Hager, I., Muller, A., Oeser, S., Beckmann, M. W., Hamori, M., Fasching, P. A. & Strick, R. 2008a. Association of FSH receptor and CYP19A1 gene variations with sterility and ovarian hyperstimulation syndrome. *Reproduction*, **135**, 107-116.
- Binder, H., Flegel, W. A., Emran, J., Muller, A., Cupisti, S., Beckmann, M. W., Eckstein, R., Dittrich, R. & Ringwald, J. 2008b. Blood group A: an overseen risk factor for earlyonset ovarian hyperstimulation syndrome? *Reproductive Biomedicine Online*, **17**, 185-189.
- Boudjenah, R., Molina-Gomes, D., Torre, A., Bergere, M., Bailly, M., Boitrelle, F., Taieb, S., Wainer, R., Benahmed, M., de Mazancourt, P., Selva, J. & Vialard, F. 2012. Genetic Polymorphisms Influence the Ovarian Response to rFSH Stimulation in Patients Undergoing In Vitro Fertilization Programs with ICSI. *Plos One*, **7**.
- Buffet, N. C., Djakoure, C., Maitre, S. C. & Bouchard, P. 1998. Regulation of the human menstrual cycle. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **19**, 151-186.
- Butler, J. M., Buel, E., Crivellente, F. & McCord, B. R. 2004. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, **25**, 1397-1412.

- Capalbo, A., Sagnella, F., Apa, R., Fulghesu, A. M., Lanzone, A., Morciano, A., Farcomeni, A., Gangale, M. F., Moro, F., Martinez, D., Ciardulli, A., Palla, C., Uras, M. L., Spettu, F., Cappai, A., Carcassi, C., *et al.* 2012. The 312N variant of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) confers up to 2 center dot 7-fold increased risk of polycystic ovary syndrome in a Sardinian population. *Clinical Endocrinology*, **77**, 113-119.
- Cepni, I., Erkan, S., Ocal, P. & Ozturk, E. 2006. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome presenting with acute abdomen. *Journal of Postgraduate Medicine*, **52**, 154-155.
- Cerrillo, M., Pacheco, A., Rodriguez, S., Gomez, R., Delgado, F., Pellicer, A. & Garcia-Velasco, J. A. 2011. Effect of GnRH agonist and hCG treatment on VEGF, angiopoietin-2, and VE-cadherin: trying to explain the link to ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, **95**, 2517-2519.
- Cole, L. A. 2010. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **8**.
- Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M. & Oh, J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **356**, 65-73.
- Courbiere, B., Oborski, V., Braunstein, D., Desparoir, A., Noizet, A. & Gamberre, M. 2011. Obstetric outcome of women with in vitro fertilization pregnancies hospitalized for ovarian hyperstimulation syndrome: a case-control study. *Fertility and Sterility*, **95**, 1629-1632.
- d'Alva, C. B., Serafini, P., Motta, E., Kohek, M. B. D., Latronico, A. C. & Mendonca, B. B. 2005. Absence of follicle-stimulating hormone receptor activating mutations in women with iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, **83**, 1695-1699.
- Daelemans, C., Smits, G., de Maertelaer, V., Costagliola, S., Englert, Y., Vassart, G. & Delbaere, A. 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.
- Delvigne, A. 2009. Epidemiology of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, **19**, 8-13.
- Di Carlo, C., Savoia, F., Ferrara, C., Tommaselli, G. A., Bifulco, G. & Nappi, C. 2012. Case report: a most peculiar family with spontaneous, recurrent ovarian hyperstimulation syndrome. *Gynecological Endocrinology*, **28**, 649-651.
- Dickinson, R. E., Stewart, A. J., Myers, M., Millar, R. P. & Duncan, W. C. 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., Erel, C. T., Cine, N., Ozbek, U., Hacıhanefioglu, B. & Ertunçalp, E. 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., Henriksson, M., Unander, M., Nilsson, L. & Brannstrom, M. 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.
- Fiedler, K. & Ezcurra, D. 2012. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **10**, 10.
- Gearhart, J. & Coutifaris, C. 2011. In Vitro Fertilization, the Nobel Prize, and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, **8**, 12-15.
- Gera, P. S., Tatpati, L. L., Allemand, M. C., Wentworth, M. A. & Coddington, C. C. 2010. Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertility and Sterility*, **94**, 173-178.
- Ghirotto, S., Mona, S., Benazzo, A., Paparazzo, F., Caramelli, D. & Barbujani, G. 2010. Inferring Genealogical Processes from Patterns of Bronze-Age and Modern DNA Variation in Sardinia. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 875-886
- Golan, A. 1989. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. In: RON-EL, R., HERMAN, A., SOFFER, Y. & WEINRAUB, Z. (Eds.) *Obstetrical and Gynecological Survey*.
- Golan, A. & Weissman, A. 2009a. A modern classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, **19**, 28-32.
- Golan, A. & Weissman, A. 2009b. Response: Towards a clinically useful classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, **19**, 755-755.

- Gromoll, J., Eiholzer, U., Nieschlag, E. & Simoni, M. 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.
- Hanevik, H. I., Hilmarsen, H. T., Skjelbred, C. F., Tanbo, T. & Kahn, J. A. 2012. Increased risk of ovarian hyperstimulation syndrome following controlled ovarian hyperstimulation in patients with vascular endothelial growth factor+405 cc genotype. *Gynecological Endocrinology*, **28**, 845-849.
- Hsu, S. Y. T. 2003. New insights into the evolution of the relaxin - LGR signaling system. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **14**, 303-309.
- Chae, H. D., Park, E. J., Kim, S. H., Kim, C. H., Kang, B. M. & Chang, Y. S. 2001. Ovarian hyperstimulation syndrome complicating a spontaneous singleton pregnancy: A case report. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **18**, 120-123.
- Chambers, A. E., Nayini, K. P., Mills, W. E., Lockwood, G. M. & Banerjee, S. 2011. Circulating LH/hCG receptor (LHCGR) may identify pre-treatment IVF patients at risk of OHSS and poor implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**.
- Chen, C. D., Chen, S. U. & Yang, Y. S. 2012. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **26**, 817-827.
- Chen, C. D., Wu, M. Y., Chao, K. H., Lien, Y. R., Chen, S. U. & Yang, Y. S. 2011. Update on management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, **50**, 2-10.
- Chui, M. H., Ozbey, N. C., Ezzat, S., Kapran, Y., Erbil, Y. & Asa, S. L. 2009. Case Report: Adrenal LH/hCG Receptor Overexpression and Gene Amplification Causing Pregnancy-Induced Cushing's Syndrome. *Endocrine Pathology*, **20**, 256-261.
- Jarkovska, K., Skalnikova, H. K., Halada, P., Hrabakova, R., Moos, J., Rezabek, K., Gadher, S. J. & Kovarova, H. 2011. Development of ovarian hyperstimulation syndrome: interrogation of key proteins and biological processes in human follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Molecular Human Reproduction*, **17**, 679-692.
- Jeha, G. S., Lowenthal, E. D., Chan, W. Y., Wu, S. M. & Karaviti, L. P. 2006. Variable presentation of precocious puberty associated with the D564G mutation of the LHCGR gene in children with testotoxicosis. *Journal of Pediatrics*, **149**, 271-274.
- Ji, T. H., Grossmann, M. & Ji, I. H. 1998. G protein-coupled receptors I. Diversity of receptor-ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 17299-17302.
- Jun, J. K., Yoon, J. S., Ku, S. Y., Choi, Y. M., Hwang, K. R., Park, S. Y., Lee, G. H., Lee, W. D., Kim, S. H., Kim, J. G. & Moon, S. Y. 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., Skottman, H., Friden, B., Bjuresten, K., Kere, J. & Hovatta, O. 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.
- Kremer, H., Kraaij, R., Toledo, S. P. A., Post, M., Fridman, J. B., Hayashida, C. Y., Vanreen, M., Milgrom, E., Ropers, H. H., Mariman, E., Themmen, A. P. N. & Brunner, H. G. 1995. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing-hormone receptor gene. *Nature Genetics*, **9**, 160-164.
- Latronico, A. C., Anasti, J., Arnhold, I. J. P., Rapaport, R., Mendonca, B. B., Bloise, W., Castro, M., Tsigos, C. & Chrousos, G. P. 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.
- Latronico, A. C., Chai, Y. H., Arnhold, I. J. P., Liu, X. B., Mendonca, B. B. & Segaloff, D. L. 1998. A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Molecular Endocrinology*, **12**, 442-450.
- Laue, L., Chan, W. Y., Hsueh, A. J. W., Kudo, M., Hsu, S. Y., Wu, S. M., Blomberg, L. A. & Cutler, G. B. 1995. Genetic-heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing-hormone

- receptor in familial male-limited precocious puberty. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 1906-1910.
- Laue, L., Wu, S. M., Kudo, M., Hsueh, A. J. W., Cutler, G. B., Jelly, D. H., Diamond, F. B. & Chan, W. Y. 1996a. Heterogeneity of activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in male-limited precocious puberty. *Biochemical and Molecular Medicine*, **58**, 192-198.
- Laue, L. L., Wu, S. M., Kudo, M., Bourdony, C. J., Cutler, G. B., Hsueh, A. J. W. & Chan, W. Y. 1996b. Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Molecular Endocrinology*, **10**, 987-997.
- Lazaruk, K., Walsh, P. S., Oaks, F., Gilbert, D., Rosenblum, B. B., Menchen, S., Scheibler, D., Wenz, H. M., Holt, C. & Wallin, J. 1998. Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*, **19**, 86-93.
- Lee, A., Christenson, L. K., Patton, P. E., Burry, K. A. & Stouffer, R. L. 1997. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Human Reproduction*, **12**, 2756-2761.
- Leeh, T. H., Liu, C. H., Huang, C. C., Wu, Y. L., Shih, Y. T., Ho, H. N., Yang, Y. S. & Lee, M. S. 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., Rosen, G. F., Cassidenti, D. L., Yee, B., Meldrum, D., Wisot, A. & Pedram, A. 1998. Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1978-1985.
- Loutradis, D., Patsoula, E., Minas, V., Koussidis, G. A., Antsaklis, A., Michalas, S. & Makrigiannakis, A. 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., Feldmar, P., Kluckova, H., Hrehorcak, M., Diblik, J., Paulasova, P., Turnovec, M. & Vilimova, S. 2010. FSH-R polymorphism in severe types of OHSS (type III and IV/V): results of a Czech pilot study. *Human Reproduction*, **25**, 1323-1323.
- Manau, D., Fabregues, F., Penarrubia, J., Creus, M., Carmona, F., Casals, G., Jimenez, W. & Balasch, J. 2007. Vascular endothelial growth factor levels in serum and plasma from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Human Reproduction*, **22**, 669-675.
- March, W. A., Moore, V. M., Willson, K. J., Phillips, D. I. W., Norman, R. J. & Davies, M. J. 2010. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction*, **25**, 544-551.
- Mathur, R. 2005. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. In: EVBUOMWAN, I. (Ed.), *Current Obstetrics & Gynaecology*.
- Mathur, R. & Jenkins, J. 2009. Towards a clinically useful classification of OHSS. *Reproductive Biomedicine Online*, **19**, 434-434.
- Mathur, R. S., Akande, A. V., Keay, S. D., Hung, L. P. & Jenkins, J. M. 2000. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility*, **73**, 901-907.
- Mayorga, M. P., Gromoll, J., Behre, H. M., Gassner, C., Nieschlag, E. & Simoni, M. 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., Healy, D. L., Rogers, P. A. W., Sullivan, J., Beaton, L., Haning, R. V., Connolly, D. T. & Robertson, D. M. 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.
- Menon, K. M. J., Clouser, C. L. & Nair, A. K. 2005. Gonadotropin receptors. *Endocrine*, **26**, 249-257.
- Menon, K. M. J. & Menon, B. 2012. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors - A perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **356**, 88-97.
- Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Ibuki, Y. & Igarashi, M. 1990. Cloning and sequencing of human LH hCG receptor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **172**, 1049-1054.

- Minegishi, T., Tano, M., Abe, Y., Nakamura, K., Ibuki, Y. & Miyamoto, K. 1997. Expression of luteinizing hormone human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, **3**, 101-107.
- Mishra, V. V., Devi, A. D., Aggarwal, R. S., Jasani, A. F., Vachhani, M. V. & Khurana, S. A. 2013. Early and Late Ovarian Hyperstimulation Syndrome: Two Distinct Clinical Entities. *Kuwait Medical Journal*, **45**, 21-25.
- Mohiyiddeen, L., Newman, W. G., McBurney, H., Mulugeta, B., Roberts, S. A. & Nardo, L. G. 2012. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers. *Fertility and Sterility*, **97**, 677-681.
- Montanelli, L., Delbaere, A., Di Carlo, C., Nappi, C., Smits, G., Vassart, G. & Costagliola, S. 2004a. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **89**, 1255-1258.
- Montanelli, L., Van Durme, J. J. J., Smits, G., Bonomi, M., Rodien, P., Devor, E. J., Moffat-Wilson, K., Pardo, L., Vassart, G. & Costagliola, S. 2004b. Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor. *Molecular Endocrinology*, **18**, 2061-2073.
- Nagasaki, K., Katsumata, N., Ogawa, Y., Kikuchi, T. & Uchiyama, M. 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., Yamashita, S., Omori, Y. & Minegishi, T. 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., Chu, M. C., Wang, J. G., Sauer, M. V. & Lobo, R. A. 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.
- Nastri, C. O., Ferriani, R. A., Rocha, I. A. & Martins, W. P. 2010. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **27**, 121-128.
- Navot, D., Bergh, P. A. & Laufer, N. 1992. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies - prevention and treatment. *Fertility and Sterility*, **58**, 249-261.
- Ocal, P., Sahmay, S., Cetin, M., Irez, T., Guralp, O. & Cepni, I. 2011. Serum anti-Mullerian hormone and antral follicle count as predictive markers of OHSS in ART cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **28**, 1197-1203.
- Papamentzelopoulou, M., Mavrogianni, D., Partsinevelos, G. A., Marinopoulos, S., Dinopoulou, V., Theofanakis, C., Anagnostou, E. & Loutradis, D. 2012. LH receptor gene expression in cumulus cells in women entering an ART program. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **29**, 409-416.
- Papanikolaou, E. G., Pozzobon, C., Kolibianakis, E. M., Camus, M., Tournaye, H., Fatemi, H. M., Van Steirteghem, A. & Devroey, P. 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., Tournaye, H., Verpoest, W., Camus, M., Vernaev, V., Van Steirteghem, A. & Devroey, P. 2005. Early and late ovarian hyperstimulation syndrome: early pregnancy outcome and profile. *Human Reproduction*, **20**, 636-641.
- Piersma, D., Berns, E., Verhoef-Post, M., Uitterlinden, A. G., Braakman, I., Pols, H. A. P. & Themmen, A. P. N. 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., Themmen, A. P., Look, M. P., Klijn, J. G., Foekens, J. A., Uitterlinden, A. G., Ap Pols, H. & Berns, E. M. 2007a. GnRH and LHR gene variants predict adverse outcome in premenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, **9**.
- Piersma, D., Verhoef-Post, M., Look, M. P., Uitterlinden, A. G., Pols, H. A. P., Berns, E. & Themmen, A. P. N. 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., Piersma, D., Kevenaar, M. E., van Staveren, I. L., Themmen, A. P. N., Iacopetta, B. J. & Berns, E. 2003. Luteinizing hormone signaling and breast cancer: Polymorphisms and age of onset. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **88**, 1653-1657.
- Qiao, J., Han, B., Liu, B. L., Chen, X., Ru, Y., Cheng, K. X., Chen, F. G., Zhao, S. X., Liang, J., Lu, Y. L., Tang, J. F., Wu, Y. X., Wu, W. L., Chen, J. L., Chen, M. D. & Song, H. D. 2009. A Splice Site Mutation Combined with a Novel Missense Mutation of LHCGR Cause Male Pseudohermaphroditism. *Human Mutation*, **30**, E855-E865.
- Rabau, E., David, A., Serr, D. M., 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-&.
- Rajkhowa, M., Talbot, J. A., Jones, P. W., Pettersson, K., Haavisto, A. M., Huhtaniemi, I. & Clayton, R. N. 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.
- Ranade, K., Chang, M. S., Ting, C. T., Pei, D., Hsiao, C. F., Olivier, M., Pesich, R., Hebert, J., Chen, Y. D. I., Dzau, V. J., Curb, D., Olshen, R., Risch, N., Cox, D. R. & Botstein, D. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Research*, **11**, 1262-1268.
- RCOG 2006. The Management of Ovarian Hyperstimulation Syndrome. In: Gynaecologists, R. C. O. O. A. (Ed.) *Green-top Guideline No.5*.
- Richter-Unruh, A., Martens, J. W. M., Verhoef-Post, M., Wessels, H. T., Kors, W. A., Sinnecker, G. H. G., Boehmer, A., Drop, S. L. S., Toledo, S. P. A., Brunner, H. G. & Themmen, A. P. N. 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., Cetani, F., Costagliola, S., Tonacchera, M., Duprez, L., Minegishi, T., Govaerts, C. & Vassart, G. 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.
- Rosenthal, I. M., Refetoff, S., Rich, B., Barnes, R. B., Sunthornthepvarakul, T., Parma, J. & Rosenfield, R. L. 1996. Response to challenge with gonadotropin-releasing hormone agonist in a mother and her two sons with a constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor - A clinical research center study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **81**, 3802-3806.
- Rousseau-merck, M. F., Misrahi, M., Atger, M., Loosfelt, H., Milgrom, E. & Berger, R. 1990. Localization of the human luteinizing-hormone choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **54**, 77-79.
- Schenker, J. G. & Weinstein, D. 1978. Ovarian hypersimulation syndrome - current survey. *Fertility and Sterility*, **30**, 255-268.
- Serour, G. I., Aboulghar, M., Mansour, R., Sattar, M. A., Amin, Y. & Aboulghar, H. 1998. Complications of medically assisted conception in 3,500 cycles. *Fertility and Sterility*, **70**, 638-642.
- Shi, M. M. 2001. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical Chemistry*, **47**, 164-172.
- Simoni, M., Tuttelmann, F., Michel, C., Bockenfeld, Y., Nieschlag, E. & Gromoll, J. 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., Olatunbosun, O., Delbaere, A., Pierson, R., Vassart, G. & Costagliola, S. 2003. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *New England Journal of Medicine*, **349**, 760-766.
- Sprengel, R., Braun, T., Nikolics, K., Segaloff, D. L. & Seeburg, P. H. 1990. The testicular receptor for follicle-stimulating-hormone - structure and functional expression of cloned cDNA. *Molecular Endocrinology*, **4**, 525-530.
- Suganuma, N., Furui, K., Furuhashi, M., Asada, Y., Kikkawa, F. & Tomoda, Y. 1995. Screening of the mutations in luteinizing-hormone beta-subunit in patients with menstrual disorders. *Fertility and Sterility*, **63**, 989-995.

- Swanton, A., Storey, L., McVeigh, E. & Child, T. 2010. IVF outcome in women with PCOS, PCO and normal ovarian morphology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **149**, 68-71.
- Themmen, A. P. N. 2005. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. *Reproduction*, **130**, 263-274.
- Valkenburg, O., Uitterlinden, A. G., Piersma, D., Hofman, A., Themmen, A. P. N., de Jong, F. H., Fauser, B. & Laven, J. S. E. 2009. Genetic polymorphisms of GnRH and gonadotrophic hormone receptors affect the phenotype of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, **24**, 2014-2022.
- Vasseur, C., Rodien, P., Beau, I., Desroches, A., Gerard, C., de Poncheville, L., Chaplot, S., Savagner, F., Croue, A., Mathieu, E., Lahlou, N., Descamps, P. & Misrahi, M. 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., Horng, S. G., Chang, C. L., Wu, H. M., Tsai, Y. J., Wang, H. S. & Soong, Y. K. 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.
- Wu, S. M., Hallermeier, K. M., Laue, L., Brain, C., Berry, A. C., Grant, D. B., Griffin, J. E., Wilson, J. D., Cutler, G. B. & Chan, W. Y. 1998. Inactivation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by an insertional mutation in Leydig cell hypoplasia. *Molecular Endocrinology*, **12**, 1651-1660.
- Yariz, K. O., Walsh, T., Uzak, A., Spiliopoulos, M., Duman, D., Onalan, G., King, M. C. & Tekin, M. 2011. Inherited mutation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) in empty follicle syndrome. *Fertility and Sterility*, **96**, E125-E130.
- Yildiz, B. O., Bozdag, G., Yapici, Z., Esinler, I. & Yarali, H. 2012. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Human Reproduction*, **27**, 3067-3073.