1. Úvod

Hyperkinetická porucha (ADHD) v dětském věku je psychickou poruchou pozornosti, soustředění a neklidu. Porucha může být velmi často příčinou mnohých sociálně-vzdělávacích problémů, které mohou zcela ovlivnit život jedince. Neposlušnost, nepozornost, nadměrná impulzivnost a celkově hyperaktivní styl chování způsobuje četné problémy ve škole, kde dochází k intelektovému selhávání navzdory průměrné a někdy i nadprůměrné inteligenci žáka. Problémy hyperaktivity se u dětí projevují také ve volném čase zvláště mimo školu - nadměrná pohyblivost a nerozvážná divokost vedou ke zvýšenému nebo alespoň procentuálnímu nárůstu úrazů u postižených ve srovnání s úrazy normálních dětí. Příznaky někdy přetrvávají i během dospívání a dospělosti, kde syndrom vede k sociální maladaptaci s poruchou chování predelikventního charakteru nebo celkově antisociálnímu vývoji. Hyperkinetická porucha patří k nejčastějším příčinám psychiatrické léčby v dětském věku. Porucha postihuje 5 až 10 procent dětské populace v poměru chlapců a dívek 3 až 10:1. Denckla et Rudel (1978) ve své studii zjistili, že u 31-66 % osob přetrvává ADHD i do dospělosti. Porucha ADHD se vyskytuje v 1-2 % dospělé populace. U části postižené populace v dětském věku dochází k vymizení příznaků v období puberty, kdy pak dospělý jedinec nemá již typické příznaky hyperkinetického syndromu, přesto se mohou mnohem častěji vyskytnout problémy v partnerských vztazích, zaměstnání nebo krizových situacích, které dotyčný řeší požitím alkoholu nebo drog k nimž má vyšší sklon.

Příčina hyperkinetické poruchy není doposud jednoznačně známa, etiologie je pravděpodobně heterogenní. Vznik hyperkinetické poruchy je tedy zapříčiněn jak faktory genetickými, tak i faktory negenetickými. K rizikovým negenetickým faktorům patří nízká porodní váha, perinatální hypoxie, traumata mozku nebo vliv toxických látek v prenatálním období (Lewis, 1996). K toxickým látkám zřejmě patří alkohol, olovo a cigaretový kouř. Malá část dětí je ovlivněna potravinovými aditivy a alergeními potravinami. Role nutriční deficience ve vztahu k ADHD zatím nebyla dostatečně prozkoumána, nicméně je pravděpodobné, že patogenezi ADHD budou ovlivňovat také takové faktory jako deficience esenciálních mastných kyselin, deficience železa, zinku a dalších minerálů, relativní poměr proteinů a cukrů atd. (Mercugliano, 1999).

Ve prospěch genetické podstaty ADHD svědčí výsledky mnohých rodinných studií. V těchto studiích bylo zjištěno, že biologičtí rodiče a příbuzní s ADHD mají mnohonásobně vyšší procento možného výskytu symptomů ADHD u svých dětí. U mužů s hyperkinetickou poruchou je pětkrát vyšší pravděpodobnost, že jejich příbuzní prvního stupně budou trpět touto poruchou, a to ve srovnání s normálními kontrolními osobami. Paclt et Florian (1996) shrnuli výsledky studií, podle kterých cca 20-32 % rodičů hyperkinetických dětí trpělo v dětství projevy hyperaktivity. Jiným

důkazem nám mohou být četné studie dvojčat, ve kterých vědci porovnávali výskyt poruchy u jednovaječných dvojčat, která mají identickou genetickou výbavu i podobné životní podmínky. Bylo zjištěno, že u 80 - 90 % dvojčat, kde jedno dítě mělo ADHD, trpělo chorobou i druhé dítě.

V naší studii jsme se zaměřili na výzkum molekulární podstaty ADHD. Za pomocí asociační studie porovnávající alelické frekvence jsme hledali geny, respektive polymorfizmy kandidátních genů, které mají nebo by mohly mít vztah k hyperkinetické poruše. Celkově jsme zkoumali 12 polymorfizmů dvanácti kandidátních genů: TaqI A polymorfizmus genu pro dopaminový receptor D2 (DRD2), 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmus genu pro dopaminový přenašeč (DAT1), Val158Met polymorfizmus genu pro katechol-o-methyltransferázu (COMT), A/G polymorfizmus ve 13. intronu genu pro monoaminoxidázu B (MAOB), M235T polymorfizmus genu pro angiotensinogen (AGT), I/D polymorfizmus genu pro angiotensinkonvertázu (ACE), -174 C/G polymorfizmus genu pro interleukin 6 (IL-6), -330 T/G polymorfizmus genu pro interleukin 2 (IL-2), -308 A/G polymorfizmus genu pro tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α), Val66Met polymorfizmus genu pro brain-derived neutrofický faktor (BDNF), Delta 32 polymorfizmus genu pro chemokinový receptor 5 (CCR-5), Asn40Asp polymorfizmus genu pro μ opioidní receptor (Mu). Kandidátní geny (DRD2, DAT1, COMT, MAOB, Mu) byly vybrány na základě katecholaminové hypotézy, neurobiologických nálezů a neurochemických studií. Dopaminový receptor D2 se například může podílet na regulaci dopaminového sytému, Mu receptor posiluje uvolňování dopaminu na synapsích a dopaminový přenašeč (DAT1) zabezpečuje vychytávání dopaminu ze synaptické štěrbiny. Geny pro katechol-o-methyltransferázu (COMT) a monoaminooxidázu B (MAOB) byly zvoleny, protože kódují metabolizující enzymy, které odbourávají biogenní aminy a kontrolují hladiny neurotransmiterů v centrálním nervovém systému. Jiné geny byly vybrány na základě pozorování, kdy některé proteiny nebo růstové faktory mohou hrát významnou roli při vývoji, růstu a diferenciaci dopaminergních neuronů a astrocytů v centrálním nervovém systému (BDNF, IL-6). V neposlední řadě jsme zkoumali některé polymorfizmy genů, které mohou ovlivňovat důležité imunoregulační (IL-2, CCR-5, TNF-α) nebo jiné fyziologické funkce související s ADHD (ACE, AGT).

2. Základní informace

2.1. Definice pojmů

ADHD & Hyperkinetická porucha

Mezi pojmy ADHD (Attention deficit hyperactivity disorder) a hyperkinetická porucha existuje rozdíl v diagnostických kriteriích. Pojem ADHD vychází z amerického Diagnostic and statistic manual, 4. revize (DSM-IV), naproti tomu pojem Hyperkinetická porucha vychází z Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. decennální revize (MKN-10). V mé disertační práci jsou tyto pojmy často využívány jako synonyma, protože při diagnostice hyperaktivního chování dětí bylo využito obou klasifikačních diagnostických kriterií, zařazení chlapci splňovali kriteria DSM-IV i přísnější kriteria MKN-10. Zaměňování pojmů ADHD a hyperkinetická porucha je běžné i v některých odborných publikacích. Mírnější kriteria DSM-IV jsou rovněž příčinou odlišného publikování výskytu ADHD v populaci (8-12%) oproti hyperkinetické poruše diagnostikované pomocí diagnostických kriterií MKN-10. Kriteria MKN-10 jsou přísnější a četnost výskytu poruchy v populaci je nižší (3-5%). Základním diagnostickým nástrojem v této studii byla MKN-10. Do studie mohli být zařazeni chlapci s diagnostickou kategorií F90.0 – „Porucha aktivity a pozornosti“ a F90.1 – „Hyperkinetická porucha chování“. Pokud existovala typická komorbidní porucha (tj. tiková porucha, neorganická enuréza či specifická porucha učení), nepředstavovala vylučující kritérium, ale byla zaznamenána. Závažné psychiatrické poruchy představovaly vylučující kritérium (Theiner, 2006).

ADHD: attention-deficit hyperactivity disorder, porucha pozornosti s hyperaktivitou. Koncept amerického Diagnostic and statistic manual, 4. revize (DSM-IV). Některé ze symptomů musejí být přítomny před 7. rokem věku a vykytují se ve dvou a více různých prostředích. Příznaky jsou v okruzích „porucha pozornosti“ (min. 6 symptomů trvajících déle než 6 měsíců) a „hyperaktivita-impulzivita“ (min. 6 příznaků trvajících déle než 6 měsíců, nepřiměřené vývojovému stupni). Rozeznávají se 3 subtypy poruchy – nepozorný, hyperaktivně impulzivní a kombinovaný. Ve výzkumu hlavní používaný koncept této poruchy i mimo USA.

Hyperkinetická porucha: diagnostická kategorie dle Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. decennální revize (MKN-10). V klasifikaci se nachází pod kódem F90. Porucha vzniká před 7. rokem věku a trvá minimálně 6 měsíců před stanovením diagnózy. Vyžaduje přítomnost příznaků ve všech 3 příznakových okruzích: „porucha pozornosti“ (6 příznaků z 9), „hyperaktivita“ (3/5) a „impulzivita“ (1/4). Jako zvláštní jednotku vyčleňuje hyperkinetickou poruchu chování.

Gen: Základní fyzikální a funkční jednotka dědičnosti, která nese genetickou informaci z jedné generace do další. Je to segment DNA složený z transkribovatelné oblasti a regulační sekvence, která umožňuje transkripci. Kóduje primární strukturu buď funkční molekuly translačního produktu (polypeptid, protein) nebo funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA).

Kandidátní gen: gen, u kterého se předpokládá, že se podílí na etiopatogenézi zkoumané poruchy.

Lokus: Místo na chromozomech nebo DNA, kde je umístěn určitý konkrétní gen. Jednotlivé alely genů se nachází na shodných lokusech v homologních chromozomech

Alela: Jedna z různých forem genu nebo sekvence DNA, která může existovat na jednom lokusu lišící se v DNA sekvenci a ovlivňující funkčnost jednoho produktu (RNA nebo proteinu). Různé alely téhož genu podmiňují rozdílný projev téhož znaku. Alely se nacházejí v lokusech homologních chromozomů a tvoří alelický pár.

Genotyp: Genetická konstituce jedince nebo více specifičtěji, konkrétní sestava alel na konkrétním lokusu či více lokusech.

Fenotyp: Soubor charakteristických a fyziologických znaků a vlastností organizmu. Fenotyp je vnější projev celé genetické informace organizmu (genotyp), na jehož vytváření se ve větší či menší míře podílí vliv vnějšího prostředí.

Genový polymorfizmus: vykazuje-li sekvence DNA příslušného genu variabilitu v populaci, hovoří se o genovém polymorfizmu. Každá z konkrétních variant genu se nazývá alela. Je-li na obou příslušných chromozomech stejná alela daného genu, hovoříme o homozygotním genotypu. Jsou-li obě alely rozdílné, hovoříme o heterozygotním genotypu (Theiner, 2006).

2.2. Historie, současnost, budoucnost

Lze předpokládat, že hyperaktivní lidé existovali i v pravěku. V této době však mohla být nadměrná aktivita spíše kladem, mohla pomáhat člověku v nových objevech a k lepšímu získání potravy. Impulzivita mohla lovcům přinášet i značné výhody. Proto se zřejmě hyperaktivní geny přenesly do současnosti. Velký zlom zřejmě nastal v období zemědělské revoluce, kdy člověk již začal své činy plánovat a získání plodin si žádalo trpělivost (Hartmann, 1989).

První popis hyperkinetické poruchy byl uveden v práci z roku 1902, ve které bylo popsáno 43 dětí s agresí, neposlušností, emocionalitou, zhoršenou pozorností a poruchami chování. Autor této práce ze začátku minulého století, George Still, se domníval, že u dětí jde o „poruchu morální kontroly“, což znamená, že děti mají omezenou schopnost regulovat své chování na základě znalostí, co je správné a zároveň mají poruchu chápání, motivace a inhibice (Mercugliano, 1999). Od třicátých do padesátých let 20. století byly symptomy hyperkinetické poruchy spojovány s poškozením mozku - infekcemi, toxiny a traumaty hlavy. Během této doby bylo zjištěno, že symptomy hyperkinetické poruchy se podobají symptomům zvířat a lidí s poškozenými frontálními laloky mozku. V této době spadala hyperkinetická porucha pod diagnózu „minimal brain damage“ nebo lehké dětské encefalopatie (LDE), která se dávala i dětem s lehkými poruchami vývoje motorické koordinace a s poruchami učení (dyslexií, dysgrafií, dyskalkulií), jež bývají časté u dětí s hyperkinetickou poruchou. Z roku 1937 pochází první studie zaměřená na léčbu poruchy za pomocí psychostimulačních léků. Porucha se začíná běžně léčit na počátku šedesátých let (Doyle et al., 2004). V padesátých letech minulého století vědci začínají rozumět vztahům mezi funkcemi kortexu, thalamu, bazálních ganglií a regulací motoriky. V padesátých a šedesátých letech byla diagnóza „minimal brain damage“ změněna na „minimal brain dysfunction“ (MBD). Nové zobrazovací techniky mozku odhalují různé jemné strukturální a funkční odchylky v mozcích pacientů s různými psychickými poruchami. V roce 1957 Laufer a Denhoff zavedli termín hyperkinetické impulzivní poruchy (hyperkinetic impulse disorder), jejíž kriteria se opírala pouze o klinické příznaky hyperaktivity a impulzivity. Od sedmdesátých let byla v rámci americké psychiatrie hyperkinetická porucha spojována především s deficitem pozornosti a odtud vyplynul název diagnózy „attention deficit disorder“. V osmdesátých až devadesátých letech pak byla centrální úloha pozornosti u hyperkinetické poruchy přehodnocena a mnoho vědců věří, že hlavní příčinou hyperkinetické poruchy není deficit pozornosti, ale deficit ve zpracování informací (mezi příchozími informacemi a odpovědí na ně). V současnosti platí pro diagnostiku ADHD americký diagnostický manuál DSM-IV, který byl vytvořen roku 1994 (Drtílková et al., 2007).

Ke konci 20. století se velmi rychle rozvíjí obor molekulární psychiatrie, který se snaží zjistit genetickou podstatu ADHD. Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla v psychiatrickém výzkumu poprve použita v roce 1990. Zprvu jsou zkoumané skupiny osob velmi malé a výsledky studií jsou velmi nepřesné, v některých studiích jsou nalézány falešně pozitivní výsledky. Časem jsou však falešně pozitivní výsledky vyvráceny v rozsáhlejších studiích provedených na větších souborech homogenních osob. Genetické příčiny hyperkinetické poruchy byly dodnes zkoumány ve více než dvoustech molekulárně-genetických studiích, v nichž bylo sledováno více než 100 polymorfizmů a více než 50 kandidátních genů. V současné době počet zkoumaných polymorfizmů i genů extrémně rychle roste, a to v souvislosti s rychlostí růstu moderních technologií využívaných v rámci výzkumu. Rychle roste i počet provedených farmakogenetických studií zkoumajících závislost psychofarmak na genotypu osob s hyperkinetickou poruchou. Samostatně pak stojí farmakologické studie. V oblasti farmakoterapie bylo již publikováno přes 200 kontrolovaných studií (psychostimulancia, atomoxetin) s vysoce pozitivními výsledky (70-90% účinnost). Zdálo by se, že ve světle těchto poznatků o biologickém zakotvení nebude pochyb o účelnosti a užitečnosti molekulární psychiatrie a farmakogenetiky. Nicméně někteří zástupci nelékařských profesí (psychologové a speciální pedagogové) nové poznatky nepřijímají a dále setrvávají na starém, výlučně psychologickém konceptu hyperaktivity jako výsledku špatné rodinné situace, špatné výchovy či nevhodného pedagogického vedení. Následné výlučně psychologické terapeutické přístupy jako rodinná terapie nebo izolovaná psychoterapie dítěte málokdy dokáží problémy zvládnout a výsledkem je opoždění účinného terapeutického procesu o měsíce, až roky nebo dokonce jeho nezahájení. Na počátku 21. století jsou provedeny první meta-analýzy, které poskytují první ucelenější výsledky podložené více rozsáhlými a nezávislými výzkumy. Začíná se hovořit o polymorfizmech genů, které mají vztah k ADHD a jsou částečně zodpovědné za změny chování. V budoucnu lze předpokládat nálezy dalších polymorfizmů, které budou mít ještě výraznější vliv na rozvoj poruchy než doposud. Kombinací příčinných polymorfizmů budou stanoveny haplotypy na základě nichž bude možné rozvinout například účinný typ léčby nebo budou příčinné haplotypy přímo rozhodovat o stanovení diagnózy ještě před projevem poruchy. V budoucnu by pak mohlo být součástí predispozičního testování nebo novorozeneckého screeningu, kdy by každému novorozenci byla zjištěna míra hyperaktivního chování jako tomu bylo ve sci-fi filmu Gataca.

2.3. Základní informace a výskyt hyperkinetické poruchy

Hyperkinetická porucha je poruchou v jejímž pozadí leží biologická příčina, nejde tedy pouze o výsledek špatné rodičovské péče. Exogenní symptomy nemoci jsou však celkovým výsledkem mnoha interakcí, proto nelze rozhodně zanedbat výchovu a životní zkušenosti každého jedince. Vlivy okolí mohou vést k různým podobám onemocnění. Hyperkinetický syndrom se vyskytuje asi u 3-5% dětí mladšího školního věku. Výskyt je mnohem častější u chlapců než u dívek (dle diagnostických kritérií 3-10 : 1). ADHD se projevuje zejména v období, kdy dítě začíná s kognitivními procesy a socializačním procesem - po započetí školní docházky. Poprvé v životě totiž po dětech někdo chce, aby zůstaly sedět tiše, a aby se zapojily do určitých činností, které mají vést k nějakému cíli. Hyperaktivní děti se ve vyučování velmi rády baví, vykřikují a neustále vyrušují, o přestávkách se rády perou, běhají po chodbách nebo tropí jinou neplechu (Munden et Arcelus, 2002). Je známo, že mezi neklidnými dětmi je mnoho fyziologicky předčasně narozených a takových dětí, které byly v prvním roce života odloučeny od matky kvůli pobytu v nemocnici. Jiné záznamy udávají, že děti postižené hyperaktivitou byly neobyčejně aktivní již v děloze, po narození byly tyto děti více plačtivé, zlobivé a měly časté problémy s pravidelným spánkem (Prekopová et Schweizerová, 1994). Někdy jsou uváděny problémy při kojení. Porucha může v prepubertálním období vymizet, ve 40-80 % se příznaky vyskytují i v adolescenci (Zametkin, 1999). V adolescenci se porucha může projevovat disociálním chováním až delikvencí, špatným zařazením se do pracovního procesu, neschopností navázat trvalý vztah a založit rodinu.

ADHD je poruchou spojenou zejména se soustředěním, nadměrnou impulzivitou a hyperaktivitou. Někdy je vyčleňován a užíván pojem ADD (Attention Deficit Disorder), často užíván jako synonymum ADHD, který nám charakterizuje rovněž nepřiměřenou nesoustředěnost a nepozornost. Dítě mající symptomy ADD nemusí být vůbec hyperaktivní. Jedná se zejména o tiché dívky, které mají citelné omezení ve své schopnosti soustředit se. Mezi oběma pojmy neexistuje ostrá hranice a oba pojmy jsou shrnovány termínem hyperkinetická porucha.

Základními projevy nemoci jsou problémy s udržením pozornosti ve vyšší míře než je běžné u dětí stejného věku. Tento deficit se u malých dětí projevuje například tím, že dítě si vydrží hrát s hračkou pouze krátký čas, po krátké chvíli vyhledává jinou aktivitu a začíná zlobit. Ve školním věku je soustředění na soustavný pracovní výkon snížený, zvýšená těkavost a vzrušivost vede k nedostatečnému chápání učiva. Takového žáka dokáže rozrušit jakákoli i sebemenší drobnost ve třídě nebo za oknem. Tato drobnost pak irelevantně zhorší či sníží výkon dítěte ve srovnání s ostatními spolužáky. Pozornost dítěte je odvedena k jiným, pro dítě zajímavějším podmětům, žák pak v samostatné práci nebo úkolu dělá mnoho chyb, ve slovech chybí písmena, ve větách celá

slova. Započatá práce a jednání nejsou nikdy dovedeny do konce.

ADHD děti jsou impulzivní, nedokáží ovládnout svou reakci na podnět, jednají bez rozmyslu a neuvědomění si následku, který svým chováním mohou způsobit. Často pak bývají výsledkem omyly vznikající z ukvapenosti, které vedou k negativnímu náhledu společnosti na postiženého jedince. Hyperaktivní děti mohou rovněž selhávat při uvažování o potenciálně negativních, destruktivních, či dokonce život ohrožujících následcích při provádění některých činností. Zřejmě proto se často zapojují do nebezpečných aktivit, které nebývají vůbec nutné. Tito mladí lidé se mohou chovat hazardně před kamarády, aby dokázali, že se ničeho nebojí, a aby si získali jejich přízeň. Při těchto pro společnost nebezpečných situacích může snadno dojít k úrazu jedince. K jiným projevům impulzivity lze přiřadit unáhlené odpovědi v rozhovoru nebo neklid při čekání než dojde k očekávané situaci. Dítě například během sportovní aktivity nevydrží čekat ve skupině za postranní čarou než se zapojí do určité činnosti (Munden et Arcelus, 2002).

Nadměrná aktivita je třetím a hlavním rysem ADHD. Jedná se o nepřiměřenou úroveň motorické a hlasové aktivity. V dětství jsou tyto děti extrémě pohyblivé, neklidné, mnohdy až hádavé, ničí své oblíbené hračky nebo rodičům někam utíkají. Postižené děti mají též nadprůměrný řečový projev, skáčí mluvícímu do řeči nebo rády vykřikují. S hyperaktivitou souvisí též kratší doba spánku jedince, která mívá za důsledek větší vyčerpanost rodičů nebo vychovatele. Všechny tyto základní projevy onemocnění mohou sumárně vést k problémům v oblasti navázování přátelství a k celkové neoblíbenosti ve společnosti. Neúspěch ve společnosti může v budoucnu směřovat k mnohodimenzionálním psychickým problémům, které se mohou v krajních případech projevit až recidivitou.

2.4. Klasifikace a diagnostika

Značná rozdílnost emočních i behaviorálních projevů nemoci u každého jedince vedla Světovou zdravotnickou organizaci k vytvoření jednotného klasifikační systému MKN-10. Pomocí tohoto systému lze tuto značně proměnlivou poruchu dobře diagnostikovat. V současné době existují dva rovnocenné klasifikační systémy - MKN-10 a DSM-IV. Diagnostika DSM-IV, vydaného Americkou asociací psychiatrů (American Psychiatric Association 1994), se prosazuje zejména v mezinárodních vědeckých kruzích a výzkumných projektech. Kritéria DSM-IV jsou o něco mírnější než MKN-10, proto je podle těchto kritérií výskyt ADHD v populaci vyšší. Diagnostiky jsou si jinak velmi podobné, pro přehlednost i porovnání uvádím obě diagnostiky: DSM-IV i MKN-10.

Kritéria podle DSM-IV pro diagnózu ADHD

Buď 1. nebo 2. (nebo 1. i 2.)

1. Šest nebo více příznaků nepozornosti přetrvává po dobu nejméně šesti měsíců v takové míře, že má za následek maladaptaci dítěte a neodpovídá vývojovému stádiu dítěte.

Nepozornost

a. často se mu nedaří pozorně se soustředit na podrobnosti nebo dělá chyby z nepozornosti ve škole, při práci nebo při jiných aktivitách

b. často má potíže udržet pozornost při plnění úkolů nebo při hraní

c. často neposlouchá, když se na ně přímo mluví

d. často nepostupuje podle pokynů a nedaří se mu dokončit školní nebo domácí práci

e. často mívá problémy zorganizovat si úkoly a činnost

f. často se vyhýbá vykonávání úkolů, nedělá je rádo, zdráhá se dělat domácí práce, které vyžadují soustředěné duševní úsilí

g. často ztrácí věci potřebné pro vykonávání úkolů, zejména školní pomůcky

h. často se dá vyrušit vnějšími podněty

i. často zapomíná na každodenní povinnosti

2. Šest nebo více příznaků hyperaktivity nebo impulzivity přetrvává po dobu nejméně šesti měsíců v takové míře, že má za následek maladaptaci dítěte a neodpovídá vývojovému stádiu dítěte.

Hyperaktivita

a. často bezděčně pohybuje rukama nebo nohama nebo se vrtí na židli

b. často ve vyučování nebo při aktivitách, kdy by mělo sedět vstává ze židle

c. často pobíhá nebo chodí v situacích, kdy je to nevhodné

d. často mu dělá potíže si potichu hrát

e. bývá často „na pochodu“ nebo se chová, jako by „jelo na motor“

f. často bývá nepřiměřeně upovídané

Impulzivita

g. často předčasně odpovídá

h. často má problém vyčkat než na ně vyjde řada

i. často přerušuje ostatní nebo se jim plete do hovoru.

(Americká psychiatrická asociace: The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV. Washington, 1994)

Podle převahy symptomů se vyčleňují subtypy onemocnění ADHD: kombinovaný typ, typ s převahou deficitu pozornosti a typ s převahou hyperaktivity/impulzivity.

Kritéria podle MKN-10 pro diagnózu hyperkinetické poruchy

Pro výzkumnou diagnózu hyperkinetické poruchy je nutné, aby byla jednoznačně přítomna výrazná nepozornost, hyperaktivita a neklid. Tyto rysy chování jsou pervazivní ve všech situacích, jsou trvalé a nejsou způsobeny jinými poruchami, jako je např. autismus nebo afektivní poruchy.

Pro hyperkinetickou poruchu musí být splněna všeobecná kriteria jak pro (F90), tak i pro poruchy chování (F91), které v této práci neuvádím.

F90 Hyperkinetická porucha

G1. Nepozornost

Šest z následujících příznaků musí přetrvávat nejméně 6 měsíců a jsou takového stupně, který je maladaptivní a v rozporu s úrovní dítěte:

(1) dítě není schopno věnovat plnou pozornost detailům nebo dělá chyby z nepozornosti ve školních úlohách, při práci nebo jiných aktivitách,

(2) často není schopno udržet pozornost při úkolech nebo hře,

(3) často se zdá, že neposlouchá, co se mu říká,

(4) často není schopno sledovat instrukce nebo dokončit školní úlohu, běžné pracovní povinnosti nebo úkoly na pracovišti (nikoliv pro opoziční chování nebo neschopnost pochopit instrukce),

(5) často má potíže s organizováním úkolů a aktivit,

(6) často se vyhýbá úkolům, které vyžadují trvalé duševní úsilí, nebo je má velice nerado,

(7) často ztrácí věci, které potřebuje pro určité úkoly nebo aktivity, jako jsou např. školní potřeby, tužky, knihy, hračky nebo nářadí,

(8) dá se snadno rozptýlit vnějšími podněty,

(9) je často během denních aktivit zapomnětlivé.

G2. Hyperaktivita

Alespoň 3 z následujících příznaků musí přetrvávat nejméně šest měsíců, a jsou takového stupně, který je maladaptivní a v rozporu s úrovní vývoje dítěte:

(1) dítě často neklidně pohybuje rukama nebo nohama, nebo se vrtí na židli,

(2) vstává ze židle ve třídě nebo v jiných situacích, kde se očekává, že bude sedět,

(3) často nadměrně pobíhá nebo si stoupá v situacích, kdy je to nevhodné (u adolescentů nebo dospělých mohou být přítomny pouze pocity neklidu),

(4) často je nadměrně hlučné nebo má potíže zabývat se ve volném čase tichou hrou,

(5) trvale projevuje příliš vysokou motorickou aktivitu, která se podstatně nepřizpůsobuje sociálnímu kontextu nebo společenským požadavkům.

G3. Impulzivita

Alespoň jeden z níže uvedených příznaků impulzivity přetrvává nejméně po dobu 6 měsíců, a to do takové míry, která je v rozporu s vývojovou úrovní dítěte:

(1) dítě často vyhrkne odpovědi na otázky, které ještě nebyly dokončeny,

(2) často není schopno čekat ve frontě, až na něho přijde řada ve hře nebo ve skupinových hrách,

(3) často přerušuje nebo se vnucuje jiným lidem (např. skáče do řeči)

(4) často příliš mluví bez ohledu na sociální zábrany

G4. Porucha se objevuje před 7. rokem věku, ne později.

G5. Pervazivita. Kriteria musí být splněna ve více než jedné situaci, např. kombinace nepozornosti a hyperaktivity by měla být přítomna jak doma tak i ve škole, nebo jak ve škole, tak i jinde, kde je dítě sledováno, např. na klinice.

G6. Příznaky v G1-G3 vyvolávají klinicky významnou tíseň nebo zhoršení ve společenském, školním nebo pracovním fungování.

G7. Porucha nesplňuje kritéria pro pervazivní vývojové poruchy (F84.-),
manickou epizodu (F30.-), depresivní epizodu (F32.-), nebo úzkostné poruchy (F41.-).
(Mezinárodní klasifikace nemocí, MKN-10)

2.5. Etiologie hyperkinetické poruchy

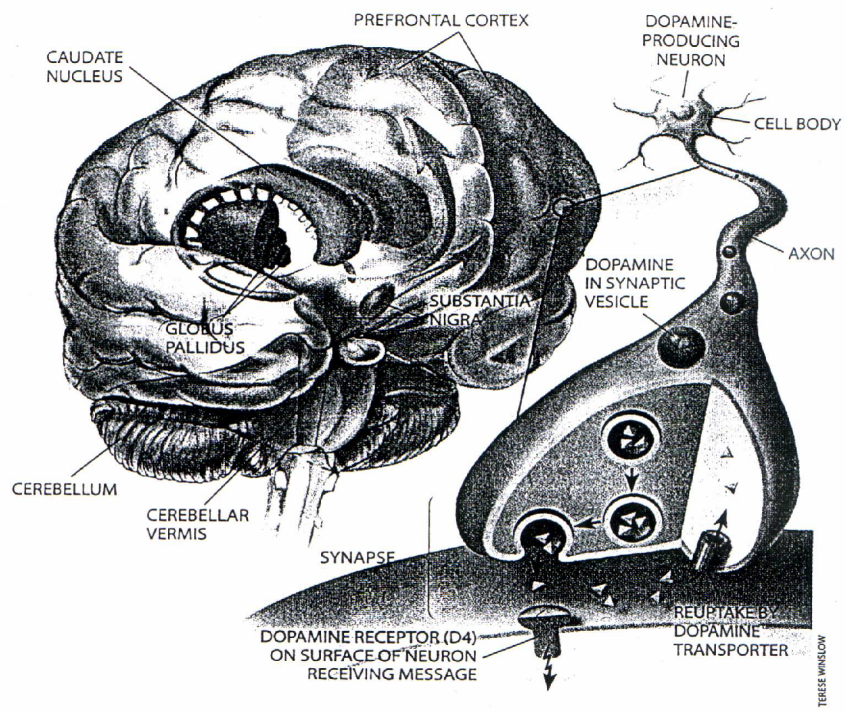
Čím jsou naše znalosti o fungování lidského mozku podrobnější, paradoxně se zdají být příčiny mnoha psychických poruch složitější než v minulosti. Jsou opouštěny starší, simplifikované teorie a postupně jsou nahrazovány novými hypotézami, které se opírají o poznatky z oblasti moderní neurofyziologie, neurochemie, molekulární biologie a genetiky, ve snaze pochopit etiopatogenetické souvislosti v celé jejich komplexitě. Vstup nových zobrazovacích technik lidského mozku (PET, SPECT, NMR) do psychiatrie, umožnil „vidět“ a detekovat změny některých mozkových funkcí, které provázejí lidské emoce a myšlení. Tyto téměř fantastické a přitom velmi komplikované poznatky, na jedné straně poskytly specialistům významný materiál pro další vědecké bádání v oboru biologické psychiatrie, na druhé straně však znesnadnily poruzumění funkcím mozku a poruchám psychiky všem, kteří nejsou přímo odborníky v dané oblasti. Tento posun znalostí se dotkl i hyperkinetické poruchy, která přestala být důvěrně známou LMD, vzniklou nejčastěji v důsledku perinatálních komplikací, ale stala se obtížně srozumitelnou poruchou, provázenou dysfunkcemi neurotransmiterů, receptorů a dysfunkčními variantami různých genů. Podle současných názorů je příčina hyperkinetické poruchy pravděpodobně heterogenní, v etiologii se mohou uplatňovat genetické i negenetické faktory spojené s neuroanatomickými a neurochemickými inzulty, které zasahují převážně prenatálně (Drtílková et al., 2007).

2.6. Neurobiologie hyperkinetické poruchy

Příznaky ADHD jsou dnes dávány do souvislosti se snížením dopaminergní transmise ve frontální a limbické oblasti s kompenzatorním zvýšením dopaminergní aktivity v bazálních gangliích telencefala. Uvolněný dopamin (DA) se váže na své postsynaptické receptory D1-D5. Pomocí dopaminového transportéru (DAT) je dopamin navrácen zpět do presynaptického neuronu. DAT a presynaptické receptory označované jako autoreceptory hrají hlavní roli v extracelulární regulaci DA (obrázek 1.). Podle současných názorů ADHD reprezentuje hypofunkční syndrom katecholaminových projekcí do prefrontální kortikální oblasti. Příčinou může být blokace kalciového kanálu. Redukce kalciového influxu do presynaptického neuronu poté vede ke sníženému uvolňování transmiteru. Ionty kalcia tedy nepochybně mohou ovlivňovat neuronální systémy. Snížení dopaminergní a noradrenegní transmise zpětně potvrzuje efekt stimulancií, která působí jako dopaminergní a noradrenergní agonisté. Proto se předpokládá, že léky podávané

nemocným by měly zvyšovat uvolňované množství dopaminu a zvyšovat adrenergní inhibici v locus coeruleus (LC).

Obrázek 1. Dopaminová synapse (Barkley, 1998)



Struktura LC je malé jádro zahrnující těla neuronů - buněk nalézajících se ve střední linii pontine tegmentum. Z těchto, noradrenalin (NA) vylučujících neuronů vede hlavní cesta přes mnoho oblastí mozku, zvláště pak přes hustě inervovanou kůru mozkovou. Podstatná část výzkumů dokumentuje zásadní roli LC na pozornost k novým stimulům přicházejících z vnějšího prostředí. LC neurony jsou aktivovány, pokud se organizmus soustředí nebo je v pozornosti, koncový noradrenalin se uvolňuje a vede ke zvýšení signálu pro odezvu, zároveň dochází ke zlepšení přijatého stimulu na postsynaptických korových neuronech. Schopnost zapojení pozornosti si žádá rovněž správnou funkci temporální, spodní parietální kůry a striáta. Rozkódování, které zahrnuje manipulaci s detekovanou informací, vyžaduje zapojení hipokampu a amygdaly. Rostrální středomozkové struktury včetně pontine reticular aktivují formaci a thalamická jádra, která jsou důležitá pro udržení pozornosti. Přechod od jednoho stimulu k druhému si žádá prefrontální kůru včetně cingula. Špatná pozornost tedy může být výsledkem špatné funkce středomozkových struktur (Mercugliano, 1999). V přímé souvislosti s těmito neurotransmitery jsou dnes vedeny četné studie zabývající se nižší hladinou kyseliny homovanilové (HVA) v mozkomíšním moku a

plazmě, která je metabolitem dopaminu a vyšší hladinou dopaminbetahydroxylázy (DBH), enzymu, který přeměňuje dopamin na noradrenalin (Paclt et al., 1998). Snížená noradrenergní aktivita koreluje s nálezy nižší hladiny 3-methoxyfenylglykolu (MHPG), metabolitu noradrenalinu v likvoru. Nepovšimnuty nezůstávají ani množství monoaminooxidázy (MAO) a katechol-O-methyltransferázy (COMT), které jsou nalézány v mozkomíšním moku a mají přímou souvislost se snížením hladiny NA. Porucha je zřejmě způsobena dysregulací a pozměněnou hladinou dopaminu, noradrenalinu a serotoninu v prefrontálně - striáto - thalamo - kortikálních oblastech mozku. Prefrontální kortex má četná spojení s limbickým systémem, diencefalem, mezencefalem a je jedinou přímou projekcí z locus coeruleus do jader raphae, také má dopaminergní a noradrenergní projekci přes fasciculus longitudinalis medialis a spoje do substantia nigra, která je centrem subkortikálního dopaminergního systému. Deficit dopaminergních cest v mesolimbickém systému a ve frontálních lalocích způsobují hypersenzitivitu dopaminergních neuronů striáta a poruchu striatálních inhibičních mechanizmů. Experimentální léze striáta i prefrontální léze způsobují hyperaktivitu, deficit pozornosti a narušení výkonu kognitivních funkcí (Drtílková, 1997). Tuto skutečnost dokládá i mapování elektrické aktivity prefrontální kůry u chlapců s ADHD. Ti v této oblasti zpracovávají informace pomaleji než zdraví jedinci (Koukolík, 2002).

Dysregulace centrální noradrenalinové sítě vychází z četných farmakologických dat. Solanto (1998) ve svém výzkumu potvrdil vliv stimulačních psychofarmak s noradrenalinovými účinky na pozornost, bdělost a pracovní paměť. Bdělost a pozornost tedy závisí na regulaci katecholaminových neurotransmiterů v mozkové neuronové síti. Zametkin navrhl hypotézu, kdy ADHD je asociována s deficitem při inhibici frontostriatálních spojení, která jsou převážně řízena dopaminergními neurony (Biederman et Spencer, 1999). Lze tedy říci, že poruchy pozornosti jsou s největší pravděpodobností vyvolány nerovnováhou základních neurotransmiterů. Nejlépe je prozkoumána neuronová sekrece DA, která ve specifických částech mozku inhibuje nebo moduluje aktivitu dalších neuronů, které jsou zodpovědny za emoční a jiné behaviorální projevy jedince.

Jiné studie založené zejména na neurozobrazovacích studiích MRI a PET vycházejí z nespecifických abnormalit - odlišné morfologie prefrontálního kortexu, bazálních ganglií, nucleus caudatus (NC) a kalózního tělesa označovaného jako corpus callosum. V pěti ze šesti studií se u dětí s ADHD vyskytlo menší kalózní těleso. Zvláště se to týkalo rostrální části anteriorní oblasti corpus callosum (Baumgartner et al., 1996). Corpus callosum je ohromný svazek axonů spojující anatomicky i funkčně pravou a levou hemisféru, umožňuje tak integraci informací zpracovaných v obou hemisférách. V jiných studiích jsou rovněž uváděny změny v objemu pravého globus pallidus a změny symetrie nucleus caudatus (Castellanos, 1998). U ADHD dětí bylo zjištěno

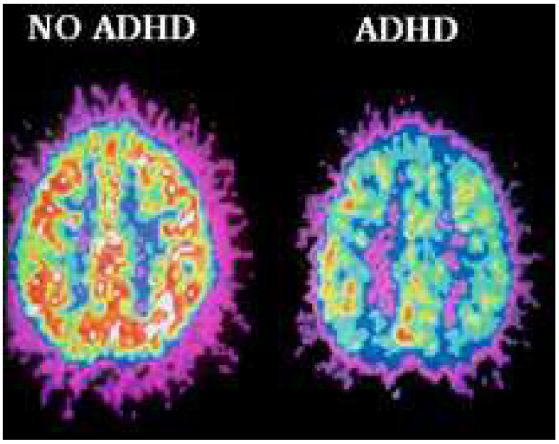
zmenšení NC a globus pallidus přibližně o 10 % ve srovnání s kontrolní skupinou - je nepochybné, že se v patogenezi uplatňují poruchy nervových přenašečů. NC neboli ocasovité jádro mozku je tvořeno shlukem nervových svazků, za normálních okolností je pravé jádro větší než levé a je spolu s putamen součástí striáta. Zajímavé je, že u putamenu nebyly zaznamenány žádné rozdíly ve srovnávacích studiích mezi nemocnými a zdravými chlapci (Aylwyrd et al., 1996). Bazální ganglia jsou tedy tvořena NC a nucleus lentiformis, které má samo části putamen a globus pallidus neboli pallium.

Z neurobiologických příčin bývá nejčastěji popisováno poškození orbitofrontální a ortolimbické oblasti, tj. oblastí s největším výskytem dopaminu. DA byl zpozorován v padesátých letech na neuronech při léčení tkáňových oblastí související s odstraňováním formaldehydu a glyoxolových kyselin. Lokalizace DA neuronů zobrazuje obrázek 5. Jsou zde zachyceny hlavní projekce týkající se vedení signálu neurony nalézajících se v mezencefalu. První se skládá z vnějších buňek substantia nigra, která vybíhá do striáta. Druhá projekce zahrnuje vedení signálu v neuronech nalézajících se ve ventrálních tegmentárních oblastech mezencefala. Tyto buňky vybíhají do četných oblastí prozencefala, včetně amygdaly, septální oblasti, nuclea accumbens a přední kůry mozkové. Od části této oblasti - limbického systému je tato část nazývána oblastí mezolimbické projekce. Limbický systém je příčinou našich emocí a agresivity, přední mozek se účastní vyšších kognitivních funkcí, mezolimbické cesty hrají hlavní roli v koordinaci těchto funkcí, mají zásadní vliv na naše chování. NA se nalézá ve skupince buněk v mezencefalu. Shluk těchto zvláštních buněk se názývá locus coerulens. Je složen pouze z několika stovek neuronů, které však vysílají své axony téměř do všech oblastí mozku. Vše je způsobeno tím, že každý axon se neustále opakovaně větví. NA je sekretován na koncových synapsích, tím dochází k modulaci. NA buňky ovlivňují CNS aktivitu a podílí se na rozdílném chování každého jedince (Gordon, 1983).

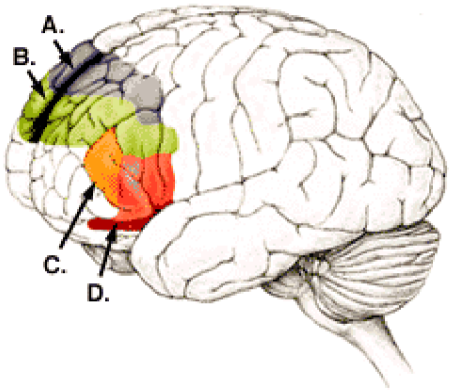
V oblasti neurozobrazovacích studiích zkoumající ADHD publikovali Zametkin et al. (1990 a 1993) dvě studie zaměřené na mozkový metabolizmus. V první studii zjistil menší metabolizmus u ADHD dospělých osob v kortexu a podkorových oblastech pravého thalamu, pravého caudata, pravého hipokampu a cingulata (Zametkin et al., 1990). Ve druhé studii, provedené na dospívajících, zaznamenal menší aktivitu rovněž v kortexu a pravém hipokampu, ale menší aktivitu v levém thalamu (Zametkin et al., 1993). Podobnou studii provedli Ernst et al. roku 1994, zjistili nižší mozkový metabolizmus pouze u ADHD dívek (Ernst et al., 1994). Ve studiích byl také zjištěn výrazný vzestup metabolické aktivity po podání stimulancií MPH a dextroamfetaminu. V nejnovějších studiích je místo FDG využívána látka [^{18}F]fluorodopa ([^{18}F]DOPA). Předchozí studie s FDG nebyly schopny souhlasně detekovat rozdíly v NC nebo ve strukturách závislých na DA přísunu. Použitím látky [^{18}F]DOPA, která je analogní s DOPA, je možno lépe studovat DA

cesty. [^{18}F]DOPA je transportována do presynaptických neuronů, kde je přeměněna na [^{18}F]fluorodopamin za pomocí enzymu dopadekarboxylázy a poté je ukládána v katecholaminových vezikulech. V roce 1999 byla publikována studie, v níž byl zjištěn o 48% vyšší výskyt [^{18}F]DOPA v pravém mezencephalu 10 ADHD dětí než u 10 normálních dětí. Vyšší výskyt [^{18}F]DOPA indikuje zvýšenou hladinu aktivity dopa dekarboxylázy. Zvýšení hladiny dopadekarboxylázy může vycházet z vyšší enzymové aktivity nebo ze zvýšené denzity těl neuronů a jejich zakončení. Vyšší hladina dopadekarboxylázy vede k nižší extracelulární rovnováze DA a k blokádě DA receptorů (Ernst et al., 1999).

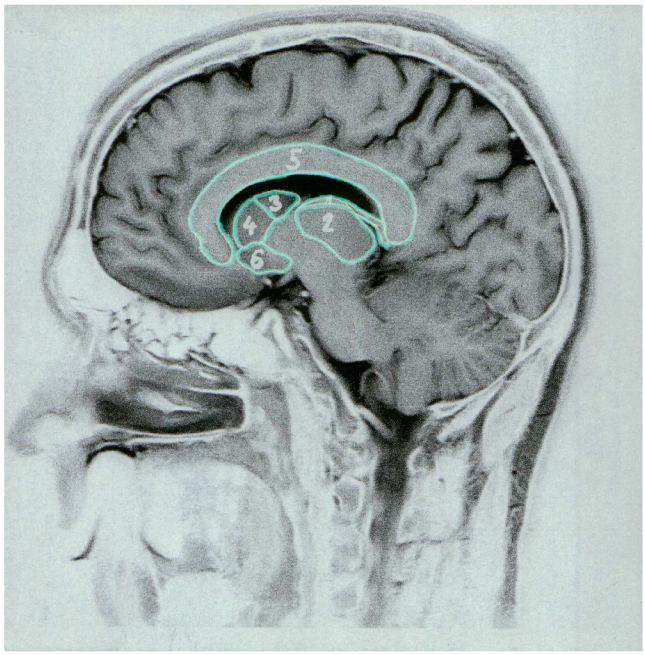
Obrázek 2. Části mozku zkoumané v souvislosti s ADHD - Odlišné zobrazení mozku osoby s ADHD oproti osobě kontrolní (Zametkin et al., 1993)



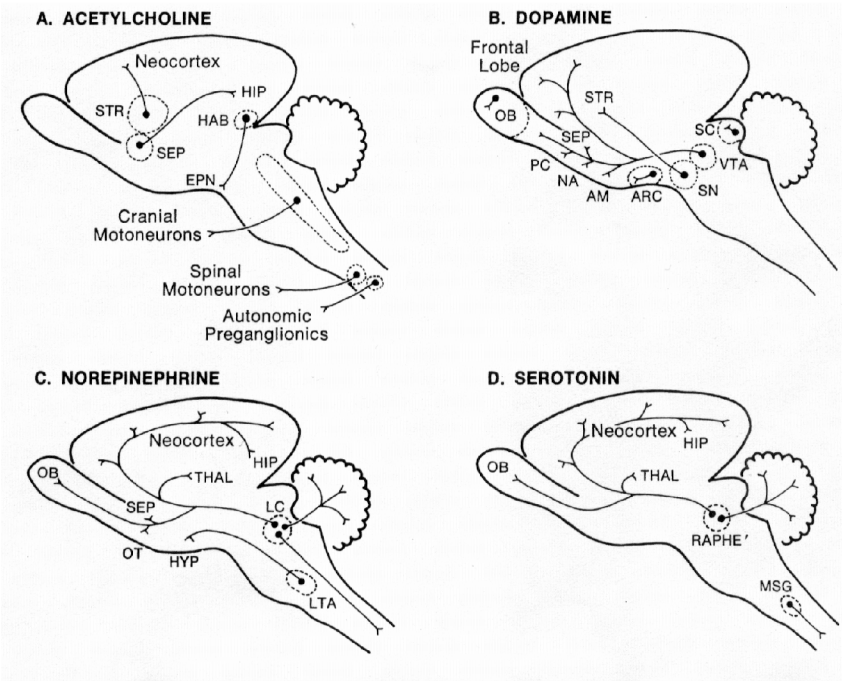
Obrázek 3. Části mozku související s ADHD - Oblasti prefrontálního kortexu



Obrázek 4. Části mozku související s ADHD: 1 - fornix, 2 - thalamus, 3 – caudate nucleaus (tělo), 4 – caudate nucleus (hlava), 5 - corpus callosum, 6 - nucleus accumbens

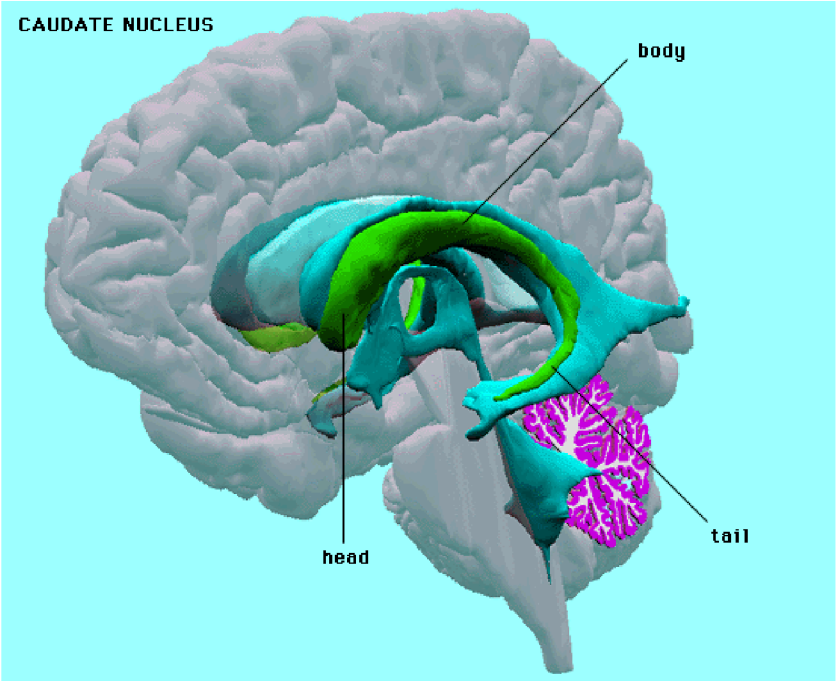


Obrázek 5. Neurotransmitery v savčí neuronové síti (Gordon, 1983)

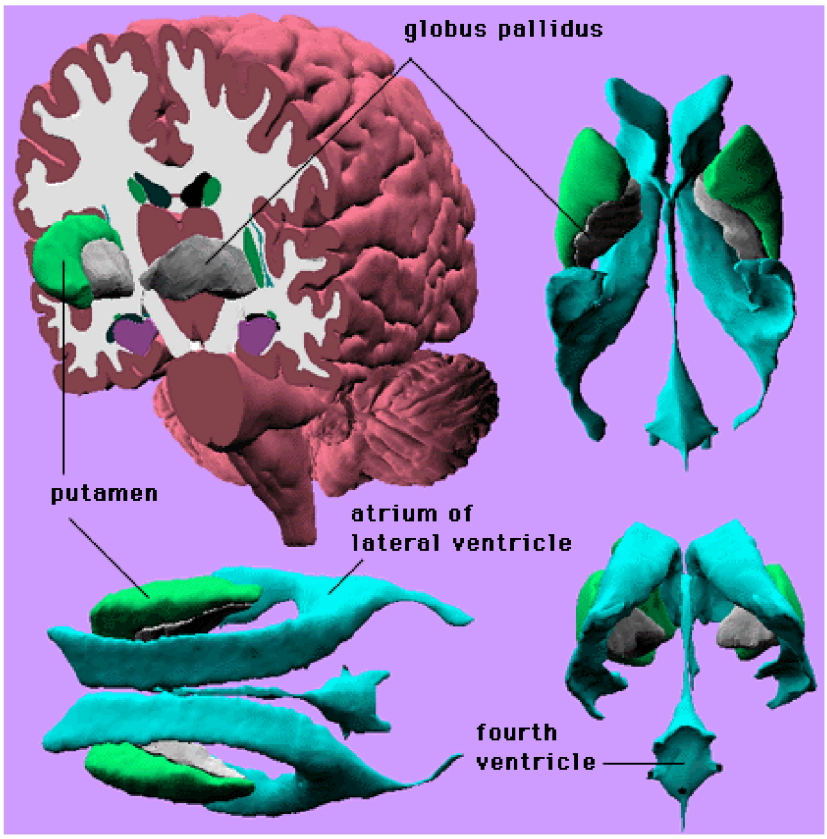


AM – amygdala, ARC – arcuate nucleus, DCN – deep cerebral nuclei, DH – dorsal horn, DRG – dorsal root ganglion, EPN – endopeduncular nucleus, GP – globus pallidus, HAB –habenula, HIP – hipokampus, HYP – hypothalamus, LC – locus coeruleus, LTA – lateral tegmental area

Obrázek 6. Části mozku související s ADHD – Caudate nucleus



Obrázek 7. Části mozku zkoumané v souvislosti s ADHD - Globus pallidus



Jak již bylo popsáno, za poruchou ADHD stojí zřejmě neurotransmitery DA a NA, které přenášejí zprávy mezi mozkovými buňkami. S největší pravděpodobností se těchto složitých reakcí v našem mozku účastní i jiné neurotransmitery a enzymy, které zatím nebyly doposud objeveny nebo podrobně prozkoumány. Přesvědčení o biologickém podkladě hyperkinetické poruchy vedlo v druhé polovině minulého století k hledání markerů, které by potvrdily předpokládané odchylky v metabolizmu mozku. V této souvislosti se v 70. letech objevily sporadické návrhy označit hyperkinetickou poruchu jako „porucha metabolizmu monoaminů“ nebo „centrální amfetaminémie“. Nové znalosti o fungování lidského mozku a hlubší porozumění mechanizmu působení stimulancií v CNS se staly podkladem pro vytvoření prvního patofyziologického modelu hyperkinetické poruchy. V roce 1970 vyslovil C. Kortensky „**Katecholaminovou hypotézou hyperaktivity“**, podle které je hyperkinetická porucha důsledkem „snížené produkce nebo snížené utilizace“ katecholaminů (dopaminu a noradrenalinu) v mozku. Hypotéza se na jedné straně opírala o dlouholeté údaje dokumentující příznivý účinek stimulancií při léčbě hyperkinetických dětí, a na druhé straně, o schopnost stimulancií zvyšovat hladiny dopaminu a noradrenalinu v mozku.

Z pochopitelných důvodů nebylo možné měřit koncentraci katecholaminů in vivo přímo v mozku, jednalo se pouze o nálezy z periferie, což někdy dávalo důvody k pochybnostem. Dalším problémem byla tehdejší diagnostická nehomogennost vyšetřovaných souborů pacientů, studie z různých zemí uváděly výsledky biochemických měření u dětí s LMD, dyslektiků, u dětí s psychomotorickou instabilitou, u dětské hyperaktivity a dalších. Přes tyto nedostatky je s odstupem zřejmé, že dysfunkce v oblasti katecholaminů byla správně předpokládána a diagnostikována a později byla potvrzena i dalšími modernějšími medicínskými postupy (Drtílková et al., 2007).

Souhrn nálezů, které podporují předpoklad dysfunkce katecholaminů u hyperkinetické poruchy:

Pro poruchu v dopaminové oblasti svědčí :

- studie uvádějící korelaci mezi hladinou kyseliny homovanilové (HVA), která je metabolitem dopaminu a mírou hyperaktivity a impulzivity,
- nálezy zvýšené density dopaminového přenašeče (DAT) ve striátu
- v preklinických studiích, po zvýšení dopaminové transmise v oblasti striáta, došlo k indukci motorické hyperaktivity
- po blokádě dopaminového systému v prefrontální oblasti, došlo k poškození paměti a inhibičních mechanizmů.

Pro poruchu v noradrenalinové oblasti svědčí:

- nálezy snížené exkrece MHPG (3-methoxy-4-hydroxyfenylglykolu - metabolit noradrenalinu) v moči
- příznivý efekt látek zvyšujících noradrenergní transmise (tricyklická antidepresiva - TCA, atomoxetin, clonidin)
- látky, které ovlivňují pouze dopaminový systém - dopaminoví agonisté (L-dopa, amantadin), neprokázaly efekt v léčbě ADHD.

Katecholaminovou hypotézu zpětně potvrzuje účinek psychostimulancií. Hypotézu rovněž potvrzují nálezy zvýšené koncentrace dopaminového transportéru (DAT) u neléčených případů ADHD a její normalizaci po léčbě (Krause 2000).

2.7. Mechanizmus účinku stimulancií

Mezi nejčastěji využívané léky při léčbě ADHD patří psychostimulancia. Psychostimulancia u ADHD pravděpodobně normalizují sníženou dopaminergní transmisi ve frontální a limbické oblasti, která je spolu s kompenzatorním zvýšením dopaminergní aktivity v bazálních gangliích, zodpovědná za typickou triádu příznaků - poruchy pozornosti, hyperaktivitu a impulzivitu. Současně se zvýšením dopaminergní a noradrenergní transmise (a subsekventní inhibicí aktivity v locus coeruleus), dochází k augmentaci aktivity kortikálního dopaminu a down-regulaci dopaminu v oblasti striáta. Stimulancia (amfetaminy, kokain) obecně blokují zpětné vychytávání dopaminu a noradrenalinu na presynaptických neuronech a zvyšují jejich uvolňování do synaptické štěrbiny. Konečným efektem je zvýšení nabídky dopaminu a noradrenalinu na synapsích (Drtílková et al., 2007).

2.8. Enviromentální a negetické faktory

Dříve byly ADHD poruše přisuzovány zejména enviromentální faktory s biologickými příznaky. K rizikovým biologickým negenetickým faktorům byla řazena například konzumace alkoholu a kouření matky v graviditě, nízká porodní váha, předčasné porody, perinatální traumata spojená s hypoxií a úrazy, zasahující zejména frontální a prefrontální regiony. U dětí, které utrpěly po narození těžký úraz hlavy se mohou vyvinout příznaky ADHD, obvykle s převažující poruchou

pozornosti. Rovněž bazální ganglia, která hrají významnou roli v patofyziologii hyperkinetické poruchy patří k metabolicky nejaktivnějším strukturám mozku a jsou velmi citlivá na hypoxické inzulty. Závažnější se zdá být vliv chronických faktorů než akutních traumatických příhod. Biederman (2005) uvádí, že dosud 24 klinických studií potvrdilo zvýšené riziko vzniku ADHD u dětí, jejichž matky kouřily během gravidity. Pravděpodobně existuje souvislost s aktivací nikotinových receptorů, modulujících dopaminergní aktivitu, která má klíčový význam v patofyziologii ADHD. Okrajově bývá zvažován i vliv toxinů prostředí, například radioaktivity nebo umělých aromat a barviv v potravinách. Tyto hypotézy byly velmi populární v 80. letech minulého století, avšak pro nedostatek důkazů jsou opouštěny (Theiner, 2006).

2.9. Molekulárně-genetická podstata

První hypotézy, že by se za hyperaktivním chováním mohly skrývat geny byly učiněny na základě pozorování rodin s extrémně divokými a nepozornými dětmi. Některým rodinám bylo připisováno hyperaktivní chování mnohem více než jiným. Děti hyperaktivních rodičů také trpěly hyperaktivitou nebo příznaky nepozornosti více často než děti rodičů nehyperaktivních. Dodnes platí, že pokud jedno dítě v rodině je hyperaktivní, pak i druhé dítě je procentuálně více často hyperaktivní. Adopční studie potvrdily genetickou složku hyperkinetické poruchy – biologičtí rodiče dětí s hyperkinetickou poruchou trpěli sami touto poruchou v 7,5 % ve srovnání s adoptivními rodiči, kteří trpěli hyperkinetickou poruchou pouze ve 2,1 % (Sprich et al., 2000). Nejvíce pak byly patrny příznaky hyperaktivity u monozygotních dvojčat. Jak ukazují dnešní výsledky studií monozygotních dvojčat, heritabilita symptomů ADHD se pohybuje okolo 75% (Biederman et al., 2005). Tato nejnovější studie dvojčat zahrnuje výsledky všech studií dvojčat provedených od roku 1973 do roku 2004. V rodinných studiích bylo odhaleno, že u mužů s hyperkinetickou poruchou je pětkrát vyšší pravděpodobnost, že jejich příbuzní prvního stupně budou trpět touto poruchou, a to ve srovnání s normálními kontrolními osobami. Paclt et Florian (1996) shrnuli výsledky studií, podle kterých cca 20-32 % rodičů hyperkinetických dětí trpělo rovněž v dětství projevy hyperaktivity.
Molekulárně-genetické studie započaly v 80. a 90. letech 20. století rozplétat složitý genetický aparát této poruchy. U osob s ADHD, zejména dvojčat nebo sourozenců s ADHD, byly sledovány vazby genů (linkage analysis) a vybraná místa lidského genomu (genome scans), která by mohla být zodpovědná nebo se nějak podílet na patogenezi ADHD. S vyjímkou místa na chromozomu 17 (oblast 17p11) nebyla objevena žádná jiná místa, která by vykazovala silnou vazbu genu k ADHD. Výsledky těchto studií nepotvrdily jednoznačnou existenci místa na lidském genomu, které by

vykazovalo silnou vazbu genů k ADHD. Absence pozitivních a na sobě nezávisle potvrzených studií navrhuje, že neexistují geny, které mají silný vliv na vznik a rozvoj ADHD. Ze studií dále vyplývá, že existují pouze geny, které mají mírný vliv na rozvoj poruchy. V současnu tedy platí hypotéza, kdy více polymorfizmů několika genů přispívá k hyperaktivní poruše. U ADHD lze předpokládat vliv interakce velkého množství polymorfizmů genů, jejichž exprese probíhá zejména v mozku. Většina behaviorálních poruch odpovídá polygennímu modelu dědičnosti. Pro polygenní dědičnost je typická vícenásobnost genů, která může různou měrou přispívat a projevovat se ve fenotypu.V jiném typu studií (family-based study, case-control tudy) byly porovnávány skupiny osob s ADHD a kontrolní skupiny osob. V těchto studiích byly nalezeny některé geny, které mají dle těchto studií i logických hypotéz souvislost s ADHD. Mezi takové geny patří např. geny pro dopaminový receptor D4 a D5 a gen pro dopaminový přenašeč. Souvislost mezi ADHD a DA systémem podporují výzkumy zaměřené na působení stimulancií, která blokují přenašeč pro reuptake, a tím zvyšují koncentraci dopaminu v synaptické štěrbině. V tabulce 1. jsou uvedeny geny, které mohou mít podíl na vzniku ADHD a komorbidních poruch, v tabulce 2. jsou uvedeny některé kandidátní geny ADHD a jejich výskyt v populaci (Uhlíková et Paclt, 1999).

Tabulka 1. Kandidátní geny ADHD (Uhlíková et Paclt, 1999)

Systém	**Kandidátní geny**
Dopaminový	DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DRD5, DAT1, DBH, COMT
Serotoninový	TDO2, TH, HTR1A, HTR2A, HTR2B, HTR2C, MAOB
Noradrenalinový	ADRA1A, ADRA1B, ADRA1C, ADRA2A, ADRA2B, ADRA2C MAOA, MAOB, COMT

Tabulka 2. (Uhlíková et Paclt, 1999)

Gen	**Alela**	**Výskyt u ADHD**	**Výskyt v populaci**
DRD2	A1	42-54 %	21 -27 %
DRD4	7R	41 %	21 %
DBH	B1	73,1 %	24 %

2.10. Asociační molekulárně-genetické studie ADHD

V posledních letech se díky rozvoji molekulární psychiatrie objevuje stále větší počet prací využívajících především asociační studie (case control study) srovnávající kontrolní soubory osob se soubory osob s hyperkinetickou poruchou co do frekvencí polymorfizmů tzv. kandidátních genů. Dále jsou používány tzv. HHRR (haplotype-based haplotype relative risk) a TDT (trasmission disequilibrium test) studie. Metoda HRR (haplotype relative risk) je metoda detegující vazebné disekvilibrium. Při metodě HRR je testovanou jednotkou tzv. trio, rodina složená ze dvou rodičů a jednoho postiženého potomka. Každé trio do analýzy přispívá příčinným genotypem a kontrolním genotypem. Kontrolní genotyp je ten, který se skládá z alel rodičů, které se na potomka nepřenášejí. Analýza HHR bere v úvahu příčinné a kontrolní genotypy jako dvě nezávislé jednotky a hodnotí je z populačního hlediska. Oblíbenější a používanější metoda HHRR vychází z metody HHR, nicméně sleduje spíše jednotlivé alely než celé genotypy, takže v rámci tria jsou sledovány příčinné alely a kontrolní alely. Dalším testem je test McNemerův, který bere v úvahu pouze heterozygotní rodiče a sleduje, která z alel je preferenčně přenášena na postižené potomky. McNemerův test byl později přejmenován na TDT test u něhož bylo prokázáno, že je ve srovnání s vazebnými metodami robustnější metodou pro všechny případy alelických asociací. Zpočátku byly kandidátní geny vybírány z genů, které jsou součástí dopaminového systému. Zjevným důvodem je skutečnost, že psychostimulační látky, které až u 70 % postižených způsobí rychlé symptomatické zlepšení, zvyšují extracelulární hladiny dopaminu. Jako možné kandidátní geny byly nejvíce prozkoumány tyto geny: gen pro dopaminový přenašeč (DAT), geny pro dopaminové receptory D4, D2, D3, D5 a gen pro dopamin beta hydroxylázu (DBH). Později byla zvažována účast genů z oblasti noradrenergního a serotoninergního systému a dalších (Šerý et al., 2006).

Dopamin beta-hydroxyláza (DBH) katalyzuje přeměnu dopaminu na noradrenalin. Gen pro DBH je úzce vázán na ABO krevní skupinu na chromozomu 9q34 (Vuchetich et al., 1991). Alely několika polymorfizmů identifikovaných na DBH lokusu jsou zodpovědné za sérovou hladinu DBH v mozkomíšním moku (Schanberg et al., 1974). Doposud nebyla zjištěna přímá souvislost mezi nízkou sérovou hladinou DBH a hyperkinetickým syndromem. Výsledky studií jsou značně nejednotné (Cubells et al., 2000, Wei et al., 1997).

Funkcí serotoninového přenašeče je aktivní vychytávání serotoninu ze synaptické štěrbiny. Serotoninový přenašeč je lokalizován na presynaptické membráně a je cílem mnoha tricyklických antidepresiv a může zprostředkovávat efekt amfetaminů a kokainu. Gen pro serotoninový přenašeč se nalézá na chromozómu 17 a skládá se ze 14 exonů. Gen pro serotoninový transportér 5-HTT je intenzivně zkoumán teprve v posledních letech. Zdá se, že jeho genetický polymorfizmus může mít

přímý vztah k příznakům ADHD. Jsou známy jeho alely L/L, S/L a S/S. Jejich frekvence v kontrolní zdravé populaci je přibližně 0,25:0,5:0,25, u hyperkinetiků byla zjištěna frekvence alel 0,5:0,33:0,125 (L/L:S/L:S/S). L/L alela produkuje nejvíce funkčního 5-HTT (Fischer et al., 2002, Retz et al., 2002, Seeger et al., 2001). V posledním desetiletí se uvažuje také o genu pro serotoninový receptor 2A jako o kandidátním genu patogeneze psychických poruch jako jsou schizofrenie, ADHD, afektivní poruchy, úzkostné poruchy, Alzheimerova choroba atd. 5-HTR1B knock-outované myši vykazovaly zvýšenou impulzivitu (Brunner et al., 1997). Nejnovější studie zjistily, že podání psychostimulancií a serotonergních látek má na myši uklidňující efekt, který závisí na serotonergních neurotransmisích a není ovlivněn extracelulárními hladinami dopaminu. Souhrn interakcí mezi serotoninovým a dopaminovým systémem a jejich případná nerovnováha může stát za příčinami hyperaktivního chování. Defekty genů serotoninového systému mohou mít vliv na nerovnováhu mezi těmito neurotransmiterovými systémy. Výzkumy na myším modelu staví gen pro 5-HT1B receptor rovněž mezi možné kandidátní geny pro hyperaktivní chování. Noradrenalinové receptory ADRA1, ADRA2 jsou zkoumány na základě znalostí o působení léčiv (inhibice vychytávání noradrenalinu) a na základě studií na zvířatech. Noradrenalinový systém ovlivňuje pozornost, proces učení a paměť.

V práci uvádím tabulkový přehled dosud publikovaných studií rozdělených dle zkoumaného genu. V tabulkách jsou uvedeny výsledky nejčastěji zkoumaných genů, polymorfizmus, typ studie a výsledek studie (Šerý et al., 2007).

Zkratky použité v tabulkách:

+ pozitivní studie/trend, - negativní studie, TDT – Transmisssion Disequilibrium Test, CCS – Control-Case Study, HHRR – Haplotype-Based Haplotype Relative Risk, HRR - Haplotype Relative Risk, FBS – Family Based Study, MPH – studie zaměřené na souvislost mezi methylfenidátem a zkoumaným polymorfizmem, CPRS - Conners Parent Rating Scale, CTRS - Conners Teaching Rating Scale, CPS - Continuous Performance Test, WCST - Wisconsin Card Sorting Test , LD – learning disabilities, TS – Twin Study, SDQ - Strenghts and Difficulties Questionnaire, MFFT - Matching Familiar Figures Test, SART - Sustained Attention to Response Task, PDT - Pedigree Disequilibrium Test, MMS – Multiple Marker Analysis

Tabulka 3. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro DBH k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu pro DBH	Typ studie	Výsledek
Bhaduri et al., 2005	444 G/A a Taq I	HHRR	+ / -
Zhang et al., 2004	C1021T	HHRR	+
Inkster et al., 2004	TaqI	TDT	-
Smith et al., 2003	TaqI a GT-4 repeat	CCS	+ / -
Payton et al., 2001	TaqI	FBS	-
Kirley et al., 2002	TaqI	TDT	+
Wigg et al., 2002	TaqI	HRR	-
Roman et al., 2002	TaqI	HRR	+
Daly et al., 1999	TaqI	TDT, HHRR	+

Tabulka 4. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro COMT k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu pro COMT	Typ studie	Výsledek
Bobb et al., 2005	Val158Met	CCS, TDT	-
Bellgrove et al., 2005	Val158Met	CPT	+ / -
Turic et al., 2005	Val158Met, markery rs737865, rs165599	FBS	- / - / -
Taerk et al., 2004	Val158Met	WCST	-
Mills et al., 2004	Val158Met	WCST	-
Zhang et al., 2003	Val158Met	CCS	-
Qian et al., 2003	Val158Met	TDT, HHRR, CCS	+
Payton et al., 2001	Val158Met	FBS	-
Manor et al., 2000	Val158Met	HRR	-
Tahir et al., 2000	Val158Met	TDT	-
Hawi et al., 2000	Val158Met	HHRR	-
Barr et al., 1999	Val158Met	TDT	-
Eisenberg et al. , 1999	Val158Met	HRR, CTRS, CPT	+

Tabulka 5. Molekulárně-biologické studie vztahu genů pro noradrenalinové receptory k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu pro ADRA2A	Typ studie	Výsledek
Wang et al., 2006	MspI, DraI	TDT	- / -
Stevenson et al., 2005	MspI	TDT	+
Bobb et al., 2005	MspI	CCS, TDT	-
Park et al., 2005)	DraI	TDT	+
Roman et al., 2003	MspI	HRR	+
Xu et al., 2001	MspI	TDT	-
Comings et al., 1999	MspI	LD	+
Publikace	**Polymorfizmus genu pro ADRA2C**	**Typ studie**	**Výsledek**
DeLuca et al., 2004	mikrosatelitový repeat	TDT	-
Barr et al., 2001	(CA)n dinukleotidový repeat	TDT	-
Comings et al., 1999	(CA)n dinukleotidový repeat	LD	+
Publikace	**Polymorfizmus genu pro ADRA1C**	**Typ studie**	**Výsledek**
Barr et al., 2001	Cys492Arg	TDT	-

Tabulka 6. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro monoaminooxidázu k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu pro MAOA	Typ studie	Výsledek
Domschke et al., 2005	$(CA)_n$ repeat v intronu 2	TDT	-
Domschke et al., 2005	941G/T v exonu 8	TDT	+
Domschke et al., 2005	A/G v intronu 12	TDT	-
Domschke et al., 2005	30 bp VNTR promoterové oblasti	TDT	-
Manor et al., 2002	v promoterové oblasti	FBS,CCS,CPT	+
Jiang et al., 2001	$(CA)_n$ repeat	TDT	+
Payton et al., 2001	122 bp markerová alela	FBS	+
Lawson et al., 2003	941 T/G Fnu4HI a 30 bp VNTR	CCS, TDT	- / +
Publikace	**Polymorfizmus genu pro MAOB**	**Typ studie**	**Výsledek**
Domschke et al., 2005	$(CA)_n$ repeat v intronu 2	TDT	-
Domschke et al., 2005	T/C SNP v intronu 13	TDT	+
Jiang et al., 2001	VNTR $(GT)_n$	TDT	-

Tabulka 7. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro serotoninový přenašeč k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu pro 5-HTT	Typ studie	Výsledek
Xu et al., 2005	VNTR	FBS	+
Cadoret et al., 2003	5-HTTLRP	FBS	+
Langley et al., 2003	5-HTTLRP a VNTR	TDT	- / -
Kent et al., 2002	5-HTTLRP, VNTR, 3´ UTR SNP	FBS	+ / + / +
Retz et al., 2002	v promoterové oblasti	WURS	+
Zoroglu et al., 2002	VNTR a 5-HTTLRP	CCS	+ / +
Manor et al., 2001	5-HTTLRP	FBS	+
Seeger et al., 2001	v promoterové oblasti	CCS	+

Tabulka 8. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro dopaminový přenašeč k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu pro DAT1	Typ studie	Výsledek
Lim et al., 2006	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	+
Carrasco et al., 2006	3´ UTR 40 bp VNTR	TS	+
Van der Meulen et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	MPH	-
Kim et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT, CCS	-
Feng et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	FBS	-
Langley et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	FBS	-
Simsek et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	CCS	-
Stein et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	MPH	+
Bobb et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	-
Qian et al., 2005	G352A v exonu 15	TDT	-
Mill et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	TS	+
Cheon et al., 2005	3´ UTR 40 bp VNTR	MPH	+
Carrasco et al., 2004	3´ UTR 40 bp VNTR	FBS	-
Bakker et al., 2004	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	-
Qian et al., 2004	3´ UTR 40 bp VNTR	FBS, CCS	+
Kirley et al., 2003	3´ UTR 40 bp VNTR	MPH	+
Chen et al., 2003	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	+

Smith et al., 2003	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	-
Kahn et al., 2003	3´ UTR 40 bp VNTR	CPRS	+ / -
Hawi et al., 2003	3´ UTR 40 bp VNTR	LDM	+
Mill et al., 2002	3´ UTR 40 bp VNTR	LDM	+
Todd et al., 2001	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	-
Roman et al., 2001	3´ UTR 40 bp VNTR	HRR	-
Rowe et al., 2001	3´ UTR 40 bp VNTR	FBS	+
Curran et al., 2001	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	+ / -
Payton et al., 2001	3´ UTR 40 bp VNTR	TS	-
Barr et al., 2001	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	+
Holmes et al., 2000	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	-
Winsberg et al., 2000	3´ UTR 40 bp VNTR	MPH	+
Palmer et al., 1999	3´ UTR 40 bp VNTR	LDM	-
Daly et al., 1999	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT, HHRR	+
Waldman at al., 1998	3´ UTR 40 bp VNTR	TDT	+
Gill et al., 1997	3´ UTR 40 bp VNTR	HRR	+
Cook et al., 1995	3´ UTR 40 bp VNTR	HHRR	+

Tabulka 9. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro DRD4 k ADHD

Publikace	**Polymorfizmus genu pro DRD4**	**Typ studie**	**Výsledek**
Kim et al., 2005	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	-
Brookes et al., 2005	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	-
Bellgrove et al., 2005	3´UTR 48 bp VNTR, -521 a –616 SNPs	SART	+ / - / -
Lynn et al., 2005	3´UTR 48 bp VNTR	FBS	+
Bobb et al., 2005	3´ UTR 48 bp VNTR	TDT	-
Hamarman et al., 2004	3´ UTR 48 bp VNTR	MPH	+
Lowe et al., 2004	-616 SNP	MMA	+
Kirley et al., 2004	3´UTR 48 bp VNTR, -616, -521, -376	FBS	+ / - / - / -
Bakker et al., 2004	3´ UTR 48 bp VNTR	TDT	-
Qian et al., 2004	3´ UTR 48 bp VNTR	FBS, CCS	+
El Faddagh et al., 2004	3´ UTR 48 bp VNTR	CCS	+
Arcos-Burgos et al., 2004	3´ UTR 48 bp VNTR a –240bp SNP	PDT	+ /+
Langley et al., 2004	3´UTR 48 bp VNTR	CPT, MFFT	+
Kustanovich et al., 2004	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	-
Qian et al., 2003	3´UTR 48 bp VNTR	ETDT, HRR	+
Maher et al., 2002	3´UTR 48 bp VNTR	meta-analýza	+
Manor et al., 2002	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Huang et al., 2002	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Holmes et al., 2002	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Roman et al., 2001	3´UTR 48 bp VNTR	HRR	+ / -
Payton et al., 2001	3´UTR 48 bp VNTR	FBS	-
Todd et al., 2001b	VNTR, -120-bp marker	FBS	- / -
Mill et al., 2001	3´UTR 48 bp VNTR	TDT, HHRR	-
Barr et al., 2001	3 nové polymorfizmy v 5´oblasti	TDT	- / - / -
McCracken et al., 2000	-120 bp markerová alela	TDT	+
Holmes et al., 2000	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Kotler et al., 2000	3´UTR 48 bp VNTR	HRR	+

Muglia et al., 2000)	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Hawi et al., 2000	3´UTR 48 bp VNTR	CCS, HHRR	-
Eisenberg et al., 2000	3´UTR 48 bp VNTR	FBS	-
Tahir et al., 2000	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Sunohara et al., 2000	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+ / -
Faraone et al., 1999	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+
Castellanos et al., 1998	3´UTR 48 bp VNTR	CCS	-
Smalley et al., 1998	3´UTR 48 bp VNTR	HRR, TDT	+ / -
Rowe et al., 1998	3´UTR 48 bp VNTR	TDT	+ /-
Swanson et al., 1998	3´UTR 48 bp VNTR	CCS, HRR	+
LaHoste et al., 1996	3´UTR 48 bp VNTR	CCS	+

Tabulka 10. Molekulárně-biologické studie vztahu genu pro DRD5 k ADHD

Publikace	Polymorfizmus genu	Typ studie	Výsledek
Bobb et al., 2005	148 bp markerová alela (CA)n repeatu	TDT	-
Bakker et al., 2005	148 bp markerová alela (CA)n repeatu	TDT	-
Manor et al., 2004	148 bp markerová alela (CA)n repeatu	TDT	+
Mill et al., 2004	131 kb dinucleotide repeat a 148 bp	FBS	+ / -
Kustanovich et al., 2004	146 a 148 bp markerové alely (CA)n	TDT	+ / +
Payton et al., 2001	148 bp markerová alela (CA)n repeatu	FBS	+
Barr et al., 2000	(CA)n repeat a 148 bp markerová alela	TDT	-
Tahir et al., 2000	148 bp markerová alela (CA)n repeatu	TDT, MPH	+
Daly et al., 1999	148 bp markerová alela (CA)n repeatu	TDT, HHRR	- / +

V rámci molekulárně-genetických studií zaměřených na hyperaktivitu byly již zkoumány různé polymorfizmy genů pro acetylcholinové, nikotinové, glutamátové, estrogenové či androgenové receptory, ale i geny pro synapticko-vezikulární proteiny jako je protein SNAP-25.

V posledních dvou letech se objevují moderní studie provedené za pomocí nových detekčních metod Bead Array technologie (Illumina Bead Array Technology nebo Affymetrix). Jedná se o detekci na čipu, kdy je současně umožněno detekovat desítky až stovky polymorfizmů současně. První studií využívající této metoty ve výzkumu ADHD byla studie publikovaná v roce 2006 (Brookes et al., 2006). Ve studii bylo současně analyzováno 51 genů u 776 ADHD osob. U 18 z detekovaných polymorfizmů kandidátních genů byla nalezena nějaká souvislost mezi markerem a ADHD. V budoucnu lze očekávat velký nárůst takových studií, které budou detekovat stovky polymorfizmů současně během několika málo hodin. Polymorfizmy v takových studiích již často nejsou označovány zkratkou genu a záměnou báze či aminokyseliny, ale pouze rs číslem v genové databázi GeneBank. Během řádově desítek let bude s pomocí Bead Array technologií možné zjistit všechny polymorfizmy na celém lidském genomu. Problémem pak bude spíše zjistit to, co jsme vlastně zkoumali a k čemu má daný polymorfizmus vztah, nehledě k potřebě zpracování obrovského množství dat.

3. Zkoumané polymorfizmy kandidátních genů, jejich receptory, enzymy a chemokiny

3.1. TaqI A polymorfizmus genu pro dopaminový receptor D2 (DRD2)

Dopaminové receptory jsou buněčné makromolekuly vyskytující se na nervových synapsích v různých oblastech mozku, vážou DA, který reguluje pohybou aktivitu, kognitivní funkce (vnímání, paměť, pozornost, myšlení) a emoce. Prekurzorem dopaminu je tyrozin, který se přeměňuje pomocí tyrozinhydroxylázy (TH) na 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), ze kterého se účinkem L-DOPA dekarboxylázy stává DA. Dopaminové receptory patří do rodiny receptorových proteinů spojených s regulačními G-proteiny, které aktivují nebo inhibují adenylyl cyklázu (AC). AC dále ovlivňuje hladinu cyklického AMP (cAMP) uvnitř buňky. Výsledkem je ovlivnění vodivosti membránových kanálů pro vápník (Ca^{2+}) a pro draslík (K^{+}). Na základě strukturální odlišnosti rozlišujeme pět podtypů těchto receptorů, které jsou seskupeny do dvou rodin (Štaif, 2003).
Do D1 rodiny dopaminových receptorů patří D1 a D5 receptory. Tyto receptory aktivují AC přes G_S proteiny. AC tímto mechanizmem zvyšuje tvorbu cAMP. Nejvyšší koncentrace D1 rodiny receptorů se nachází ve striátu, amygdale, neokortexu a hipokampu. Do rodiny D2 receptorů řadíme D2, D3 a D4 receptory. Obsazení D2 rodiny receptorů je prostřednictvím G_I proteinů spojeno s inhibicí AC a následným snížením tvorby cAMP. D2 receptory jsou přítomny v nejvyšší koncentraci ve striátu a substancia nigra, v menší koncentraci v neokortexu a hipokampu. D3 receptory se nacházejí v nucleus accumbens a striátu, D4 receptory v neokortexu a hipokampu (Meador-Woodruff et al., 1996). Gen pro DRD4 ovlivňuje postsynaptické působení DA, proto je polymorfizmus genu pro DRD4 dáván do přímé souvislosti s ADHD a patří mezi kandidátní geny. Příčinou variability 3´UTR VNTR polymorfizmu genu pro DRD4 je oblast 48 páru bazí (bp) opakujících se 2-11 krát ve 3 exonu genu (Obrázek 8). V 94 % se jedná o 2-, 4- a 7-násobně se opakující alely. Repetitivní oblast genu pro DRD4 může měnit dopaminovou transmisi. Ve srovnání s kontrolní skupinou osob bývá u osob s ADHD častěji přítomna 7-repetitivní alela (LaHoste et al., 1996). Tato alela je stále středem zájmu mnoha asociačních výzkumných prací.

Obrázek 8. Repeaty 3´UTR VNTR 48 bp polymorfizmu genu pro DRD4 - za příčinou ADHD může dle některých studií stát 7-repetitivní alela (7R), repeaty 1 až 10 značeny barevně:

```
  1 acccgcgccc cgcctccccc aggaccctg cggccccgac tgtgcgcccc ccgcgcccgg
 61 ccttccccgg ggtccctgcg gccccgactg tgcgcccgcc gcgcccagcc tcccccagga
121 cccctgtggc cccgactgtg cgcccccgc gcccggcctc ccccggacc cctgcggccc
181 cgactgtgcg ccccccgcgc ccggcctccc ccaggaccc tgcggccccg actgtgcgcc
241 ccccgcgccc ggcctccccc aggaccctg tggccccgac tgtgcgcccg ccgcgcccag
301 cctcccccg gaccctgcg gccccgactg tgcgcccccc gcgcccggcc tcccccagga
361 cccctgcggc cccgactgtg cgcccccgc gcccggcctt ccccggggtc cctgcggccc
421 cgactgtgcg ccccccgcgc ccggcctccc ccaggaccc tgcggccccg actgtgcgcc
481 ccccgcgccc ggcctccccc cggacccgtg cggctccaac tgtgctcc
```

Někteří autoři zjistili vztah mezi fenotypovou expresí dopaminových receptorů D2 v lidském mozku v oblastech, které jsou obecně dávány do souvislosti s neurobiologickými nálezy u ADHD jedinců a A1 alelou, kdy alela A1 snižovala B_{max} (celkovou koncentraci receptorů) v nucleus caudatus (Noble et al., 1991) nebo B_{max}/K_d (poměr celkové koncentrace receptorů ku rovnovážné disociační konstantě) ve striátu (Pohjalainen et al., 1998). Gen pro dopaminový receptor D2 se nachází na chromozomu 11 v oblasti 11q22-23 (Grandy et al., 1989). Velikost genu činí přes 270 kb, jeho kódující sekvence je přerušena šesti introny, přičemž první velký intron má velikost 250 kb (Eubanks et al., 1992).

Nejčastěji zkoumaným polymorfizmem tohoto genu je TaqI A polymorfizmus. Polymorfizmus je pojmenován podle různé délky restrikčních fragmentů získaných štěpením DNA restrikčním enzymem z mikroorganizmu *Thermus aquaticus*. Jde tedy o polymorfizmus typu *restriction fragments´ length polymorphism* (RFLP). Alela A1 tohoto polymorfizmu u zdravých dobrovolníků vede k nižší expresi tohoto genu a tím nižší denzitě D2 receptoru ve striátu, kde slouží jako autoreceptor, proto je celková syntéza dopaminu ve striátu zvýšena (Laakso 2005). To odpovídá současné uznávané katecholaminové hypotéze ADHD, která předpokládá zvýšené hladiny dopaminu v bazálních gangliích. Obě izoformy DRD2 se vyskytují především v bazálních gangliích (caudatum, putamen) a v nucleus accumbens, tedy v oblastech asociovaných v mnoha neurobiologických studiích s ADHD (Cooper et al., 2003). Z genu pro DRD2 mohou být tvořeny alternativním sestřihem dvě RNA izoformy: D2L (dlouhá) a D2S (krátká), které se odlišují přítomností nebo absencí 29-aminokyselinové sekvence na cytoplazmatickém konci receptorového proteinu. Exprese D2L a D2S je tkáňově specifická. Alela A1 polymorfizmu TaqI A genu pro DRD2 je dávána do souvislosti s alkoholizmem, drogovou závislostí a patologickým hráčstvím. Alela A2 je naopak častěji nalézána v kontrolních souborech osob (Hříbková, 2002).

3.2. 3´ UTR VNTR 40 bp polymorfizmus genu pro dopaminový přenašeč (DAT1)

Polymorfizmus genu pro dopaminový přenašeč DAT1 je dáván do přímé souvislosti s hyperaktivní poruchou (ADHD). Ve studiích bylo prokázáno, že gen pro DAT1 má vliv na pozměněnou funkci dopaminového přenašeče, který zabezpečuje reuptake dopaminu ze synaptické štěrbiny a je hlavním místem působení stimulancií. Katecholaminová hypotéza ADHD se opírá o nálezy zvýšené koncentrace dopaminového přenašeče u neléčených případů ADHD a její normalizaci po léčbě (Arnold, 2002). Tyto nálezy naznačují, že hypofunkce katecholaminových drah reprezentuje snížené uvolňování katecholaminů na synapsích a úspěšná léčba stimulačními látkami může normalizovat synaptickou koncentraci dopaminu i noradrenalinu.

Vandenbergh et al. (1992) klonovali cDNA celé kódující sekvence včetně nepřekládaného 3`-konce genu pro DAT1 a na 3`- konci nalezli repetitivní sekvenci o délce 40 bp (Obrázek 9). Analýzou repetitivní sekvence VNTR bylo zjištěno, že se v genu vyskytuje v rozmezí tři až jedenáct kopií. Tato repetitivní sekvence se stala nejčastěji studovaným polymorfizmem genu pro DAT1. Přestože se vyskytuje několik studií s negativním výsledkem, je pravděpodobné, že alela 10 (desetinásobné opakování 40 bp repetice) je rizikovým faktorem vzniku ADHD. Homozygotní osoby nesoucí repetitivní alely 10 mají dle některých výzkumů horší odpověď na léčbu stimulancii, ve srovnání s jedinci, kteří mají 8- a 9- repetitivní alely tohoto polymorfizmu (Stein et al, 2005). U většiny z těchto studií byl objeven vztah mezi odpovědí na methylfenidát a polymorfizmem 40 bp VNTR. Vztah alely 480 bp tohoto polymorfizmu k hyperkinetické poruše byl potvrzen nezávisle na sobě asi v patnácti asociačních studiích. Desetinásobná repetice je pokládána za rizikový faktor vzniku ADHD.

Obrázek 9. Gen pro DAT1 - Opakující se sekvence VNTR (variable number tandem repeat), 40 páru bazí polymorfního genu pro DAT1: **tccttgt ggtgtaggga acggcctgag aggagcgtgt cct**, tato variabilní sekvence nukleotidů se opakuje v genu pro DAT1 v 8 - 11 kopiích:

```
   1 accgctccgg agcgggaggg gaggcttcgc ggaacgctct cggcgccagg actcgcgtgc
  61 aaagcccagg cccgggcggc cagaccaaga gggaagaagc acagaattcc tcaactccca
 121 gtgtgcccat gagtaagagc aaatgctccg tgggactcat gtcttccgtg gtggccccgg
 181 ctaaggagcc caatgccgtg ggcccgaagg aggtggagct catccttgtc aaggagcaga
 241 acggagtgca gctcaccagc tccaccctca ccaacccgcg gcagagcccc gtggaggccc
 301 aggatcggga gacctggggc aagaagatcg actttctcct gtccgtcatt ggctttgctg
 361 tggacctggc caacgtctgg cggttcccct acctgtgcta caaaaatggt ggcggtgcct
 421 tcctggtccc ctacctgctc ttcatggtca ttgctgggat gccacttttc tacatggagc
 481 tggccctcgg ccagttcaac agggaagggg ccgctggtgt ctggaagatc tgccccatac
 541 tgaaaggtgt gggcttcacg gtcatcctca tctcactgta tgtcggcttc ttctacaacg
 601 tcatcatcgc ctgggcgctg cactatctct tctcctcctt caccacggag ctcccctgga
 661 tccactgcaa caactcctgg aacagcccca actgctcgga tgcccatcct ggtgactcca
 721 gtggagacag ctcgggcctc aacgacactt ttgggaccac acctgctgcc gagtactttg
 781 aacgtggcgt gctgcacctc caccagagcc atggcatcga cgacctgggg cctccgcggt
 841 ggcagctcac agcctgcctg gtgctggtca tcgtgctgct ctacttcagc ctctggaagg
 901 gcgtgaagac ctcagggaag gtggtatgga tcacagccac catgccatac gtggtcctca
 961 ctgccctgct cctgcgtggg gtcaccctcc ctggagccat agacggcatc agagcatacc
1021 tgagcgttga cttctaccgg ctctgcgagg cgtctgtttg gattgacgcg gccacccagg
1081 tgtgcttctc cctgggcgtg gggttcgggg tgctgatcgc cttctccagc tacaacaagt
1141 tcaccaacaa ctgctacagg gacgcgattg tcaccacctc catcaactcc ctgacgagct
1201 tctcctccgg cttcgtcgtc ttctccttcc tggggtacat ggcacagaag cacagtgtgc
1261 ccatcgggga cgtggccaag gacgggccag ggctgatctt catcatctac ccggaagcca
1321 tcgccacgct ccctctgtcc tcagcctggg ccgtggtctt cttcatcatg ctgctcaccc
1381 tgggtatcga cagcgccatg ggtggtatgg agtcagtgat caccgggctc atcgatgagt
1441 tccagctgct gcacagacac cgtgagctct tcacgctctt catcgtcctg gcgaccttcc
1501 tcctgtccct gttctgcgtc accaacggtg gcatctacgt cttcacgctc ctggaccatt
1561 ttgcagccgg cacgtccatc ctctttggag tgctcatcga agccatcgga gtggcctggt
1621 tctatggtgt tgggcagttc agcgacgaca tccagcagat gaccgggcag cggcccagcc
1681 tgtactggcg gctgtgctgg aagctggtca gcccctgctt tctcctgttc gtggtcgtgg
1741 tcagcattgt gaccttcaga cccccccact acggagccta catcttcccc gactgggcca
1801 acgcgctggg ctgggtcatc gccacatcct ccatggccat ggtgcccatc tatgcggcct
1861 acaagttctg cagcctgcct gggtcctttc gagagaaact ggcctacgcc attgcacccg
1921 agaaggaccg tgagctggtg gacagagggg aggtgcgcca gttcacgctc cgccactggc
1981 tcaaggtgta gagggagcag agacgaagac cccaggaagt catcctgcaa tgggagagac
2041 acgaacaaac caaggaaatc taagtttcga gagaaaggag ggcaacttct actcttcaac
2101 ctctactgaa aacacaaaca acaaagcaga agactcctct cttctgactg tttacacctt
2161 tccgtgccgg gagcgcacct cgccgtgtct tgtgttgctg taataacgac gtagatctgt
2221 gcagcgaggt ccaccccgtt gttgtccctg cagggcagaa aaacgtctaa cttcatgctg
2281 tctgtgtgag gctccctccc tccctgctcc ctgctcccgg ctctgaggct gccccagggg
2341 cactgtgttc tcaggcgggg atcacgatcc ttgtagacgc acctgctgag aatccccgtg
2401 ctcacagtag cttcctagac catttacttt gcccatatta aaaagccaag tgtcctgctt
2461 ggtttagctg tgcagaaggt gaaatggagg aaaccacaaa ttcatgcaaa gtcctttccc
2521 gatgcgtggc tcccagcaga ggccgtaaat tgagcgttca gttgacacat tgcacacaca
2581 gtctgttcag aggcattgga ggatgggggt cctggtatgt ctcaccagga aattctgttt
2641 atgttcttgc agcagagaga aataaaactc cttgaaacca gctcaggcta ctgccactca
2701 ggcagcctgt gggtccttgt ggtgtaggga acggcctgag aggagcgtgt cctatccccg
2761 gacgcatgca gggcccccac aggagcgtgt cctatccccg gacgcatgca gggcccccac
2821 aggagcatgt cctatccctg gacgcatgca gggcccccac aggagcgtgt actaccccag
2881 aacgcatgca gggcccccac aggagcgtgt actaccccag gacgcatgca gggcccccac
2941 tggagcgtgt actaccccag gacgcatgca gggcccccac aggagcgtgt cctatccccg
3001 gaccggacgc atgcagggcc cccacaggag cgtgtactac cccaggacgc atgcagggcc
3061 cccacaggag cgtgtactac cccaggatgc atgcagggcc cccacaggag cgtgtactac
3121 cccaggacgc atgcagggcc cccatgcagg cagcctgcag accaacactc tgcctggcct
3181 tgagccgtga cctccaggaa gggaccccac tggaatttta tttctctcag gtgcgtgcca
3241 catcaataac aacagttttt atgtttgcga atggcttttt aaaatcatat ttacctgtga
3301 atcaaaacaa attcaagaat gcagtatccg cgagcctgct tgctgatatt gcagtttttg
3361 tttacaagaa taattagcaa tactgagtga aggatgttgg ccaaaagctg ctttccatgg
3421 cacactgccc tctgccactg acaggaaagt ggatgccata gtttgaattc atgcctcaag
3481 tcggtgggcc tgcctacgtg ctgcccgagg gcaggggccg tgcagggcca gtcatggctg
3541 tcccctgcaa gtggacgtgg gctccaggga ctggagtgta atgctcggtg ggagccgtca
3601 gcctgtgaac tgccaggcag ctgcagttag cacagaggat ggcttcccca ttgccttctg
3661 gggagggaca cagaggacgg cttccccatc gccttctggc cgctgcagtc agcacagaga
3721 gcggcttccc cattgccttc tggggaggga cacagaggac agtttcccca tcgccttctg
3781 gttgttgaag acagcacaga gagcggcttc cccatcgcct tctggggagg ggctccgtgt
3841 agcaacccag gtgttgtccg tgtctgttga ccaatctcta ttcagcatcg tgtgggtccc
3901 taagcacaat aaaagacatc cacaatggaa aaaaaaaaag gaattc
```

3.3. Val158Met polymorfizmus genu pro katechol-o-methyltransferázu (COMT)

Enzym (EC 2.1.1.6) katechol-O-methyltransferáza (COMT) hraje hlavní roli při degradaci katecholaminů jako je DA, L-DOPA, adrenalin a NA. V lidském těle se COMT nalézá zejména v erytrocytech. Gen pro COMT byl lokalizován na 22 chromozomu v oblasti 22q11. U člověka existují dvě formy enzymu COMT, které jsou způsobeny alternativním sestřihem genu. Záměnou guaninu za adenin v kodónu 108 vzniká cytoplazmatická neboli rozpustná forma COMT (S-COMT), záměnou v kodónu 158 vzniká membránově vázaná forma COMT (MB-COMT). Gen kóduje ve tkáni dvě formy enzymu COMT, které se odlišují aminokyselinovou sekvencí na N-konci bílkovinného řetězce. V bílkovinném řetězci COMT dochází vlivem polymorfizmu Val158Met k substituci valinu za methionin. Homozygoti (MM) pro methionin mají sníženou enzymovou aktivitu COMT a jsou méně termostabilní. Homozygoti (VV) pro valin mají 3-4 krát vyšší aktivitu enzymu COMT než MM a mají vyšší termostabilitu. Heterozygoti MV se vyznačují střední aktivitou COMT a termostabilitou mezi formami homozygotů (Lachman et al., 1996).

Funkční polymorfizmus COMT genu může stát za příčinou ADHD, protože ovlivňuje a kontroluje množství dopaminu a noradrenalinu vyskytujícího se na synapsích. Předpokládá se, že nízká hladina DA na synapsích je způsobena vyšší hladinou COMT aktivity individuí mající genotyp VV. Tito homozygoti jsou dáváni do souvislosti s impulzivitou a vyšším rizikem ADHD. Doposud provedené studie nepotvrdily výraznou souvislost mezi vyšší aktivitou COMT a ADHD (Eisenberg et al., 1999).

Barr et al. (1999) testoval vazbu mezi ADHD a Val158Met polymorfizmem genu pro COMT na 77 rodinách s negativním výsledkem. Také Hawi et al. (2000) a Tahir et al. (2000) neobjevili na 94 a 72 rodinách vztah mezi tímto polymorfizmem a ADHD. Skupina kolem Eisenberga provedla novou nezávislou studii na nových subjektech a nepotvrdila vztah mezi ADHD a polymorfizmem Val158Met genu pro COMT (Manor et al., 2000). Payton et al. (2001), Zhang et al. (2003), Mills et al. (2004) a Bobb et al. (2005) tento vztah také neobjevili. Studie z čínské populace Han (Qian et al., 2003) použila soubory 202 rodin (340 případů ADHD) a 226 kontrolních osob ke studiu vztahu mezi ADHD a Val158Met polymorfizmem genu pro COMT. V této studii bylo zjištěno, že alela Met, znamenající nízkou aktivitu COMT, byla statisticky významně častěji přenášena na chlapce s ADHD (p=0,05), pro dívky toto zjištění neplatilo. ADHD-I subtyp a ADHD bez komorbidit byly u chlapců asociovány s polymorfizmem Val158Met genu pro COMT. Alela Val byla častější u dívek, které splňovaly kritéria pro hyperkinetickou poruchu (MKN-10) nebo pro ADHD (DSM-IV) – 86% a 79,5%, ve srovnání s dívkami z kontrolního souboru.

3.4. A/G polymorfizmus ve 13. intronu genu pro monoaminoxidázu B (MAOB)

Enzym monoaminooxidáza (MAO, EC1.4.3.4) katalyzuje oxidativní deaminaci mnoha neurotransmiterů a potravinových aminů. Jedná se o membránově vázaný mitochondriální enzym existující ve dvou formách – MAOA a MAOB. MAOA preferenčně katalyzuje oxidativní deaminaci serotoninu, noradrenalinu a adrenalinu, MAOB katalyzuje přeměnu benzylaminu a fenylethylaminu. Substrátem pro obě formy enzymu jsou dopamin, tyramin a tryptamin. Geny pro oba enzymy byly lokalizovány na chromozómu X. Garpenstrand et al. (2000) studovali vztah polymorfizmu A/G ve 13. intronu genu pro MAOB a aktivitou MAOB a zjistili, že osoby s alelou A vykazují signifikantně nižší enzymovou aktivitu MAOB než osoby s alelou G ($p=0,019$).
Geny pro monoaminooxidázu A (MAOA) i monoaminooxidázu B (MAOB) patří mezi kandidátní geny, které mohou přispívat k ADHD. Lawson (2003) zjišťoval vztah mezi ADHD a dvěma polymorfizmy genu pro MAOA (polymorfizmus 30 bp VNTR promotorové oblasti a polymorfizmus Fnu4HI 941 T/G) a objevil asociaci mezi VNTR polymorfizmem genu pro MAOA a podskupinou osob s komorbidní poruchou chování. Studie provedená na čínském souboru osob nalezla vztah mezi ADHD a VNTR polymorfizmem genu pro MAOA ($p<0,05$). V rámci této studie byl zkoumán i G/T polymorfizmus genu pro MAOB, u něchož nebyla nalezena souvislost s ADHD (Jiang et al., 2001). Manor (2002b) zjistil, že nositelé „dlouhé“ MAOA alely vykazují v CPT (Continuous Performance Test) testech více chyb. Ve svých asociačních studiích rovněž zjistil vztah promoterového polymorfizmu genu pro MAOA k hyperaktivní poruše (Manor et al., 2002b). Domschke (2005) zkoumal čtyři polymorfizmy genu pro MAOA (30 bp VNTR, $(CA)_n$ repeat v intronu 2, polymorfizmus 941G/T v exonu 8 a polymorfizmus A/G v intronu 12) a dva polymorfizmy genu pro MAOB ($(CA)_n$ repeat v intronu 2 a polymorfizmus T/C v intronu 13) ve vztahu k ADHD a nalezl vztah mezi alelou 941G genu pro MAOA a formu MAO-A enzymu s větší aktivitou ($p=0,03$). Celkově lze říci, že gen pro MAOA zřejmě bude mít modulující efekt v rámci patogeneze hyperkinetické poruchy, ale nebude hrát v patogenezi hyperkinetické poruchy podstanou roli sám o sobě.

3.5. M235T polymorfizmus genu pro angiotensinogen (AGT)

Angiotensinogen je glykoprotein s molekulární hmotností cca 55 - 65 kDa, která závisí na stupni glykosylace (Clauser et al., 1989). Nachází se v alfa globulinové frakci plazmy a je prekurzorem všech angiotensinových fragmentů, přičemž je syntetizován v mnoha tělních tkáních. K nejvíce

studovaným polymorfizmům genu pro angiotensinogen patří polymorfizmus M235T a T174M. Byl zjištěn vztah mezi těmito polymorfizmy a hypertenzí. Polymorfizmus M235T spočívá v záměně thyminu za cytosin v poloze +704 od startu transkripce, výsledkem čehož je aminokyselinová substituce methioninu za threonin v poloze 235 aminokyselinového řetězce. Polymorfizmus M235T má vliv na plazmatickou koncentraci angiotensinogenu. Homozygoti M235 měli zvýšenou koncentraci angiotensinu v plazmě o 20 %, heterozygoti o 10 % oproti homozygotům T235 (Jeunemaitre et al., 1993). Role angiotensinu II jako neurotransmiteru a neuromodulátoru cholinergních, noradrenergních, dopaminových, GABAergních a opioidních neurotransmisí je již známa.

3.6. I/D polymorfizmus genu pro angiotensinkonvertázu (ACE)

Angiotenzinkonvertující enzym (ACE) je součástí renin-angiotensinového systému (RA systém). RA systém se účastní regulace kardiovaskulárního systému a osmoregulace, podílí se tedy na řízení krevního tlaku, vylučování, příjmu vody a elektrolytické rovnováze - exkreci Na^+ a K^+. ACE přeměňuje angiotensin I na aktivní angiotensin II (AGT II). AGT II zvyšuje arteriální tlak a stimuluje centrum žízně v hypothalamu, snižuje exkreci vody a solí ledvinami, stimuluje sekreci arginin vazopresinu a aldosteronu, stimuluje růst buněk hladkého svalstva cév. Dnes je RA systém dáván do souvislosti s behaviorálními a kognitivními funkcemi. Byla zjištěna též interakce mezi mozkovým RA systémem a neurotransmitery DA, NA a ACH (Brazsko et Wisniewski, 1990, Dwoskin et al., 1992, Culman et al., 1995).

AGT II má dva hlavní subtypy receptorů nacházejících se v mozku - AT1 a AT2. AT1 receptor je odpovědný zejména za aktivitu peptidů souvisejících s kardiovaskulární činností (Hogarty et al., 1992, Quadri et al., 1993, Veltmar et al., 1992). Receptory AT1 v krysím mozku jsou spjaty s regulací krevního tlaku a homeostází, nacházejí se v oblastech lamina terminalis, subfornical organ, median preotic nucleus, periventricular nucleus a dalších částech mozku. AT2 receptory se nalézají v oblasti inferior olive, locus coeruleus, v thalamus a subthalamus nuclei, amygdale a cerebellu (Obermüller et al.,1991, Song et al., 1992). Funkce tohoto receptoru není doposud zcela objasněna, zřejmě souvisí s uvolňováním vazopresinu, syntézou prostaglandinů nebo modulačními mechanizmy renálních funkcí. Doposud nebyly objasněny souvislosti mezi receptory AT1 a AT2 a kognitivními funkcemi (paměť a učení). AT1 receptory byly nalezeny na DA neuronech v substantia nigra a striátum.

AGT II je oktapeptid odvozený od svého prekurzorového proteinu - angiotensinogenu (AGT), který je štěpen reninem (EC 3.4.23.15) na neaktivní formu dekapeptidu AGT I. Tento peptid je přeměňován pomocí ACE (kináza II, EC 3.4.15.1.) na oktapeptid AGT II, který je dále degradován na AGT III a AGT IV. AGT mRNA byla identifikována pouze v astrocytech (Lynch et al., 1987, Stornetta et al., 1988), protein AGT byl zachycen imunohistochemicky také na neuronech (Thomas et al., 1988). ACE byla nalezena v neostriátu, substantia nigra, hypothalamu, ale i v jiných orgánech než je mozek, kde se nalézá cirkulující forma ACE. V menším množství se enzym nalézá na neuronových membránách (Ganong, 1993). ACE také degraduje bradykinin (inaktivuje vazodilataci) a hydrolyzuje neuroaktivní peptidy bazálních ganglií, substance P, neurotensiny, enkefaliny a jejich prekurzory (Skidgel et al., 1987).
Gen pro ACE byl in situ hybridizací lokalizován v oblasti 17q 22-24, je tvořen 26 exony a má délku 21 kb (Jeunemaitre et al., 1992). Jeho transkripcí vznikají dvě různé mRNA; mRNA většího, somatického typu ACE, vzniká z exonu 13 o délce 4,3 kb. Druhý typ menšího mRNA, testikulárního ACE, má délku 3 kb a vzniká z exonu 13-26 (Hubert et al., 1991). Nejstudovanějším polymorfizmem genu pro ACE se stal inzerčně/deleční polymorfizmus (I/D polymorfizmus). Ve vztahu k mozkovým funkcím byl polymorfizmus I/D ACE zkoumán od roku 1996. Byla zjištěna vyšší hladina frekvence alely D a genotypu DD u skupiny osob s kognitivní poruchou (Amouyel et al., 1996).

3.7. -174 C/G polymorfizmus genu pro interleukin 6 (IL-6)

Interleukiny jsou polypeptidy patřící do skupiny cytokinů. Cytokiny jsou velmi účinnými molekulárními strukturami, které mohou vyvolávat změny v buněčné proliferaci, diferenciaci a migraci, mohou stimulovat protilátkové i buněčné imunitní pochody. Jsou vystaveny na membráně buněk nebo bývají součástí extracelulární matrix. Stejně jako hormony jsou schopny působit prostřednictvím specifických receptorů umístěných na povrchu buněk (Arenberger et Obstová, 2001). Bylo zjištěno, že cytokiny hrají důležitou roli v CNS nejen v rámci imunitních procesů, ale také v regulaci endokrinního systému, regulaci vývoje a diferenciace neuronů a astrocytů, modulaci dopaminových, serotoninových, noradrenergních a cholinergních neurotransmisí. Sekrece cytokinů může být stimulována neurotransmitery. Existence cytokinových receptorů na povrchu neuronů napovídá, že cytokiny mají přímý vliv na neuronální funkce (Norris et Benveniste, 1993). Interleukiny jsou cytokiny tvořené leukocyty. Výraz interleukin zahrnuje jak

skutečnost, že tento cytokinin je tvořen leukocyty, tak také že ovlivňuje buněčné reakce leukocytů. K červnu roku 2001 bylo známo 23 interleukinů.

Interleukin-6 je produkován téměř všemi imunitními buňkami včetně pomocných, především stimulovanými T-lymfocyty, monocyty, makrofágy, fibroblasty a epiteliálními buňkami. Zvyšuje syntézu proteinů akutní fáze zánětu, podílí se také na diferenciaci B-lymfocytů a zvyšuje účinek IL-2 (Arenberger et Obstová, 2001). IL-6 podporuje též vylučování IgG v CNS a má stimulanční efekt na hypothalamo-hypofyzární systém (Frei et al., 1989, Maes et al., 1995). IL-6 stimuluje neurony k sekreci DA a posiluje dopaminové a serotoninové transmise v hipokampu a frontálním kortexu (Hama et al., 1991, Zalcman et al., 1994). Polymorfizmus genu pro IL-6 byl a stále je intenzivně zkoumán v mnoha různorodých studiích. Jedná se o studie alkoholizmu, psychických poruch jako je deprese, schizofrenie nebo skleróza multiplex, ale i o asociační studie týkající se hustoty kosti v přímé souvislosti na množství hormonů, které mohou souviset právě s tímto polymorfizmem.

Gen pro IL-6 byl lokalizován v oblasti 7p15-21. Jedním ze zkoumaných funkčních polymorfizmů genu IL-6 je G/C polymorfizmus v pozici -174 promotorové oblasti. Alela G tohoto polymorfizmu přibližně zdvojnásobuje transkripci IL-6 in vitro a zvyšuje plazmatické hladiny IL-6. Systémově podaný IL-6 u potkanů významně snižuje hladinu extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens (Song et al., 1999). Na druhou stranu aplikace IL-6 do hipokampu a prefrontálního kortexu zvyšuje serotoninovou a dopaminovou aktivitu. To přímo koreluje s nálezy u hyperkinetické poruchy: hypofunkční katecholaminové projekce do oblasti prefrontálního kortexu, relativní hypoaktivita kortikálního dopaminového systému s relativní hyperaktivitou striatálního fázického dopaminu. Znamenalo by to, že u hyperaktivních osob by alela C, a tím i nižší exprese a extracelulární hladina IL-6, mohla být příčinou vyšší hladiny dopaminu ve striátu a nižší dopaminové aktivity v prefrontálním kortexu. Je obdivuhodné, jak spolu tyto údaje korelují, nicméně musíme být ke spojení těchto informací zatím rezervovaní, protože spojujeme informace získané na člověku a na myších. Polymorfizmus -174 C/G genu pro IL-6 může ovlivňovat chování jako neuromodulátor nebo jako regulátor vývoje mozkové tkáně. Zvýšená exprese IL-6 v průběhu vývoje mozku související s lepším přežíváním dopaminových neuronů by mohla hrát protektivní roli v dispozicích k závislosti na alkoholu i v dispozicích k hyperkinetické poruše.

3.8. -330 T/G polymorfizmus genu pro interleukin 2 (IL-2)

Interleukin-2 (IL-2) je znám jako důležitý imunoregulační faktor. IL-2 je produkován aktivovanými T buňkami. Jeho základními funkcemi jsou stimulační funkce – stimulace T buněčné funkce, diferenciace, stimulace proliferace tymocytů, monocytů, oligodendrocytů a B buněk. IL-2 podporuje sekreci imunoglobulinu. V rámci poruch se IL-2 připisuje podíl na patologických poruchách leukémie (T-buněčná leukémie dospělých a lymfom, snižování imunity dospělých s věkem). IL-2 se zapojuje do celé kaskády dějů probíhajících v důsledku změny nebo nerovnováhy endokrinního nebo neurotransmiterového systému. Fakt, že systémy imunitní a endokrinní spolu vzájemně interagují je znám již poměrně dlouho. Na imunitních buňkách jsou distribuovány různé druhy receptorů pro hormony, které po jejich vazbě modulují imunitní funkce. Na buňkách a tkáních endokrinního systému byly zase identifikovány cytokinové receptory, které mohou modifikovat aktivitu endokrinního systému. Navíc leukocyty mohou za normálních i zánětlivých podmínek nebo po aktivaci neurotransmitery produkovat různé hormony, zatímco endokrinní buňky mohou za normálních nebo stresových podmínek produkovat různé cytokiny. Hormony a cytokiny jsou tak společným jazykem pro komunikaci mezi systémy endokrinním a imunitním.

IL-2 je rovněž důležitým neuromodulátorem v rámci centrální nervové soustavy. Při experimentech in vitro i in vivo bylo zjištěno, že IL-2 a jeho receptor IL-2R jsou obsaženy v mozku. IL-2 podporuje přežívání kultivovaných neuronů a prodlužování jejich neuritů, stimuluje proliferaci a zrání oligodendrocytů, ovlivňuje hypothalamo-hypofyzární systém. Bylo zjištěno, že IL-2 ovlivňuje chování a změny EEG spektra. Zdá se, že většina účinků IL-2 ovlivňuje systémy dopaminergní, noradrenergní a cholinergní, nikoli však systém serotonergní. Systémové injikování IL-2 významně zvyšuje obrat NA, DA v hypokampu a prefrontálním kortexu a redukuje uvolňování DA z nucleus accumbens. Injikace řezů striáta s IL-2 in vitro stimuluje uvolňování DA. V řezech hipokampu a frontálního kortexu IL-2 snižuje uvolňování ACH.

Cytokiny byly použity při léčení několika maligních chorob, neurodegenerativních onemocnění a karcinomů. Během léčby bylo zaznamenáno, že se objevuje mnoho neurologických a behaviorálních změn. IFN-alfa navíc oslabuje verbální paměť a motorickou koordinaci a způsobuje depresivní náladu, zatímco bylo zjištěno, že IL-1β použitých při léčbě některých druhů rakoviny způsobuje psychomotorické zpomalení a poruchy řeči. TNF-α je vysoce neurotoxické agens, u pacientů způsobuje významné neurobehaviorální změny, indukje přechodnou amnézii nebo afázii, dále mírný až střední deficit schopnosti udržet pozornost, verbální paměti a motorické koordinace. IL-2 naopak způsobuje agitovanost a paranoidní a agresivní chování.

Při použití farmakologických dávek bylo v pokusech se zvířaty pozorováno po podání cytokinů mnoho behaviorálních změn. Exogenní IL-1 navozuje horečku, prodlužuje spánek s pomalými vlnami, anorexii a chování podobné stresovému, což dokazuje snížená explorační a sociální aktivita. Po podání IL-1β vykazují také potkani ve vyvýšeném bludišti ve tvaru plus anxiosní chování jako je zkrácení času stráveného na otevřených ramenech bludiště. Podobně působí i TNF-α, který způsobuje anoxii. Naproti tomu IL-6 a IL-2 zvyšují behaviorální aktivitu aniž indukují stresové či anxiosní chování. Ve výsledcích experimentů studií zabývajících se účinky cytokinů na chování existuje nicméně mnoho nesrovnalostí v důsledku použití rozdílných dávek cytokinů, různých zvířecích druhů a způsobu podání. Nízká dávka IL-2 (5-50 IU) způsobuje u potkanů sedaci a spánek, zatímco IL-2 v dávce 4 x 10^3 IU výrazně zvyšuje aktivitu ve vyvýšeném bludišti ve tvaru plus a v testu „open field“. Srovnávací studie ukazují, že podání liposacharidu, endotoxinu nebo IL-1β redukují lokomotorickou aktivitu zvířat. Paralelně s tímto potlačeným chováním se zvyšují koncentrace 5-HT v hipokampu a hladina kortikosteronu v plazmě. Serotonergní, endokrinní a behaviorální změny jsou antagonizovány premedikací IL-1RA. IL-2 naopak zvyšuje aktivitu ve vyvýšeném bludišti ve tvaru plus, což negativně koreluje s uvolňováním dopaminu ze striáta. Významným mechanizmem, kterým cytokiny modulují chování, je tedy změna centrální neurotransmise a/nebo modulace endokrinních funkcí. Je možné, že změny v imunitním systému jsou zodpovědné za autodestrukci neuronů u různých poruch jako je Parkinsonova choroba nebo Alzheimerova demence (Song et Leonard, 2002). Pro studii ADHD byl zvolen -330 T/G polymorfizmus genu pro IL-2, který by mohl ovlivňovat hyperaktivní chování prostřednictvím imunitního systému.

3.9. -308 A/G polymorfizmus genu pro tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α)

Před mnoha lety byl mozek považován za uzavřený systém, který je od periferie naprosto oddělený pomocí hematoencefalické bariéry. Nedávné studie odhalily, že při neuropatologických poruchách mohou aktivované leukocyty bariéru přestupovat do CNS v daleko větším počtu. TNF-α přestupuje přes hematoencefalickou bariéru saturačním transportním systémem, IL-2 proniká naopak systémem nesaturačním. V hypothalamu i dalších oblastech mozku pak byly nalezeny receptory pro TNF-α i IL-2. Tyto receptory vážou cytokiny z periferie a pak je transportují do mozku. Vztah mezi periferními a centrálními cytokiny není zcela jasný, ale není vyloučeno, že některé cytokiny z periférie mohou přestoupit přes hematoencefalickou bariéru a spustit uvolňování centrálních cytokinů (Song et Leonard, 2002).

Gen pro TNF-α leží na 6. chromozomu v oblasti p21.3. Protein kódovaný tímto genem je multifunkčním prozánětlivým cytokinem, který je především produkován makrofágy. Podílí se na regulaci celé řady biologických procesů jako je buněčná proliferace, diferenciace, apoptóza, lipidový metabolizmus a koagulace. Samotná hladina TNF-α ovlivňuje permeabilitu hematoencefalické bariéry (Ohtsuki, 2004). Receptory pro tento cytokin se vyskytují v celém CNS na gliových buňkách i neuronech. Ovlivňuje glutamátovou transmisi např. ovlivněním exprese AMPA receptorů na synapsích. Také má úlohu v synaptické plasticitě (Pickering et al., 2005).
Studie na myších s vyřazeným genem pro TNF poukázaly na neuroprotektivní hodnotu tohoto cytokinu, myší embrya s vyřazeným genem pro TNF-α vystavená teratogenu vykazovala více malformací a výraznější apoptotický proces v mozku než myši s funkčním genem pro tento cytokin. Překvapivý závěr se vysvětluje působením TNF-α na nukleární faktor kappaB (Torchinsky et al., 2003). Určité receptory pro TNF-α indukují aktivaci nukleárního faktoru kappaB a jsou silně exprimovány ve vyvíjejícím se mozku myší v embryonálním stádiu, v oblastech, které obsahují neuronální i gliové prekurzorové buňky (Hisaoka et al., 2004, 2003). Studie vztahů mezi polymorfizmy tohoto genu a ADHD nebyly dosud prováděny.

3.10. Val66Met polymorfizmus genu pro brain-derived neutrofický faktor (BDNF)

BDNF patří do rodiny neutrofických proteinů, které jsou exprimovány v savčím mozku. Tyto proteiny hrají významnou roli ve vývoji, proliferaci, diferenciaci a přežívání dopaminergních neuronů vyvíjejícího se mozku. BDNF ovlivňuje mezineuronový přenos, vlastní neuronovou aktivitu i samotnou neurotransmisi (Lewin et Barde, 1996). Nálezy farmakologických studií poukazují na příbuznost mezi BDNF a ADHD (Meredith et al., 2002). Snížená produkce centrálního BDNF ve středomozkových oblastech mozku ADHD může hrát hlavní roli v patogenezi hyperkinetické poruchy (Tsai, 2007, Tsai, 2003).
Gen pro BDNF leží na 11. chromozomu v oblasti p13. Protein kódovaný tímto genem patří do rodiny neuronálních růstových faktorů. Nejčastěji studovaným polymorfizmem je single nucleotide polymorphism (SNP) Val66Met, záměna aminokyseliny methioninu (alela A) valinem (alela G). Role BDNF se zkoumá u různých psychických poruch (schizofrenie, deprese, demence). Je známo, že při chronickém stresu jeho hladina v mozku klesá, při léčbě antidepresivy naopak vzrůstá. Ve studiích na zvířatech se pozoruje antidepresivní účinek BDNF podobný účinku dlouhodobé léčby antidepresivy. To souvisí s narušenou neurogenezí v patogenéze depresivních

poruch (Filus et al., 2005). V maďarské studii s 258 probandy s depresí s nástupem v dětském věku bylo zjištěno, že toto onemocnění souvisí s alelou G genu pro BDNF (Strauss et al, 2005).
V souvislosti se schizofrenií bylo již provedeno více studií, které poukazují na pozměněné hladiny BDNF u schizofreniků ve srovnání s kontrolními soubory osob (Neves-Pereira et al., 2005, Rosa et al., 2006). V meta-analýze provedené na základě všech publikovaných studií zaměřených na schizofrenii byl zjištěn signifikantní rozdíl v genotypových frekvencích Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF v bělošské populaci (Naoe et al., 2007). Byly publikovány také pozitivní studie zaměřené na výzkum bipolární poruchy a BDNF (Lohoff et al., 2005, Neves-Pereira et al., 2002, Sklar et al., 2002, Geller et al., 2004, Muller et al., 2006).
Ve vztahu ke kognitivním funkcím bylo zjištěno, že zdraví dobrovolníci s alelou A tohoto genu mají o 11% menší objem hipokampu (Bueller et al., 2006). Spekulativní hypotéza Tsaie et al. (2003) předpokládá, že BDNF bude hrát roli v patogenéze ADHD, považované za neurovývojovou poruchu. Nejen antidepresiva, ale i stimulanty zvyšují hladinu BDNF v mozku a BDNF tak může souviset i s odpovědí na léčbu stimulanty. Je zajímavé, že myši s jednou knock-outovanou alelou tohoto genu jsou hyperfagické, obézní a hyperaktivní (Friedel et al., 2005).
V rodinné studii 341 probandů a jejich rodičů se zjistilo, že polymorfizmus genu pro BDNF souvisí s ADHD, když byla zjištěna preferenční transmise alely G v rodinách probandů (Kent 2005). Vztah mezi Val66Met polymorfizmem genu pro BDNF byl publikován také v case-control studii porovnávající ADHD probandy s kontrolním souborem dospělých osob (Lanktree et al. 2004).

3.11. Delta 32 polymorfizmus genu pro chemokinový receptor 5 (CCR-5)

Chemokiny jsou peptidy, které se účastní regulace zánětlivých procesů v tkáních a embryonálního vývoje. Chemokiny rozdělujeme podle struktury na CC- a CXC- chemokiny. Pro chemokiny existují v těle tzv. chemokinové receptory, které rozdělujeme na CC- a CXC- receptory, podle toho, které chemokiny se na ně vážou. CCR-5 receptor patří mezi chemokinové receptory CC- a jeho přirozenými agonisty jsou beta-chemokiny MIP-1 alfa, MIP-1 beta a RANTES. V Evropské populaci se frekvence delta 32 polymorfizmu genu pro CCR-5 vyskytuje v rozmezí 0,06-0,16 %, v Africe a Asii je frekvence této mutace téměř nulová.
Chemokinový receptor 5 hraje důležitou úlohu v ontogenezi mozku a intercelulární komunikaci v době embryonálního vývoje. Agonisté CCR-5 receptoru stimulují u embryonálních neuronů hladiny vápníku. CCR-5 receptory se nacházejí v neokortexu, hipokampu, bazálních jádrech,

thalamu, kmenu mozkovém a v mozečku. Exprese CCR-5 se v mozku zvyšuje signifikantně od narození do 9 měsíců věku. RANTES podporuje růst a přežívání astrocytů v předním mozku u lidí v prvém trimestru. Obecně lze říci, že chemokinová-cytokinová síť se rozhodujícím způsobem účastní vývoje mozku (Bakhiet et al., 2001, Westmoreland et al., 2002).
Delta 32 polymorfizmus genu pro CCR-5 je vlastně delece, které způsobuje zkrácení sekvence DNA i výsledného proteinu, který je následně degradován v endoplazmatickém retikulu a nedostane se na povrch buňky. Homozygoti DD nemají z tohoto důvodu funkční receptor CCR-5.

3.12. Asn40Asp polymorfizmus genu pro Mu opioidní receptor (Mu)

Opioidní receptory byly identifikovány na granulocytech, monocytech, lymfocytech a terminálních komplexech. Endogenně uvolněné opioidy zvyšují proliferaci lymfocytů, cytotoxicitu NK buněk a uvolňování cytokinů. Opioidní peptidy se zdají být dynamickými signalizačními molekulami které se tvoří v imunitním systému a jsou aktivními regulátory imunitní odpovědi. Receptory těchto peptidů na membránách imunocytů sdílejí vlastnosti s opioidními receptory na neuronech, včetně velikosti molekul, imunogenicity a užívání specifických intracelulárních signálních cest. Mechanizmus humorální imunosuprese navozené morfinem není tak jistý, ale účinky opioidů na imunitní systém je možno zvrátit naloxonem. In vitro má morfin supresivní vliv na generaci buněk tvořících protilátky proti SRBC. Když jsou granulocyty inkubovány s morfinem, je výrazně inhibována migrace, uvolňování superoxidu a agregace neutrofilů. Těmto změnám je též možno předejít premediakací naloxonem. Z těchto experimentů vyplývá, že noradrenalin, adrenalin, dopamin a opioidy jsou převážně imunosupresivní, zatímco acetylcholin je imunostimulační. Předpokládá se, že NA a ACH hrají v imunitní modulaci opačné úlohy, což je výhodné pro zachování rovnováhy v imunitních funkcích (Song et Leonard, 2002).
Biologický efekt endogenních opioidů, kterými jsou endorfiny, enkefaliny a dynorfiny, zprostředkovávají receptory δ, κ a μ, nověji označované jako receptory OP1, OP2 a OP3. A118G (nebo Asn40Asp) polymorfizmus genu pro Mu receptor způsobuje záměnu adeninu za guanin, což se v aminokyselinové sekvenci projeví záměnou aminokyseliny kyseliny asparagové za asparagin. Tato záměna mění strukturu výsledného receptoru, čímž by mohla mít prostřednictvím imunitního systému vliv na pozměněné chování jedince (Štaif, 2006).

4. Materiál a metodika

4.1. Výběr osob pro asociační studii

Při výběru osob do asociační studie byla dodržena základní kritéria, přičemž společné podmínky pro obě skupiny osob byly :

- mužské pohlaví (předpokládá se vliv estrogenů na patogenezi onemocnění)
- věk 7-13 let
- pokrevně nepříbuzné osoby
- česká národnost
- podpis informovaného souhlasu rodiče

Diagnóza hyperkinetické poruchy/ADHD byla provedena lékaři na základě desáté revize Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) a na základě čtvrté revize Diagnostického a statistického manuálu (DSM-IV). Do tohoto souboru osob byly zařazeny děti hospitalizované nebo ambulantně léčené pro hyperkinetickou poruchu na dětském oddělení Psychiatrické kliniky v Brně Bohunicích včetně detašovaného ambulantního pracoviště ve Fakultní dětské nemocnici v Černých polích, dále pak děti léčené v Dětské psychiatrické léčebně ve Velké Bíteši. Klinické pedopsychiatrické vyšetření probíhalo na jednotlivých pracovištích podílejících se na výzkumu a bylo zaměřeno k verifikaci již stanovené diagnózy hyperkinetické poruchy či ke stanovení této diagnózy *de novo*. Vyšetření se skládalo z diagnostického rozhovoru s rodiči či pečovateli a vyšetření dítěte. Vylučujícími kriterii (i pro kontrolní skupinu) byly vrozené genetické vady, epilepsie, mentální retardace, schizofrenie, pervazivní vývojové poruchy a závažná somatická onemocnění.

Kontrolní skupina byla tvořena chlapci ze základních škol brněnského regionu, zčásti dětmi z Fakultní dětské nemocnice s irelevantními somatickými diagnózami. Děti byly vybrány na základě Dotazníku pro rodiče (CPQ - Children Parent Questionare) a Dotazníku pro učitele (CTQ - Connors Teacher Rating Scale) a multidimensionální škály - hodnocení dětských symptomů (Stony Brook), v němž bylo jednoduchým způsobem zhodnoceno chování a jiné projevy dítěte. Dotazník CTQ byl vyplněn třídními učiteli žáků základních škol za souhlasu ředitele školy. Studie se zúčastnili žáci deseti brněnských základních škol. Jednalo se o o základní školy Svážná,

Sirotkova, Labská, Kotlářská, Nám. Svornosti, Jana Babáka, Botanická, Vevěří, Antonínská a Staňkova. Rodiče všech dětí vyplnili dotazník CPQ a podepsali souhlas s účastí ve studii, která je anonymní a je chráněna před nepovolanými osobami (v souladu s předpisy o uchování zdravotnické dokumentace). Ze studie byly vyloučeny všechny děti od nichž jsme nezískali informovaný souhlas rodiče. Vyloučeny byly rovněž děti, které v dotaznících nasbíraly více bodů než byla stanovena škála. Při získání biologického materiálu byly žákům předány krabičky s rozpustnými vitamíny Celaskon, jak bylo přislíbeno v oslovovacím dopise. V oslovovacím dopise byla rovněž uvedena možnost seznámení se s výsledky „genetického vyšetření". Všechny dokumenty (oslovovací dopis, souhlas rodiče se zařazením dítěte do studie, dotazníky pro rodiče i učitele) uvádím v příloze této práce.

4.2. Izolace DNA

DNA byla vyizolována komerčně dostupnými kity MoBio (MoBio Laboratories Inc., USA). Izolační kity využívají izolace za pomocí silika spin filtru (membrány) umístěného v kolonce.

4.2.1. Izolace DNA u hyperkinetického souboru osob

Po podepsání informovaného souhlasu zákonným zástupcem a diagnóze bylo každému probandovi odebráno 2,5 ml žilní krve do protisrážlivého roztoku (0,5 M EDTA) kvalifikovanou zdravotní sestrou nebo lékařem. Vzorek krve byl zamražen na -20°C a v termoboxu byl dopraven do laboratoře. Z krevních vzorků byla izolačním kitem UltraClean BloodSpin (MoBio, USA) izolována DNA, která posloužila jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR, polymerase chain reaction).

4.2.2. Izolace DNA u kontrolního souboru osob

Vzorky DNA od kontrolních osob nebyly získány izolací z krve. V počátcích studie jsme se snažili získat krevní vzorek i od kontrolních osob, nicméně se nám nepodařilo přesvědčit žáky, aby ve svém volném čase navštívili spolu s rodiči psychiatrické oddělení ve fakultní nemocnici a nechali si odebrat krevní vzorek za účelem výzkumu. Ke změně metodiky bylo přikročeno také z důvodu

možnosti odebírat vzorky pro DNA analýzu přímo v terénu, navíc bezbolestně. DNA byla tedy vyizolována ze stěru z ústní sliznice. Vzorky pro izolaci genomické DNA byly získány ze stěru vatovým tamponem z ústní sliznice provedené přímo ve školách. Ze vzorku (vatový tampon + 450 µl TD1 roztoku v 2,5 ml epp.) byla izolována DNA pomocí kitu UltraClean DNA Tissue (MoBio, USA).

Izolace DNA ze stěru pomocí kitu UltraClean DNA Tissue - vzorek byl vortexován přibližně 5 sekund, stočen a pufr s DNA byl přenesen do kolonky. Pak byl vzorek stočen při 14000 otáčkách/min. Kolonka byla vložena do nové mikrozkumavky, do kolonky bylo připipetováno 400 µl roztoku TD2. Mikrozkumavka s kolonkou byla centrifugována při 14000 otáčkách/min. Pak byl vzorek v kolonce přenesen do nové mikrozkumavky o objemu 2 ml a stočen při 14000 otáčkách. Kolonka byla opět přenesena do nové mikrozkumavky, bylo připipetováno 200 µl roztoku TD3 a vzorek byl centrifugován při 14000 otáčkách/min.

4.3. Amplifikace DNA

Tato metoda umožňuje mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro za použití DNA polymerázy a specifických primerů, což jsou oligonukleotidy komplementární ke 3´ konci amplifikovaného úseku DNA. Metoda je založena na principu replikace. K opakující se enzymové syntéze komplementárních řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3´-OH - konce směřují proti sobě (Rosypal et al., 2001). Jako primery se používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy o délce přibližně 15-30 bází, které jsou odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových řetězců na obou matricových řetězcích protisměrně. Při syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy, které se izolují z termofilních organizmů (např. Taq DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus a E. coli*). Polymerázy jsou odolné vysoký teplotám (95°C), při níž DNA denaturuje. Syntéza DNA probíhá opakovaně v mnoha cyklech.

Jeden cyklus PCR zahrnuje:

1) Denaturaci dvoušroubovice DNA (94-96°C).

2) Ochlazení a navázání primerů (2 oligonukleotidů) k odděleným DNA řetězcům (30-65°C).

3) Polymerační reakci, prodloužení primerů, aby produkovaly kopie, které slouží jako vzor v dalších cyklech (65-75°C).

Zjednodušeně lze říci, že amplifikační reakce zahrnuje vyštípnutí úseku DNA a jeho namnožení, aby mohl být detekovatelný. Reakce probíhá v zařízení označovaném jako amplifikátor neboli termocyklér (obrázek 11). V tomto zařízení se automaticky mění teplota v naprogramovaných časových intervalech. Přesné hodnoty teploty je nutné optimalizovat dle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů. Pro zahájení reakce postačuje velmi malé množství výchozích molekul DNA. V průběhu 20-30 cyklů dochází k expotenciálnímu nárůstu počtu úseků DNA ohraničených místy, k nimž se připojily primery. Každých 10 cyklů nám dává 1024 kopií navíc, 25 cyklů nám může dát až 33 x 10^6 kopií. Výsledným produktem reakce jsou fragmenty DNA definované délky, které jsou detegovány různými metodami (Rosypal, 1997).

4.4. Restrikční analýza

U některých amplifikátů následovala po amplifikaci úprava za pomocí restrikční analýzy. Úprava restrikční analýzou spočívá v připipetování specifického restrikčního enzymu k naamlifikovanému vzorku. Poté se nechá restrikční enzym působit po dobu několika hodin. Restrikční enzym provede rozštěpení amplifikátu na příslušnou délku, která je detekována na gelu. Jako příklad uvádím restrikční analýzu TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2:

10 µl amplifikátu bylo smícháno s 1 µl $TaqI^+$ pufru (MBI Fermentas, složení: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA), 8 U TaqI restrikčního enzymu (MBI Fermentas, Litva), který štěpí DNA v následující sekvenci: 5´- T↓CGA - 3´, 3´- AGC↑T - 5´. Pak následovala inkubace na vodní lázni při 65°C po dobu 5 hodin. Z amplifikovaného PCR produktu o délce 318 pb byly standartně odštěpeny fragmenty o 6 bp, 4 bp, čímž vznikl produkt o délce 308 bp. Dále může být tento fragment o délce 308 bp štěpen na další dva fragmenty o délce 180 bp a 128 bp.

4.5. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda založena na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem DNA jsou záporně nabité fosfátové skupiny. Rychlost molekul DNA (elektroforetická pohyblivost) na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Polyakrylamidový gel je tvořen polymerní strukturou s póry, kterými proniká DNA, která má záporný elektrický náboj a je obarvena barvivem pro snadnou detekci (Rosypal, 1997). Produkty získané amplifikací a restrikční analýzou byly detegovány pomocí gelové elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu (EliPhore, ELISABETH PHARMACON) barveném ethidium bromidem. Ethidium bromid se dobře vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení fluoreskuje. Elekroforéza probíhá po dobu 1-3 hodin při napětí 80-100 V v prostředí TBE pufru. Agarový gel s restrikčními fragmenty je poté prosvícen na transiluminátoru a vyfotografován digitálním fotoaparátem. V naší studii jsme v první části výzkumu využívali klasického transluminátoru a fotoaparátu na stativu (Olympus, CAMEDIA C-3030). Za úplné tmy byly pořízeny černobílé fotografie fragmentů, které na gelu po zapnutí transluminátoru světélkovaly. V druhé části výzkumu byl zakoupen gelový dokumentační systém (CLS-MICRODOC systém, CLEAVER SCIENTIFIC), který umožňoval vyfocení gelu i bez zatemnění místnosti a účinně chránil oči před nebezpečným UV-zářením.

4.6. Detekční systém PCR Real Time

V průběhu výzkumu byl zakoupen automatický detekční systém ABI7300 Real Time PCR System. Přístroj provádí současně amplifikaci i detekci současně, není tedy zapotřebí provádět analýzu pomocí elektroforézy. Tento systém umožňuje provádět nejen genotypizace, ale i kvantifikaci (kvantitativní PCR) v reálném čase. Využívá se zde několika možností detekce narůstajícího množství amplikonů. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují mezi báze DNA (např. Sybr Green), narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku. V současnosti je asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonukleázové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidu - próby (nejčastěji TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášečem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a

k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase. Přístroj ABI7300 (Applied Biosystems, Applera ČR) s vlastním počítačovým softwarem byl využit pro genotypizaci Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF a Asn40Asp polymorfizmu genu pro Mu.

4.7. HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

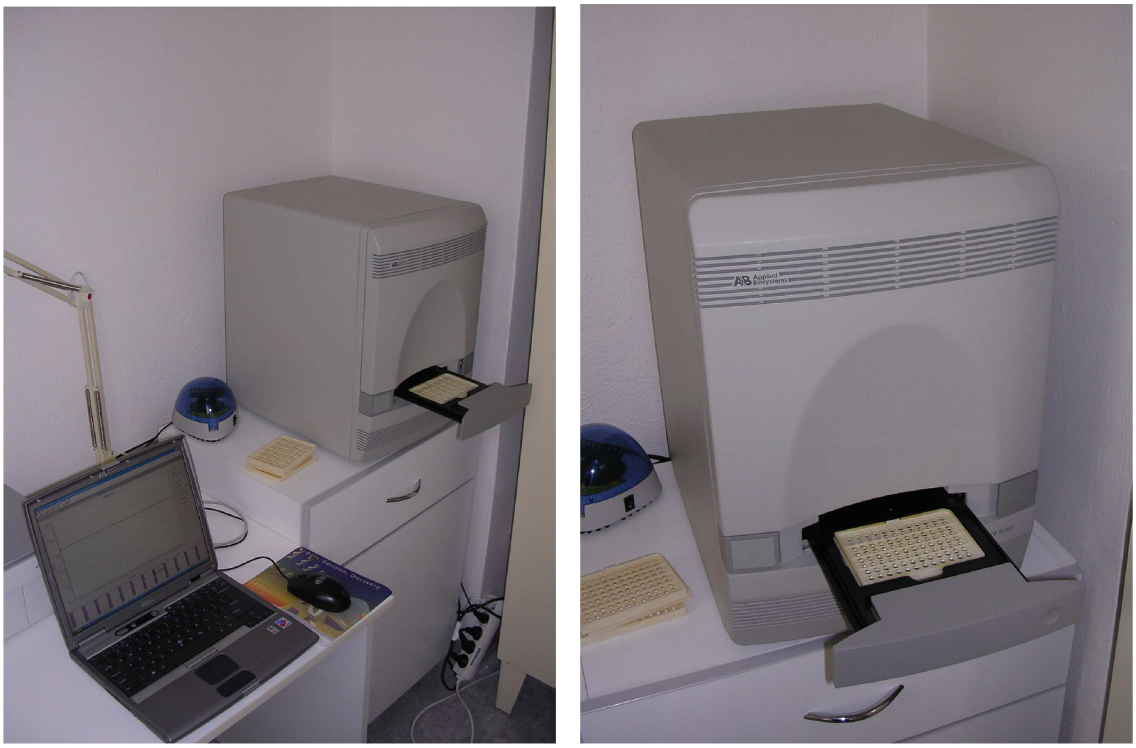
Jednou z metod, které lze využít pro automatickou detekci polymorfizmu DNA je metoda HPLC. Amplifikovaná DNA je buď nejprve štěpena restrikčním enzymem nebo v případě délkového polymorfizmu je amplifikovaná DNA přímo použita pro HPLC detekci. Metoda se obecně využívá k separaci látek rozpuštěných v roztoku, tj. používá se kapalný vzorek nepříliš těkavých látek. Metodu lze využít ke stanovení organických kyselin, polyaromatických uhlovodíků, bílkovin, sacharidů, vitamínů, léčiv, různých metabolitů. Princip metody spočívá v průchodu mobilní fáze pod tlakem (pumpa) náplňovou kolonou, která je naplněna stacionární fází (ocelová trubice dlouhá 5-35 cm, o vnitřním průměru 3-5 mm, vyplněná malými pevnými částicemi, které mají podle druhu kolony určité funkční skupiny). Jako nejvhodnější kolona pro HPLC detekci polymorfních úseků DNA je iontoměničová kolona plněna neporézní matricí, na které je kovalentně navázána fáze – diethylaminomethylové zbytky, které matrici udílejí kladný náboj. K vymytí DNA z kolony se používá gradient chloridu sodného, kdy chloridové ionty postupně vytěsní navázané molekuly DNA. Využití této metodiky výrazně usnadňuje, urychluje a zlevňuje detekci DNA polymorfizmů ve srovnání s detekcí na agarózových nebo polyakrylamidových gelech, navíc pak umožňuje vyloučení práce s toxickými látkami jako jsou ethidium bromid nebo akylamid. V naší studii jsme využili tohoto automatizovaného přístroje k detekci restrikčních fragmentů -330 T/G polymorfizmu genu pro IL-2. Detekce restrikčních fragmentů byla provedena metodou iontoměničové HPLC (kolona TSK-gel DEAE NPR). K vymytí DNA z kolony byl použit gradient chloridu sodného.

4.8. Obrázky použitého vybavení pro genotypizaci

Obrázek 10. Vany pro gelovou elektroforézu

Obrázek 11. Termocyklér Techne Touchgene Gradient

Obrázek 12. Automatický detekční systém PCR Real Time ABI7300



Obrázek 13. Automatizovaný detekční systém HPLC

4.9. Primery a reakční podmínky pro jednotlivé genotypizované polymorfizmy

4.9.1. Detekce TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci s následnou restrikční analýzou podle metodiky, kterou navrhl Grandy et al. (1993).

Pro PCR reakci TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2 byly použity primery:

- 5´ - CCG TCG ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA – 3´,
- 5´ - CCG TCG ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA – 3´ (Grandy et al., 1993).

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 62°C,
- extenze 30 s při 72°C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 318 bp.

Restrikční analýza TaqI A polymorfizmu byla prováděna v těchto krocích:

- 10 µl PCR produktu bylo smícháno s 1 µl TaqI+ pufru (MBI Fermentas, složení: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 0,1 mg/ml BSA) a dále s 8 U TaqI restriktázy (MBI Fermentas), která štěpí DNA v následující sekvenci:

5‘- T ↓C G A – 3´,

3´- A G C ↑ T – 5´.

- Poté následovala inkubace na vodní lázni při 65°C po dobu 5 hodin.

Z amplifikovaného PCR fragmentu o délce 318 bp byly standartně odštěpeny fragmenty o 6 bp, 4 bp, čímž vznikl produkt o délce 308 bp. Dále může být tento fragment o délce 308 bp štěpen na další dva fragmenty o délce 180 bp a 128 bp (Šerý, 1999).

Nosičem byl 2% agarózový gel (EliPhore) barvený ethidium bromidem. Gelová elektroforéza byla prováděna při 80 V po dobu jedné hodiny.
Výsledný gel s restrikčními fragmenty byl prosvícen transiluminátorem a vyfocen digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

- neštěpený produkt o délce 308 bp značil genotyp A1A1,
- dva fragmenty o délce 180 bp a 128 bp charakterizovaly genotyp A2A2,
- tři fragmenty o délce 308 bp, 180 bp a 128 bp identifikovaly genotyp A1A2,
- fragmenty o délce 6 bp, 4 bp nebyly na gelu detegovány pro svou malou velikost.

4.9.2. Detekce 40-bp VNTR polymorfizmu genu pro DAT1

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky Shinohara et al., 2004.

Pro PCR reakci 40-bp VNTR polymorfizmu genu pro DAT1 byly použity primery:

- 5´- tgt ggt gta ggg aac ggc ctg ag - 3´,
- 5´- ctt cct gga ggt cac ggc tca agg - 3´

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 60 s při 66°C,
- extenze 30 s při 72°C. Po 35 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C.

Gelová elektroforéza fragmentů byla provedena na 2 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 95 V po dobu dvou hodin. Výsledný gel byl prosvícen

transiluminátorem a vyfotografován gelovým dokumentačním systémem (CLS-MICRODOC systém, CLEAVER SCIENTIFIC).

4.9.3. Detekce Val158Met polymorfizmu genu pro COMT

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky, kterou popsali Jönsson et al. (1997).

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro COMT byly použity primery:

- 5´- ACT GTG GCT ACT CAG CTG TGC GCA TG – 3´,
- 5´- CCT TTT TCC AGG TCT GAC AA –3´ (Jönsson et al., 1997).

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 60°C,
- extenze 30 s při 72°C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 169 bp.

Následovala restrikční analýza:

- 15 µl PCR amplifikátu bylo smícháno s 1,3 µl pufru K (Promega, složení: 100 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M KCl; 100 mM $MgCl_2$) a dále s 5 U restrikčního enzymu Hsp92II (Promega), který štěpí DNA v následující sekvenci:

5´- C A T G ↓ - 3´,

3´- ↑ G T A C – 5´.

- Poté následovala inkubace na vodní lázni při 37°C po dobu 5 hodin.

Z amplifikovaného PCR fragmentu o délce 169 bp odštěpí restrikční enzym standardně úsek o délce 29 bp, čímž vznikne produkt o délce 140 bp. V případě, že se vyskytuje na této

sekvenci druhé restrikční místo pro enzym, odštěpí se fragment o délce 26 bp a vzniká produkt o délce 114 bp.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 2 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu jedné hodiny třiceti minut. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

- neštěpený fragment o délce 140 bp, který značil genotyp VV,
- fragment o délce 114 bp charakterizoval genotyp MM,
- fragmenty o délce 140 bp a 114 bp identifikovaly genotyp MV,
- fragmenty o délce 29 bp a 26 bp nebylo možné na gelu od sebe odlišit.

4.9.4. Detekce I/D polymorfizmu genu pro ACE

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky, kterou popsali Rigat et al. (1992).

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro ACE byly použity primery:

- 5´- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT – 3´,
- 5´- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA –3´ (Rigat et al. 1992).

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 59°C,

▪ extenze 30 s při 72°C. Po 32 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C.

Gelová elektroforéza amplifikovaných fragmentů byla provedena na 1,5 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu 45 minut. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

▪ 190 bp, který značil genotyp DD,

▪ 190 a 490 bp charakterizovaly genotyp ID,

▪ 490 bp znamenal genotyp II.

4.9.5. Detekce -174 G/C polymorfizmu genu pro IL-6

Detekce -174 G/C polymorfizmu byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie.

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro IL-6 byly použity primery:

▪ 5´- ACT TTT CCC CCT AGT TGT GTC TTG C – 3´,

▪ 5´- AGA ATG AGC CTC AGA CAT CTC CAG –3´

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

▪ 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,

▪ 1 µM každého z primerů,

▪ 0,5 mM dNTP,

▪ 100 ng genomové DNA,

▪ 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

▪ denaturace 30 s při 94°C,

▪ annealing 30 s při 60°C,

▪ extenze 30 s při 72°C. Po 35 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 204 bp.

Následovala restrikční analýza:

10 µl PCR amplifikátu bylo smícháno s 1 µl pufru Taq+ (Fermentas, Litva) a dále s 8 U restrikčního enzymu TaqI (Fermentas, Litva). Poté následovala inkubace na vodní lázni při 65°C po dobu 5 hodin.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 2 % agarózovém gelu (Eliphore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu jedné hodiny. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

- 204 bp, který značil genotyp CC,
- 180 bp (fragment o délce 24 bp na gelu nerozlišitelný) charakterizoval genotyp GG,
- 204 bp, 180 bp (a 24 bp) identifikovaly genotyp GC
- fragment 24 bp nebylo možné na gelu odlišit.

4.9.6. Detekce delta 32 polymorfizmu genu pro CCR-5

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky, kterou popsali Eugen-Olsen et al. (1997).

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro CCR-5 byly použity primery:

- 5´- CAA TGT GTC AAC TCT TGA CAG G – 3´,
- 5´- ACC TGC ATA GCT TGG TCC AAC C –3´ (Eugen-Olsen et al. (1997)).

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 55°C,

▪ extenze 30 s při 72°C. Po 40 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 1,5 % agarózovém gelu (Nusieve) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu dvou hodin třiceti minut. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

▪ 546 bp, který značil genotyp II,

▪ 514 bp charakterizoval genotyp DD,

▪ 546 bp a 514 bp znamenaly genotyp ID.

4.9.7. Detekce -308 polymorfizmu genu pro TNF alfa

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie.

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro TNF alfa byly použity primery:

▪ 5´- AGG CAA TAG GTT TTG AGG GGC AT – 3´,

▪ 5´- CGG GGA AAG AAT CAT TCA ACC AG –3´

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

▪ 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,

▪ 1 µM každého z primerů,

▪ 0,5 mM dNTP,

▪ 100 ng genomové DNA,

▪ 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

▪ denaturace 30 s při 94°C,

▪ annealing 30 s při 66°C,

▪ extenze 30 s při 72°C. Po 35 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C.

Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 284 bp.

Následovala restrikční analýza:

20 µl PCR amplifikátu bylo smícháno s 2 U restrikčního enzymu NcoI (Fermentas, Litva). Poté následovala inkubace na vodní lázni při 37°C po dobu 16 hodin.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 2 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu dvou hodin. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

- 264 bp, který značil genotyp 11,
- 264 bp a 284 bp charakterizovaly genotyp 12,
- 284 bp identifikoval genotyp 22

4.9.8. Detekce M235T polymorfizmu genu pro AGT

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky, kterou navrhli Russ et al. (1993).

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro AGT byly použity primery:

- 5´- CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C – 3´,
- 5´- CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T –3´

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 69°C,
- extenze 30 s při 72°C. Po 35 cyklech byla použita finální extenze 7 minut při 72°C.

Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 165 bp.

Následovala restrikční analýza:

15 µl PCR amplifikátu bylo smícháno s 10 U restrikčního enzymu PsyI (Fermentas, Litva). Poté následovala inkubace na vodní lázni při 37°C po dobu 16 hodin.

Gelová elektroforéza restrikčních fragmentů byla provedena na 2 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu dvou hodin třiceti minut. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován digitálním fotoaparátem Olympus (CAMEDIA C-3030).

Byly detekovány následující fragmenty:

- 165 bp, který značil genotyp MM,
- 141 bp a 165 bp charakterizovaly genotyp MT,
- 141 bp identifikoval genotyp TT.

4.9.9. Detekce A/G polymorfizmu v intronu 13 genu pro MAO-B

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky, kterou navrhli Garpenstrand et al. (2000).

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro MAO-B byly použity alelově specifické primery:

- pro alelu A primer 5´- CAC TGG CAA ATA GCA AAA GT – 3´,
- pro alelu G primer 5´- CAC TGG CAA ATA GCA AAA GC –3´
- a primer 5′- GGA TTT ACT TTG CAG GCA CC -3′

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 64°C,
- extenze 30 s při 72°C. Po 33 cyklech byla použita finální extenze 7 minut při 72°C.

Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 663 bp.

Gelová elektroforéza fragmentů byla provedena na 1,5 % agarózovém gelu (EliPhore) barveném ethidium bromidem při 80 V po dobu dvou hodin. Výsledný gel byl prosvícen transiluminátorem a vyfotografován gelovým dokumentačním systémem (CLS-MICRODOC systém, CLEAVER SCIENTIFIC).

4.9.10. Detekce -330 T/G polymorfizmu genu pro IL-2

Detekce tohoto polymorfizmu byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie.

Pro PCR reakci polymorfizmu genu pro IL-2 byly použity primery:

- I2-2 5´- caa gac tta gtg caa tgc aag – 3´,
- I2-5 5´- tca cat gtt cag tgt agt ttc a – 3´,

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala:

- 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 5 mM $MgCl_2$,
- 1 µM každého z primerů,
- 0,5 mM dNTP,
- 100 ng genomové DNA,
- 1 U Taq-Purple DNA polymerázy (Top-Bio, ČR).

Amplifikační reakce byla prováděna v termálním cykléru Techne Touchgene Gradient. Po počáteční denaturaci trvající 2,5 minuty při 94°C, byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech:

- denaturace 30 s při 94°C,
- annealing 30 s při 56,5°C,
- extenze 30 s při 72°C. Po 35 cyklech byla použita finální extenze 5 minut při 72°C. Celková délka amplifikovaného fragmentu byla 450 bp.

Následovala restrikční analýza:

20 µl PCR amplifikátu bylo smícháno s 5 U restrikčního enzymu Hsp92 II (Promega) a dále s 1,7 µl pufru K (Promega). Poté následovala inkubace na vodní lázni při 37°C po dobu 7 hodin.

Výsledný fragment (450 bp) se štěpí na 107 bp, 336 bp a 7 bp, v případě restrikčního místa – genotypu T (přítomnost tyminu v poloze minus 330) se amplifikát štěpí na 17 bp, 90 bp, 336 bp a 7 bp.

Detekce restrikčních fragmentů byla provedena metodou iontoměničové HPLC (kolona TSK-gel DEAE NPR). K vymytí DNA z kolony byl použit gradient chloridu sodného.

Byly detekovány následující fragmenty:

- 107 bp, který značil genotyp GG
- 107 bp a 90 bp charakterizovaly genotyp TG
- 90 bp identifikoval genotyp TT

4.9.11. Detekce polymorfizmu Asn40Asp (A118G) polymorfizmu genu pro Mu receptor

Detekce polymorfizmů byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie. K detekci byl využit automatizovaný systém PCR-REAL TIME ABI7300 (Applied Biosystems).

Pro RT-PCR reakci polymorfizmu A118G (Asn40Asp) genu pro Mu receptor byly použity primery:

- MU1 5´- cac gaa cgc cag caa ttg- 3´,
- MU2 5´- tga tcg tga tgg ccg tga t - 3´

K detekci alel byly využity tyto sondy s příslušnými sondami (oligonukleotidy s navázanou detekční barvičkou):

- Sonda A (Asn alela): název SMUA (3´- Eclipse a 5´- Yakima Yellow)

Sekvence 5´- ca ctt aga tgg caa cct gtc cga ccc a - 3´

- Sonda G (Asp alela): název SMUG (3´- Eclipse a 5´- FAM)

Sekvence 5´- cc cac tta gat ggc gac ctg tcc ga - 3´

Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala:

- 12,5 µL TaqManUniversal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 1 µM každého z primerů,
- 0,125 µM sondy SMUA,

- 0,075 µM sondy SMUG
- 100 ng genomové DNA

Reakce i detekce byla prováděna pomocí automatizovaného systému PCR-Real Time AB7300. Po počáteční denaturaci trvající 2 minuty při 50°C a 10 minutách při 95°C byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech 35x:

- denaturace 20 s při 95°C,
- annealing 20 s při 55°C,
- extenze 32 s při 72°C.

Odlišné genotypy byly detekovány pomocí navázaných sond, data byla uložena v systému počítače.

4.9.12. Detekce Val66Met (196G/A) polymorfizmu genu pro BDNF

Detekce polymorfizmů byla provedena podle metodiky navržené v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie a zakoupené od firmy Applied Biosystems: Assays-by-design^{sm} Service for SNP Genotyping Assays. K detekci byl využit automatizovaný systém PCR-REAL TIME ABI7300 (Applied Biosystems).

Pro RT-PCR reakci polymorfizmu 196G/A (Val66met) polymorfizmu genu pro BDNF byly použity primery:

- BDNF1 5´- tca aga ggc ttg aca tca ttg- 3´,
- BDNF2 5´- tca ttg ggc cga act ttc - 3´

K detekci alel byl využit TaqMan Universal PCR Master Mix a 40x Assay mix (Applied Biosystems).

Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala:

- 12,5µL TaqManUniversal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- 0,3 µL 40x Assay mix (Applied Biosystems)
- 100 ng genomové DNA

Reakce i detekce byla prováděna pomocí automatizovaného systému PCR-Real Time AB7300 (Applied Biosystems). Po počáteční denaturaci trvající 2 minuty při 50 °C a 10 minutách při 95°C byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech 40x:

- denaturace 15 s při 92°C,
- annealing 60 s při 60°C,

- extenze 32 s při 72°C.

Odlišné genotypy byly detekovány pomocí navázaných sond, data byla uložena v systému počítače.

4.10. Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem CSS Statistica (StatSoft Tulsa, USA). Byly vytvořeny kontingenční tabulky s počty osob pro jednotlivé genotypy sledovaných polymorfizmů, byly spočítány genotypové a alelické frekvence. Za pomocí Fisher exact testu byly prokázány nebo vyloučeny signifikantní rozdíly mezi alelickými frekvencemi mezi studovanými skupinami chlapců. V případě signifikantní závislosti bylo testováno Hardyho-Weinbergovo ekvilibrium za pomocí X^2 testu. Z křížových tabulek pro varianty dvou polymorfizmů se vycházelo při výpočtu vzájemné vazby polymorfizmů studovaných genů. Tento výpočet byl proveden speciálním programem vyvinutým na LF MU v Brně doc. RNDr. Znojilem, CSc. Za signifikantní výsledek sledovaných frekvencí polymorfizmů byla pokládána hladina pravděpodobnosti $p < 0,05$.

5. Výsledky studie

5.1. Celkové výsledky studie

Do studie bylo zahrnuto celkem 271 chlapců bělošské populace, 118 chlapců s hyperkinetickou poruchou a 153 chlapců kontrol, chlapci byli ve věku od 7 do 13 let (průměrný věk 9,97 roků). Před začleněním každého chlapce do studie předcházelo podepsání informovaného souhlasu jeho zákonným zástupcem. Všichni hyperkinetičtí chlapci podstoupili psychiatricko-psychologická vyšetření. Diagnóza ADHD byla stanovena v souladu s kritérii DSM-IV a mimo to, podle kriterií desáté revize Mezinárodní klasifikace nemocí byl diagnostikován typ hyperkinetické poruchy. Do souboru byli zařazeni chlapci hospitalizovaní nebo ambulantně léčení na dětském oddělení Psychiatrické kliniky v Brně Bohunicích a na detašovaném ambulantním pracovišti ve Fakultní dětské nemocnici v Černých polích. Dále byli do souboru zařazeni chlapci z Dětské psychiatrické

léčebny ve Velké Bíteši. Vylučujícími kritérii i pro kontrolní skupinu byly vrozené genetické vady, epilepsie, mentální. Skupina kontrolní byla vybrána na základě vyplnění učitelských a rodičovských dotazníků. Do kontrolního souboru byli zařazeni pouze chlapci, kteří dle dotazníků nevykazovali známky hyperaktivního chování. Chlapecký kontrolní soubor byl získán na deseti vybraných základních školách v Brně. Odběry vzorků byly provedeny v rozmezí let 2002 a 2005. V laboratoři byly provedeny genotypizace 12 polymorfizmů kandidátních genů. Ve studii byly porovnány alelické a genotypové frekvence mezi skupinou AHDH a skupinou kontrolní.

Statisticky významný rozdíl v alelických a genotypových frekvencích mezi skupinou chlapců s ADHD a kontrolní skupinou byl objeven pouze u TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2. Frekvence alely A1 byla u hyperkinetických dětí 0,26, u kontrolního souboru 0,15. Tento rozdíl je statisticky signifikantní ($p<0,003$). Také genotypové frekvence jsou statisticky signifikatně odlišné mezi studovanými soubory osob ($p<0,008$). Ve skupině hyperkinetických chlapců převládá genotyp A1A1 a genotyp A1A2, zatímco pro kontrolní souhlas je charakteristický genotyp A2A2, který byl objeven u 72% osob z kontrolního souboru.

Dále byl zjištěn statisticky významný výskyt atypických genotypů (9/11 a 10/11) polymorfizmu genu pro DAT1 u osob z ADHD souboru. Pomocí Fisher exact testu vyšel rozdíl statisticky významný s hladinou pravděpodobnosti $p<0,007$.

Marginální souvislost byla nalezena mezi ADHD a polymorfizmy genů pro TNF alfa a MAOB, nicméně vztah není statisticky významný. Co se týče testování vztahu interakcí studovaných polymorfizmů k ADHD, byl studován vztah interakcí vždy dvou polymorfizmů (tzv. dvojgenotypů) k ADHD. V této souvislosti nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami osob. Některé náznaky lze pozorovat, nicméně pro statisticky relevantní výpočet bude třeba studované soubory osob ještě rozšířit. Na druhou stranu byl objeven v rámci kontrolního souboru osob statisticky signifikatní vztah ($p<0,01$) mezi polymorfizmy genů pro MU receptor a DRD2. Genotyp AA/A2A2 se vyskytuje signifikantně častěji než jiné genotypy v rámci kontrolní skupiny. Lze sledovat také častější výskyt genotypu AA/A1A2 u osob s hyperkinetickou poruchou, než u kontrolního souboru. Tento rozdíl však není statisticky signifikantní.

5.2. Výsledky genotypizace jednotlivých polymorfních genů a jejich vztah k ADHD

5.2.1. TaqI A polymorfizmus genu pro DRD2

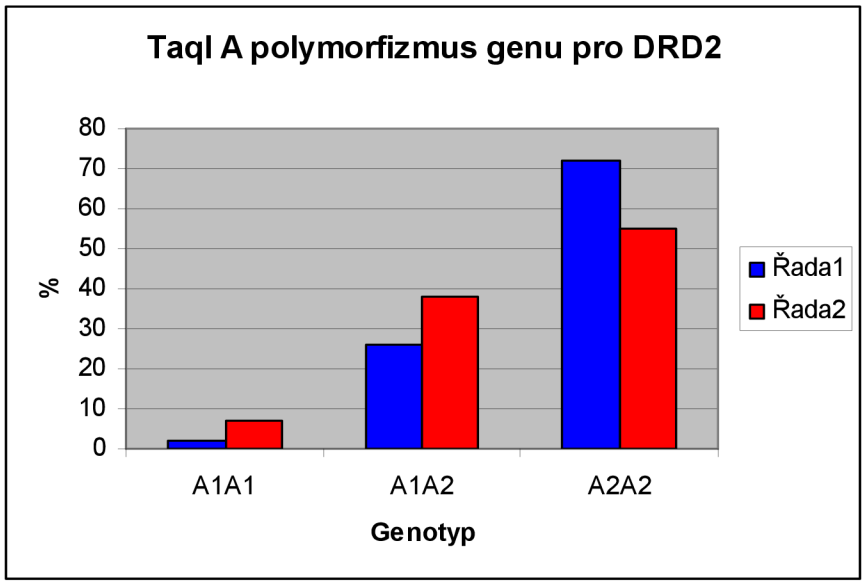
Výsledky genotypizace spolu s alelickými frekvencemi uvádí tabulka 11. V tabulce 11. jsou vypočítány hladiny pravděpodobností (p) za použití Fisher-exact testu (alelický jednostranný test) a X^2 testu po korekci na malé počty (genotypový rozdíl na malé počty – oboustranný test). Srovnání genotypových frekvencí (v %) tohoto polymorfizmu uvádí graf 1. Fisher-exact test prokázal signifikantní rozdíl (p=0,0026) ve frekvenci alely A1 mezi kontrolní skupinou (0,15) a skupinou hyperaktivních (0,26). Rovněž použitím metody X^2 testu byl nalezen signifikantní rozdíl v genotypových frekvencích TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2 mezi kontrolní skupinou a skupinou hyperaktivních chlapců (p=0,0075).

Tabulka 11. TaqI A polymorfizmus genu pro DRD2

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence* v %			Frekvence alely A1	F. exact p
	A1A1	A1A2	A2A2		A1A1	A1A2	A2A2		
K	3	40	110	153	2,0	26,1	71,9	0,15	0,002554
H	8	45	65	118	6,8	38,1	55,1	0,26	

* rozdíl v genotypových frekvencích p=0,0075

Graf 1. Genotypové frekvence (v %) Taq A polymorfizmu genu pro DRD2 mezi sledovanými skupinami



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

5.2.2. 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmus genu pro DAT1

Mezi všemi nalezenými genotypy byl nejhojněji zastoupen genotyp 10/10. Genotyp 10/10 byl nalezen u 66 ADHD chlapců (0,559) a 86 kontrol (0,562). V celkovém vzorku byl nalezen nízký výskyt 8-, 9- a 11-repetitivních alel. Mezi genotypizovanými vzorky nebyly detekovány 7-, 12- a 13-repetitivní alely. Genotypová frequence 3´UTR VNTR polymorfizmu genu pro DAT1 nevybočovala ve skupině ADHD a skupině kontrol z Hardy-Weinbergova equilibria. Za pomocí X^2 testu nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami ve frekvenci genotypu 10/10 (p=0.667). Nalezené genotypové frekvence jsou uvedeny v tabulce 12. Nejčastější nalézanou alelou byla 10-repetitivní alela (0,76). Výskyt alel byl ve shodě se studií zaměřenou na výzkum alelických frekvencí ve světových populacích (Mitchell et al., 2000). Ve studii nebyl nalezen významný rozdíl mezi skupinou ADHD chlapců a chlapci kontrolami: ve frekvenci 9-repetitivní alely (p=0,543) a 10-repetitivní alely (p=0,531). Ve studii byl nalezen signifikantní rozdíl ve frekvenci 11-repetitivní alely (p=0,0063) mezi skupinami chlapců. Oboustranný test rovněž prokázal signifikantní rozdíl v genotypových frekvencích 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1 mezi kontrolní skupinou a skupinou hyperaktivních (p=0,0127). Pro jednodušší statistické zpracování bylo provedeno rozdělení do tří skupin dle délky příslušných alel, jak bylo popsáno v několika předchozích zahraničních studiích zkoumajících tento polymorfizmus (Shinohara, 2004). Do první skupiny byli zařazeni chlapci mající ve svém genotypu zastoupené pouze repetitivní alely 8- a 9-. Jednalo se tedy o skupinu s „krátkým genotypem“, označeného jako SS (podle alel short/short). Ve druhé skupině byli zařazeni chlapci mající jednu alelu 8- nebo 9- a jednu alelu 10- nebo 11- (SL – short/long), ve třetí skupině pak byli chlapci mající pouze 10- a 11-repetitivní alely (značené LL – long/long). Ve studii nebyl potvrzen statisticky signifikantní rozdíl mezi genotypovými frekvencemi při rozdělení dle „délky“ genotypu do skupin SS, LS a LL (p=0,714) mezi ADHD skupinou chlapců a skupinou chlapců kontrol.

Tabulka 12. 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmus genu pro DAT1

Skupina	Počet osob s daným genotypem						Genotypové frekvence v %				
	9/9	10/10	9/10	10/11	Ostatní	Celkem	9/9	10/10	9/10	10/11	Ostatní
H	4	66	42	3	3	118	3,39	55,9	35,59	2,5424	2,54
K	6	86	61	0	0	153	3,92	56,2	39,87	0	0

Tabulka 13. Frekvence 9- a 10-repetitivní alely 3´ UTR VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1

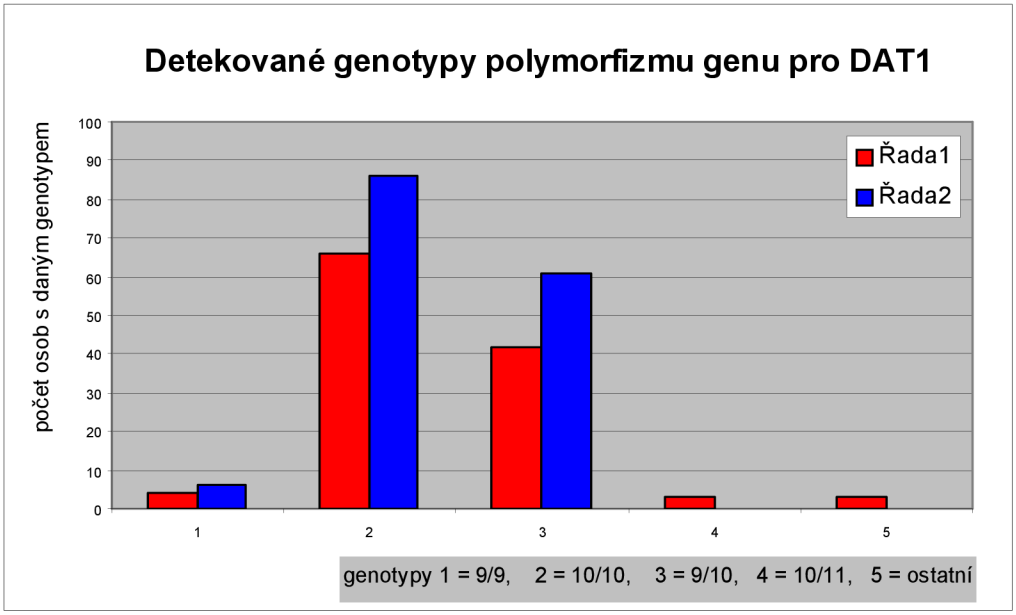
Skupina	Frekvence alely 9	Frekvence alely 10
H	0,21	0,59
K	0,24	0,58

Tabulka 14. Rozdělení dle „délky“ genotypu

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely L	F. exact p
	LL	LS	SS		LL	LS	SS		
K	85	62	6	153	55,6	40,5	3,9	0,76	0,36
H	69	45	4	118	58,5	38,1	3,4	0,78	

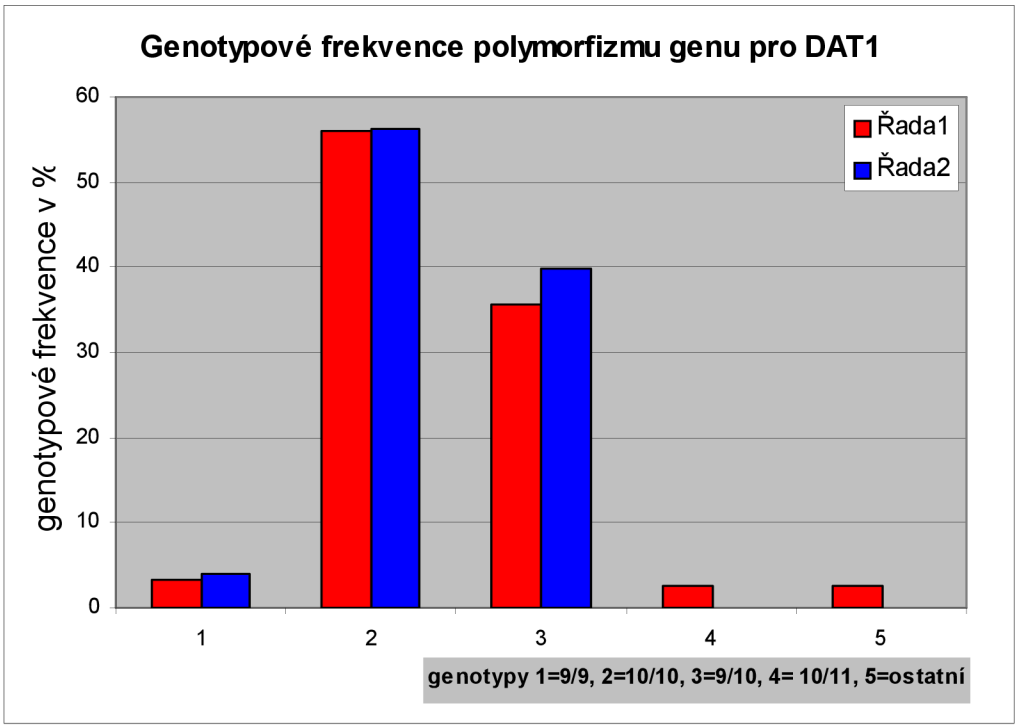
Nalezené genotypy byly pro statistickou analýzu rozděleny do podskupin:
genotyp LL – všechny genotypy mající pouze alely 10- a 11-, genotyp LS mající jednu alelu 10- nebo 11- a jednu alelu 8- nebo 9- (genotypy 8/10, 9/10, 9/11) a genotyp mající pouze 8- nebo 9-repetitivní alely (genotypy 8/8 a 9/9).

Graf 2. Detekované genotypy VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1



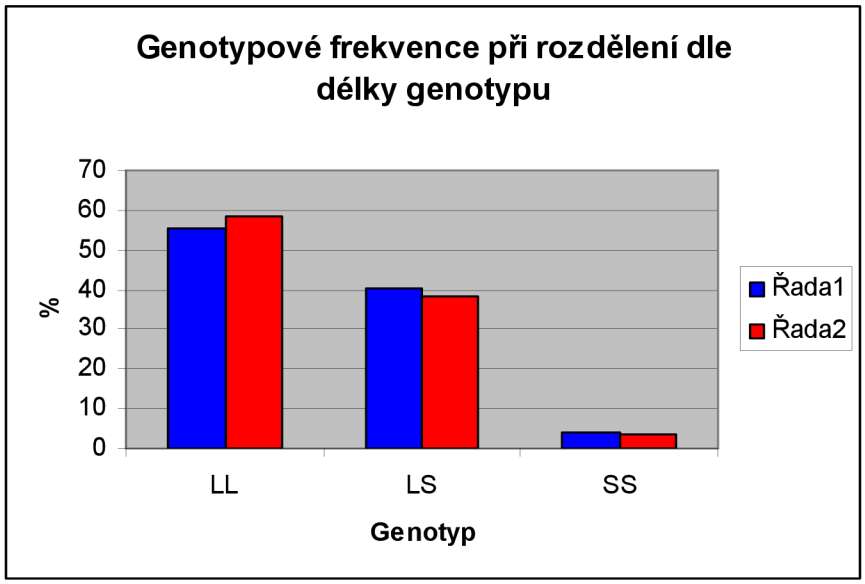
Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

Graf 3. Genotypové frekvence VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

Graf 4. Genotypové frekvence při rozdělení podle „délky“ genotypu



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

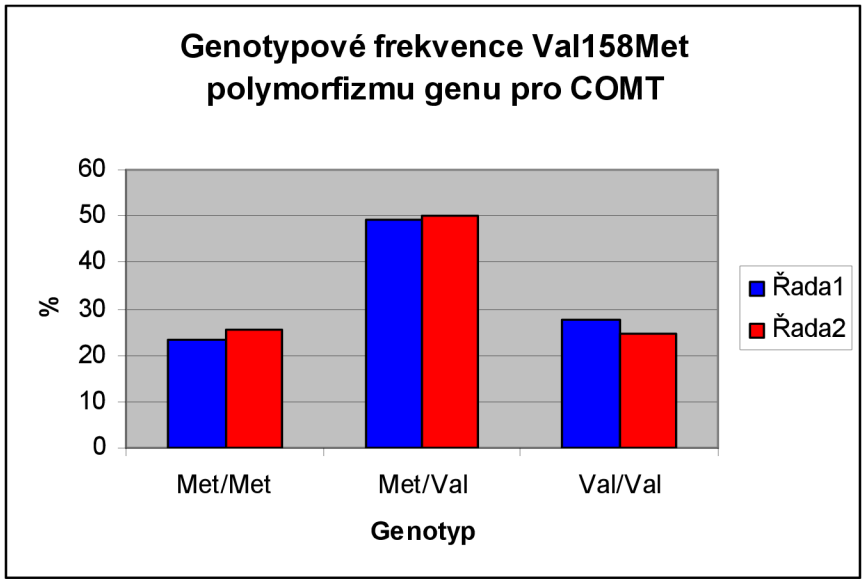
5.2.3. Val158Met polymorfizmus genu pro COMT

Alelické frekvence jsou spolu s hladinami pravděpodobností (p) srovnávaných skupin uvedeny v tabulce 15. Srovnání genotypových frekvencí (v %) Val158Met polymorfizmu genu pro COMT je patrné z grafu 4. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl (p=0,32) ve frekvenci alely Met mezi kontrolní skupinou (0,48) a skupinou hyperaktivních (0,50).

Tabulka 15. Val158Met polymorfizmus genu pro COMT

Skupina	Počet osob s daným genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely Met	F. exact p
	Met/Met	Met/Val	Val/Val		Met/Met	Met/Val	Val/Val		
K	36	75	42	153	23,5	49,0	27,5	0,48	0,32
H	30	59	29	118	25,4	50,0	24,6	0,50	

Graf 5. Genotypové frekvence (v %) Val158Met polymorfizmu genu pro COMT



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

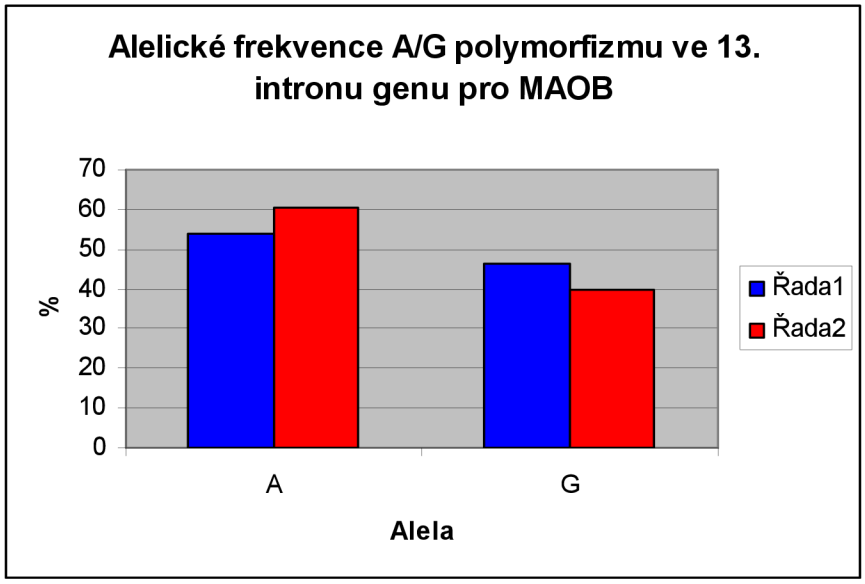
5.2.4. A/G polymorfizmus ve 13. intronu genu pro MAOB

Výsledky genotypizace uvádím v tabulce 16. Frekvence alely A polymorfizmu A/G ve 13. intronu byla ve skupině ADHD 0,60 a ve skupině chlapců kontroly 0,54. Fisher-exact test neprokázal statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami chlapců (p=0,087), rozdíl byl pouze numerický. A/G polymorfizmus ve 13. intronu genu pro MAOB se nepodílí na příčinách vzniku ADHD v České populaci.

Tabulka 16. Polymorfizmus A/G ve 13. intronu genu pro MAOB

Skupina	Počet osob s danou alelou		Celkem	Alelické frekvence v %		Frekvence alely A	F. exact p
	A	G		A	G		
K	82	70	152	53,9	46,1	0,54	0,087
H	71	47	118	60,2	39,8	0,60	

Graf 6. Alelické frekvence A/G polymorfizmu genu pro MAOB



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

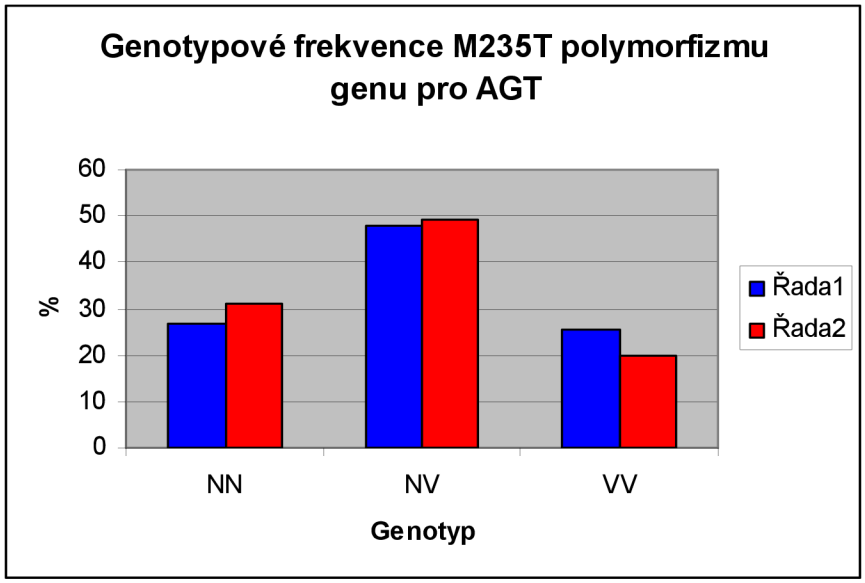
5.2.5. M235T polymorfizmus genu pro AGT

Ve skupině ADHD byl hojněji zastoupen genotyp NN. Ve skupině kontrolní se častěji vyskytoval genotyp VV. Vliv polymorfizmu M235T pro AGT ve vztahu k hyperkinetické poruše nebyl potvrzen (p=0,15). Získaná data jsou uvedena v tabulce 17 a grafu 7.

Tabulka 17. M235T polymorfizmus genu pro AGT

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely N	F. exact p
	NN	NT	TT		NN	NV	VV		
K	41	73	39	153	26,8	47,7	25,5	0,51	0,15
H	36	57	23	116	31,0	49,1	19,8	0,56	

Graf 7. Genotypové frekvence M235T polymorfizmu genu pro AGT



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

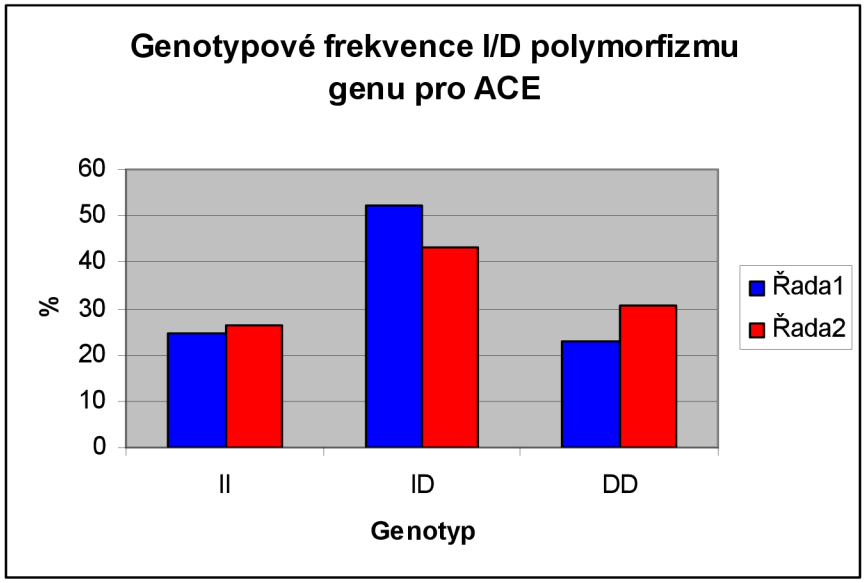
5.2.6. I/D polymorfizmus genu pro ACE

Výsledky genotypizace spolu s alelickými frekvencemi uvádí tabulka 18. Alelické frekvence jsou spolu s hladinami pravděpodobností (p) srovnávaných skupin uvedeny v tabulce 18. Srovnání genotypových frekvencí (v %) I/D polymorfizmu genu pro ACE je patrné z grafu 8. Fisher-exact test neprokázal signifikantní rozdíl (p=0,27) ve frekvenci alely I mezi kontrolní skupinou (0,51) a skupinou hyperaktivních (0,48). Oboustranný test též neprokázal signifikantní rozdíl v genotypových frekvencích I/D polymorfizmu genu pro ACE mezi kontrolní skupinou a skupinou hyperaktivních (p>0,05).

Tabulka 18. I/D polymorfizmus genu pro ACE

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely I	F. exact p
	II	ID	DD		II	ID	DD		
K	38	80	35	153	24,8	52,3	22,9	0,51	0,27
H	31	51	36	118	26,3	43,2	30,5	0,48	

Graf 8. Genotypové frekvence I/D polymorfizmu genu pro ACE



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

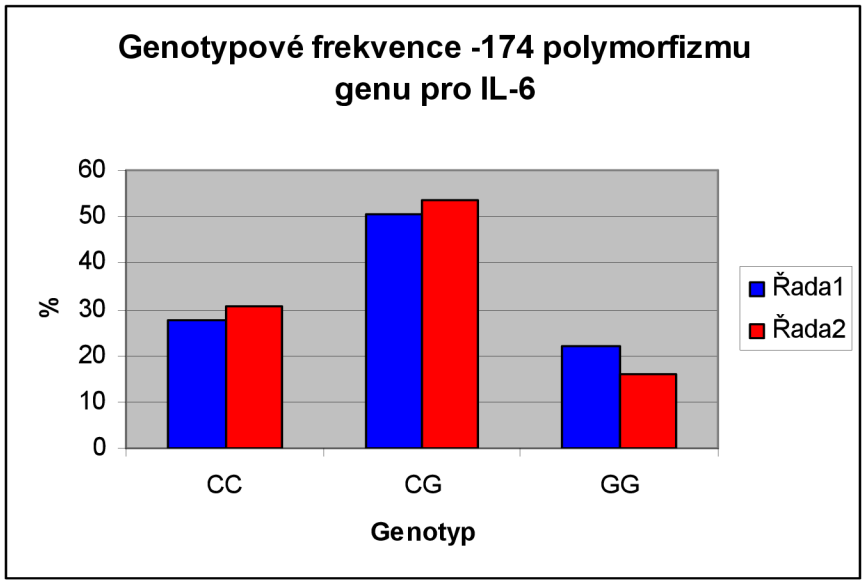
5.2.7. -174 C/G polymorfizmus genu pro IL-6

Výsledky genotypizace spolu s alelickými frekvencemi uvádí tabulka 19. Alelické frekvence jsou spolu s hladinami pravděpodobností (p) srovnávaných skupin uvedeny v tabulce 19. Srovnání genotypových frekvencí (v %) tohoto polymorfizmu mezi sledovanými polymorfizmy je patrné z grafu 3. Fisher-exact test neprokázal signifikantní rozdíl (p=0,16) ve frekvenci alely C mezi kontrolní skupinou (0,53) a skupinou hyperaktivních (0,57).

Tabulka 19. -174 C/G polymorfizmus genu pro IL-6

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely C	F. exact p
	CC	CG	GG		CC	CG	GG		
K	42	77	34	153	27,5	50,3	22,2	0,53	0,16
H	36	63	19	118	30,5	53,4	16,1	0,57	

Graf 9. Genotypové frekvence -174 polymorfizmu genu pro IL-6



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

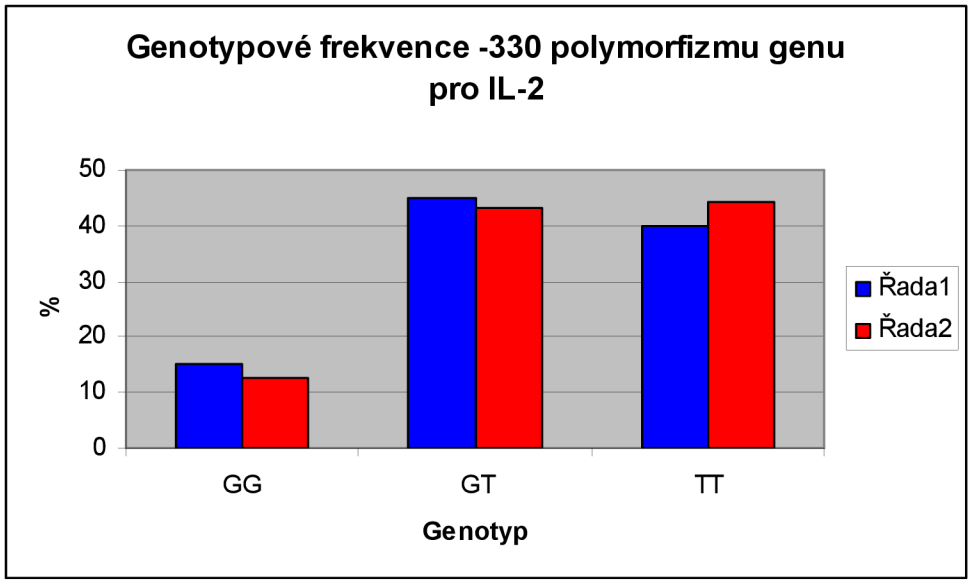
5.2.8. -330 T/G polymorfizmus genu pro IL-2

Výsledky genotypizace spolu s alelickými frekvencemi uvádí tabulka 20. Alelické frekvence jsou spolu s hladinami pravděpodobností (p) srovnávaných skupin uvedeny v tabulce 20. Srovnání genotypových frekvencí (v %) tohoto polymorfizmu mezi sledovanými polymorfizmy je patrné z grafu 10. Fisher-exact test neprokázal signifikantní rozdíl (p=0,24) ve frekvenci alely G mezi kontrolní skupinou (0,38) a skupinou hyperaktivních (0,34).

Tabulka 20. -330 polymorfizmus genu pro IL-2

Skupina	Počet osob s daným genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely G	F. exact p
	GG	GT	TT		GG	GT	TT		
K	22	65	58	145	15,2	44,8	40,0	0,38	0,24
H	13	45	46	104	12,5	43,3	44,2	0,34	

Graf 10. Genotypové frekvence -330 T/G polymorfizmu genu pro IL-2



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

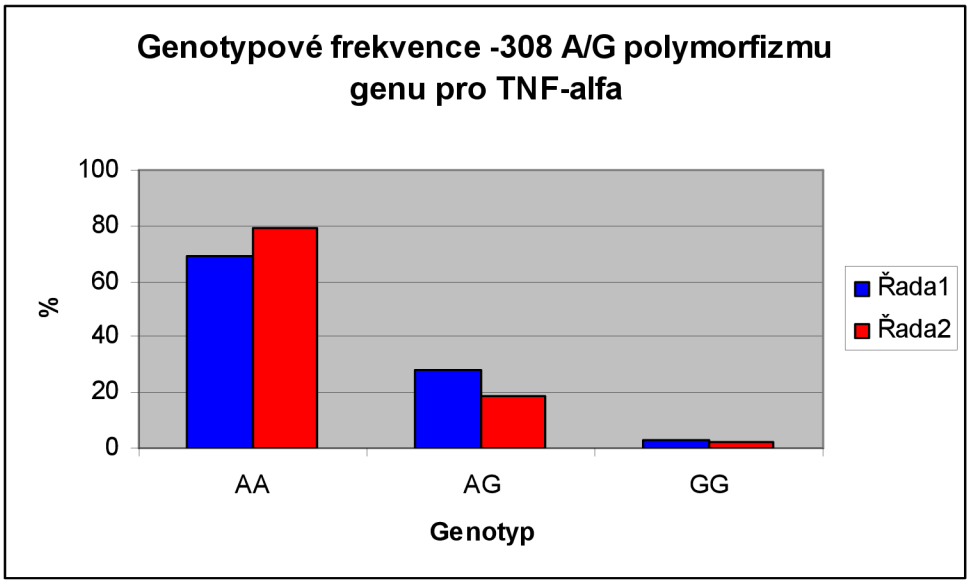
5.2.9. -308 A/G polymorfizmus genu pro TNF-α

Genotyp GG se vyskytoval velmi vzácně v obou studovaných skupinách. Ve skupině kontrolní byl genotyp GG nalezen u 4 chlapců a ve skupině ADHD pouze u 3 chlapců. Ve skupině hyperkinetiků byl obecně hojněji zastoupen genotyp AA. Vliv polymorfizmu -308 pro TNF-α ve vztahu k hyperkinetické poruše nebyl potvrzen (p=0,073). Získaná data jsou uvedena v tabulce 21. a grafu 11.

Tabulka 21. -308 A/G polymorfizmus genu pro TNF alfa

Skupina	Počet osob s daným genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely 1	F. exact p
	AA	AG	GG		AA	AG	GG		
K	106	43	4	153	69,3	28,1	2,6	0,83	0,073
H	93	22	3	118	78,8	18,6	2,5	0,88	

Graf 11. Genotypové frekvence -308 A/G polymorfizmu genu pro TNF-alfa



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

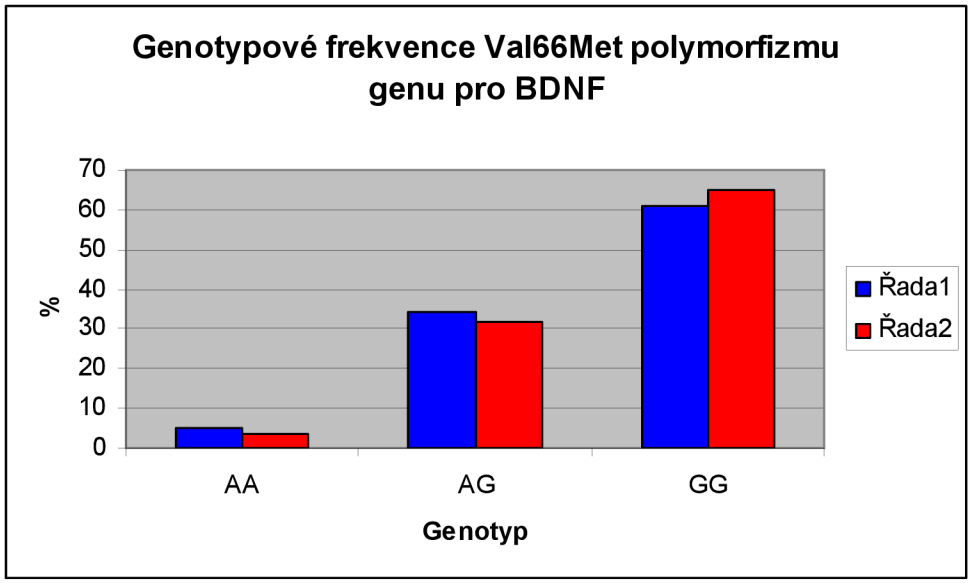
5.2.10. Val66Met polymorfizmus genu pro BDNF

Výsledky genotypizace spolu s alelickými frekvencemi uvádí tabulka 22. V tabulce 22. jsou vypočítány hladiny pravděpodobností (p) za použití Fisher-exact testu (alelický jednostranný test). Srovnání genotypových frekvencí (v %) tohoto polymorfizmu uvádí graf 12. Fisher-exact test neprokázal signifikantní rozdíl (p=0,24) ve frekvenci alely A mezi kontrolní skupinou (0,22) a skupinou hyperaktivních chlapců (0,19).

Tabulka 22. Val66Met (196 G/A) polymorfizmus genu pro BDNF

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely A	F. exact p
	AA	AG	GG		AA	AG	GG		
K	8	52	93	153	5,2	34,0	60,8	0,22	0,24
H	4	36	74	114	3,5	31,6	64,9	0,19	

Graf 12. Genotypové frekvence Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

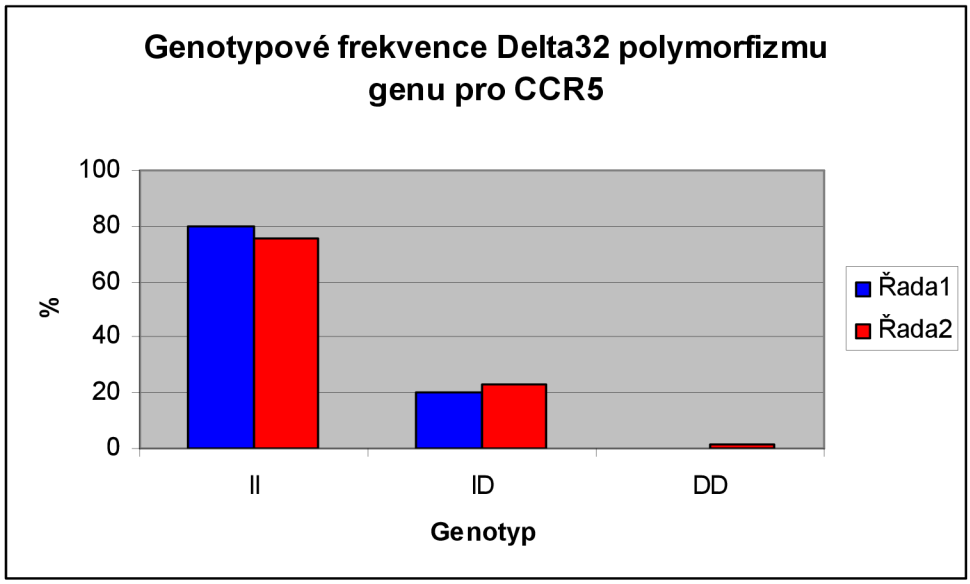
5.2.11. Delta 32 polymorfizmus genu pro CCR-5

U Delta 32 polymorfizmu genu pro CCR-5 byl prokázán velmi malý výskyt delečního genotypu DD v české populaci. Tento nízký výskyt delečního genotypu DD je v souladu s ostatními publikacemi. Ve skupině hyperaktivních byl tento vzácný genotyp nalezen u 2 chlapců. Naopak jsme ve studii potvrdili, že převážná část české populace je nositelem inzerčního genotypu II. Ve studii nebyla prokázána žádná souvislost mezi Delta 32 polymorfizmem genu pro CCR-5 a hyperkinetickou poruchou (p=0,096).

Tabulka 23. Delta 32 polymorfizmus genu pro CCR-5

Skupina	Počet osob s daným Genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely I	F. exact p
	II	ID	DD		II	ID	DD		
K	121	31	0	152	79,6	20,4	0,0	0,90	0,096
H	89	27	2	118	75,4	22,9	1,7	0,87	

Graf 13. Genotypové frekvence Delta32 polymorfizmu genu pro CCR-5



Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

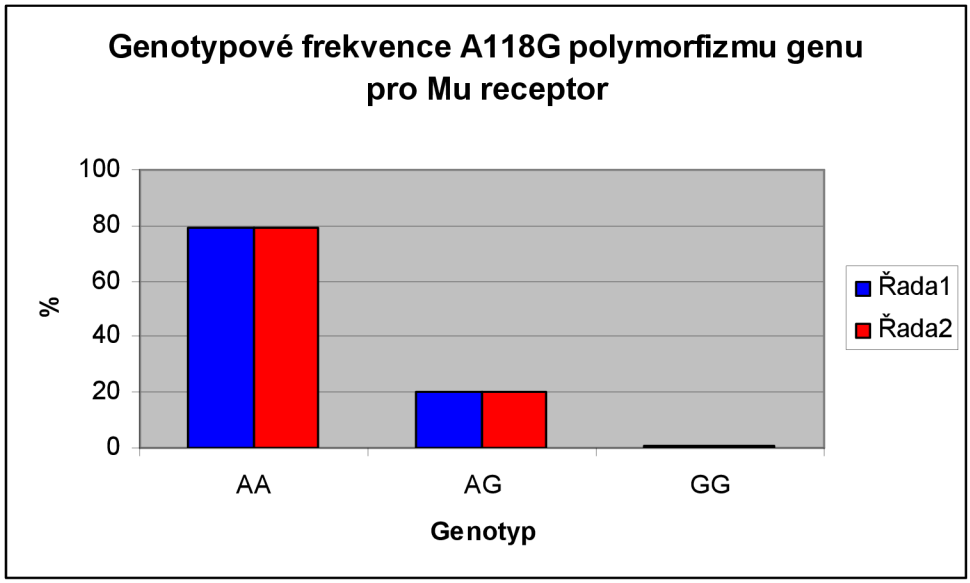
5.2.12. A118G polymorfizmus genu pro Mu opioidní receptor

Alelické frekvence jsou spolu s hladinami pravděpodobností (p) srovnávaných skupin uvedeny v tabulce 24. Srovnání genotypových frekvencí (v %) tohoto polymorfizmu mezi sledovanými polymorfizmy je patrné z grafu 14. Fisher-exact test neprokázal signifikantní rozdíl (p=0,53) ve frekvenci alely A mezi kontrolní skupinou (0,89) a skupinou hyperaktivních (0,89). V obou studovaných skupinách byla alela A zastoupena stejně. Genotyp GG byl v obou skupinách detekován pouze u dvou vzorků.

Tabulka 24. A118G polymorfizmus genu pro Mu receptor

Skupina	počet osob s daným genotypem			celkem	genotypové frekvence v %			frekvence alely A	F. exact p
	AA	AG	GG		AA	AG	GG		
K	121	31	1	153	79,1	20,3	0,7	0,89	0,53
H	90	23	1	114	78,9	20,2	0,9	0,89	

Graf 14. Genotypové frekvence A118G polymorfizmu genu pro Mu receptor

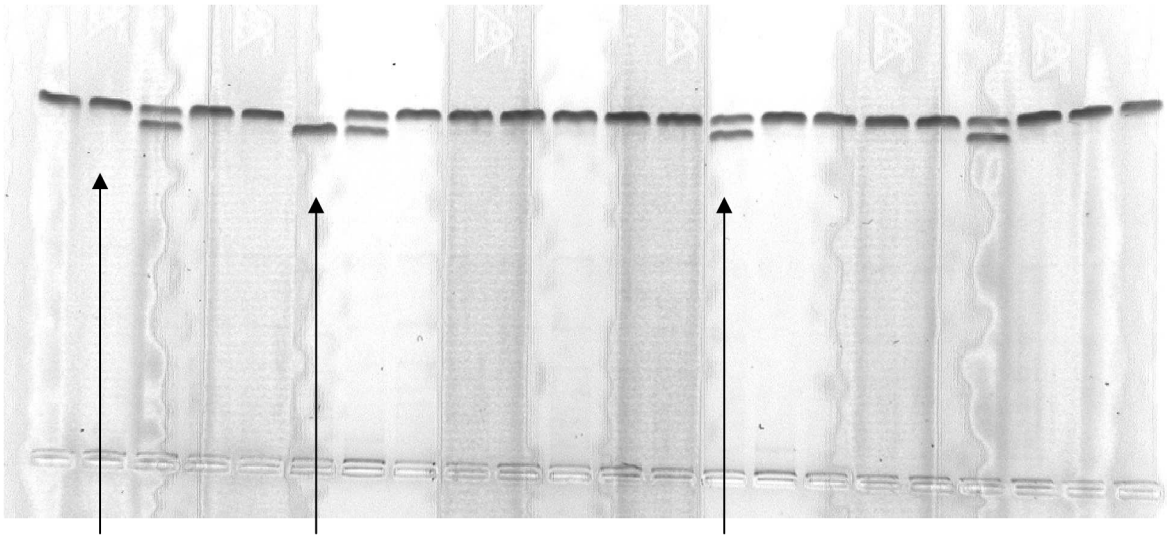


Modře (řada 1): kontroly, červeně (řada 2): hyperkinetičtí chlapci

5.3. Vybrané fotografie detekovaných genotypů

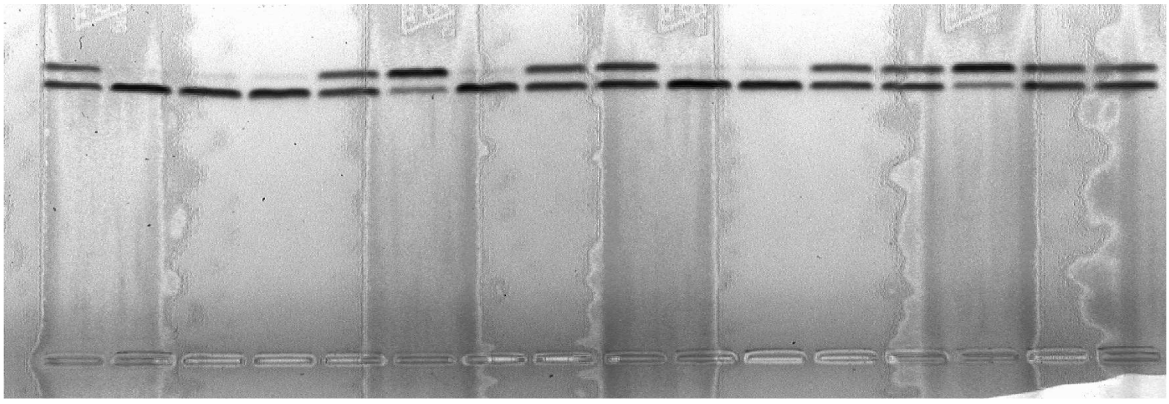
Nalezené genotypy vybraných zkoumaných polymorfních genů byly detekovány na agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. Výsledné černobílé fotografie byly vyfoceny fotoaparátem Olympus C-3030, který byl umístěn na speciálně zhotoveném stativu pro fotografování agarózových gelů pod UV světlem v zatemněné místnosti nebo za pomocí gelového dokumenačního systému. Fotografie gelů pro jednotlivé detekované polymorfizmy jsou si často velmi podobné, proto uvádím pouze vybrané fotografie několika z nich.

Obrázek 14. -308 polymorfizmus genu pro tumor nekrotizující faktor alfa

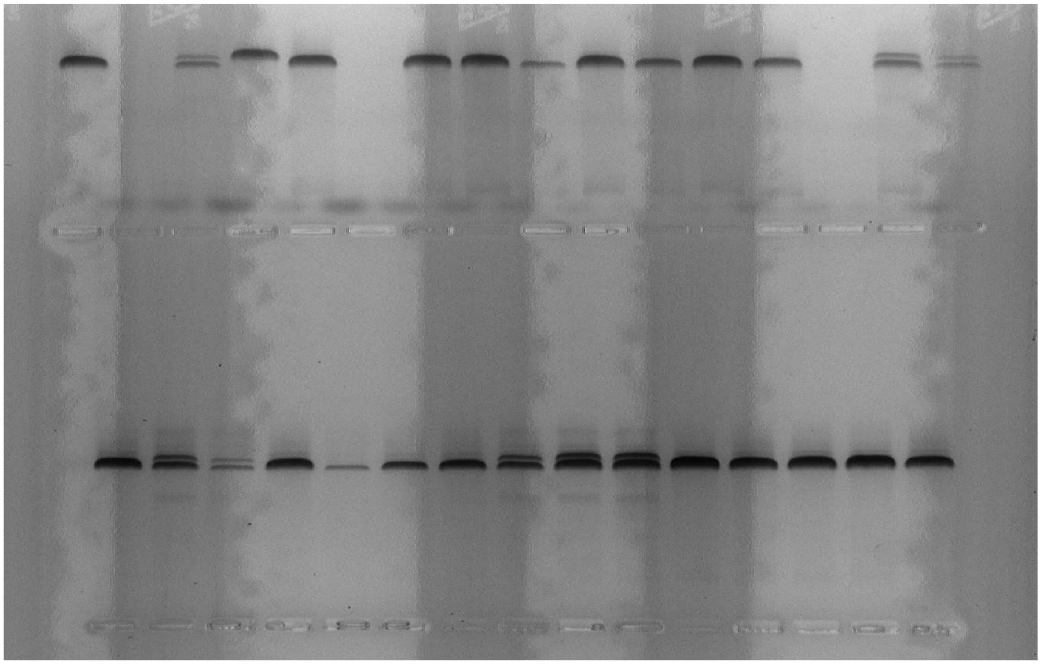


genotyp11 genotyp 22 (homozygot) genotyp 12 (heterozygot)

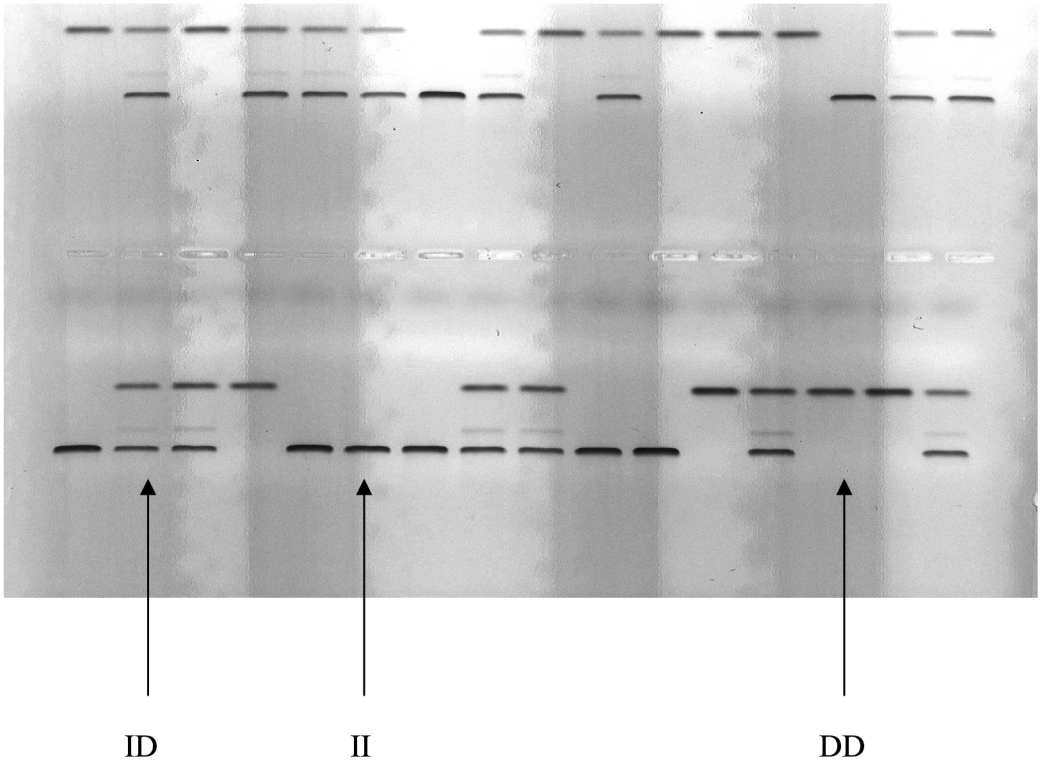
Obrázek 15. M235T polymorfizmus genu pro angiotensinogen



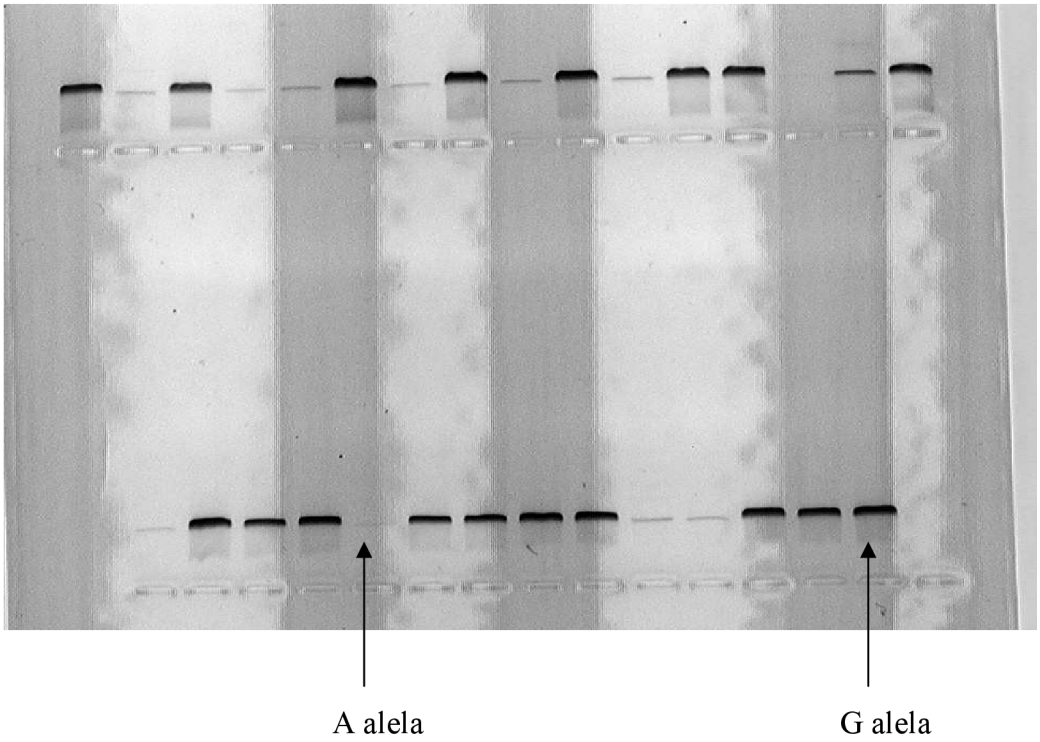
Obrázek 16. Delta 32 polymorfizmus genu pro chemokinový receptor 5



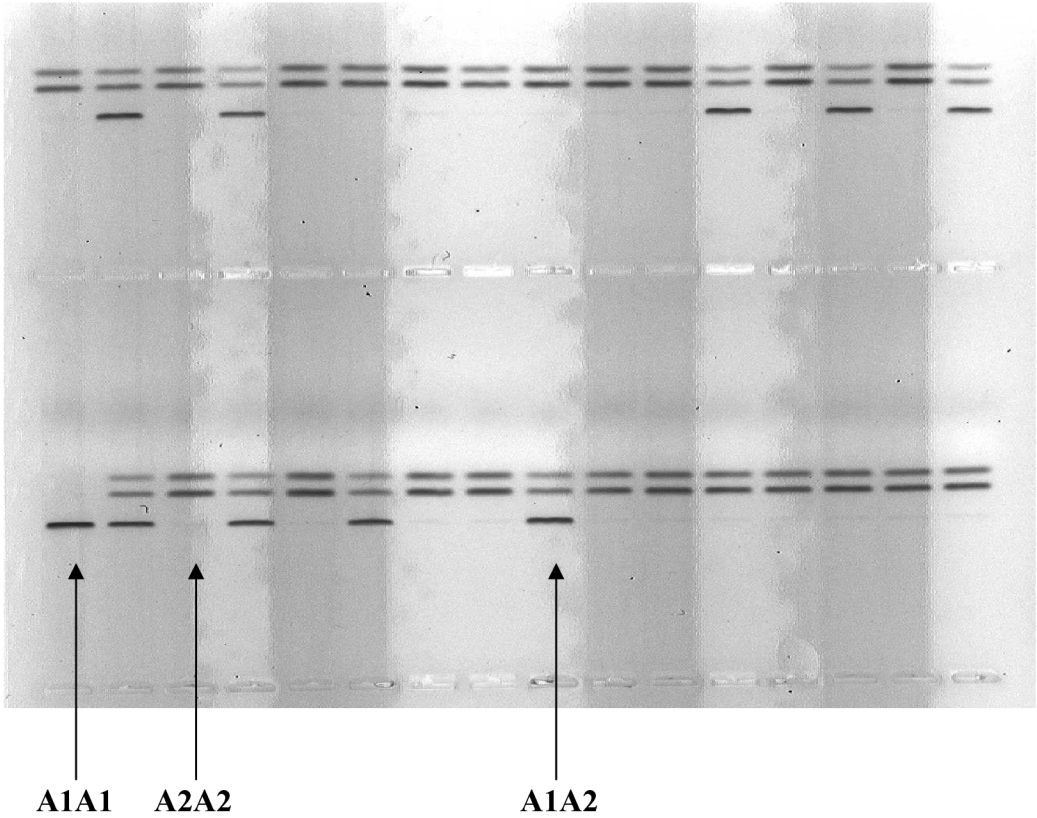
Obrázek 17. I/D polymorfizmus genu pro angiotensinkonvertázu



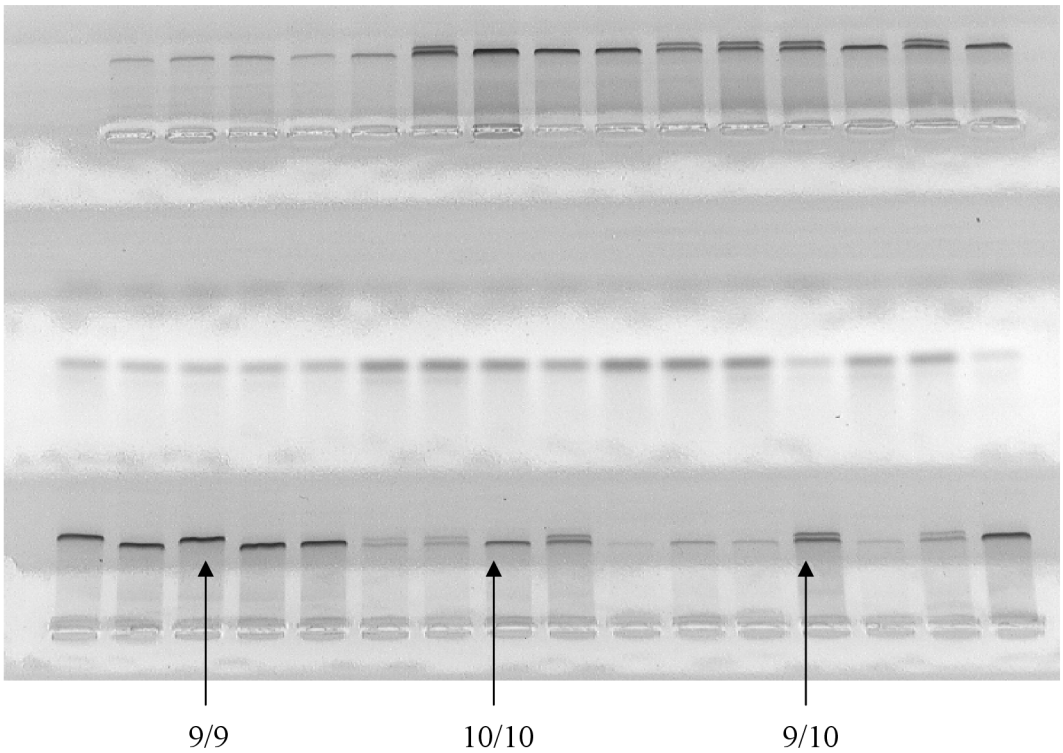
Obrázek 18. A/G polymorfizmus ve 13. intronu genu pro monoaminoxidázu B



Obrázek 19. TaqI A polymorfizmus genu pro dopaminový receptor D2



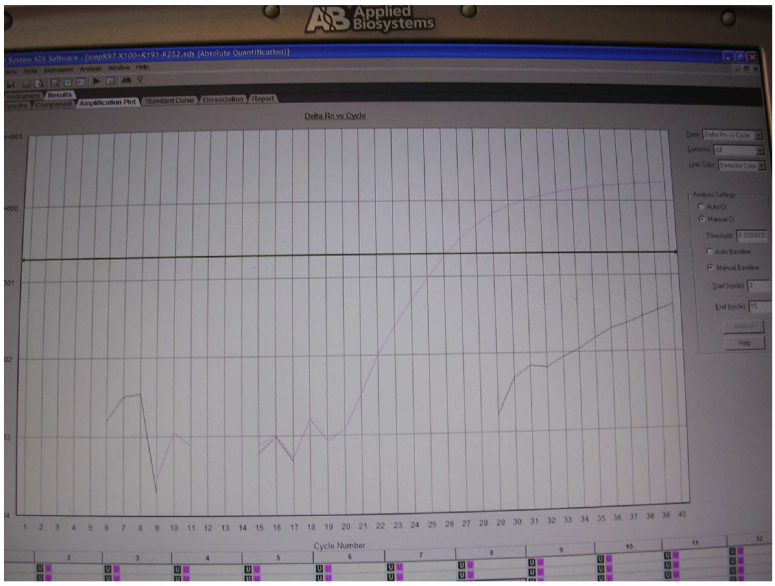
Obrázek 20. 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmus genu pro DAT1



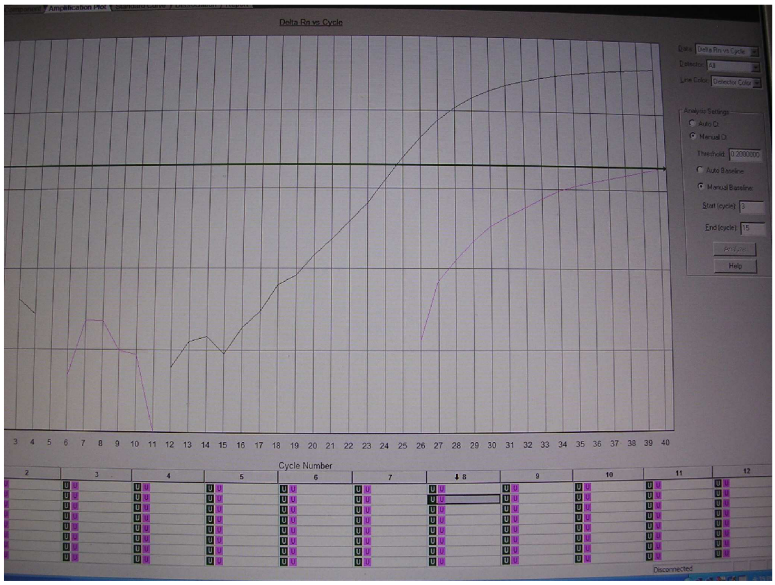
5.4. Detekční křivky genotypů získané za pomocí metody Real Time PCR

Za pomocí automatické detekce pomocí automatizovaného systému RT-PCR byly detekovány výsledky pro Val66Met polymorfizmus pro BDNF a Asn40Asp polymorfizmus genu pro μ opioidní receptor (Mu). Na obrázku můžete vidět detekční křivky pro jednotlivé genotypy.

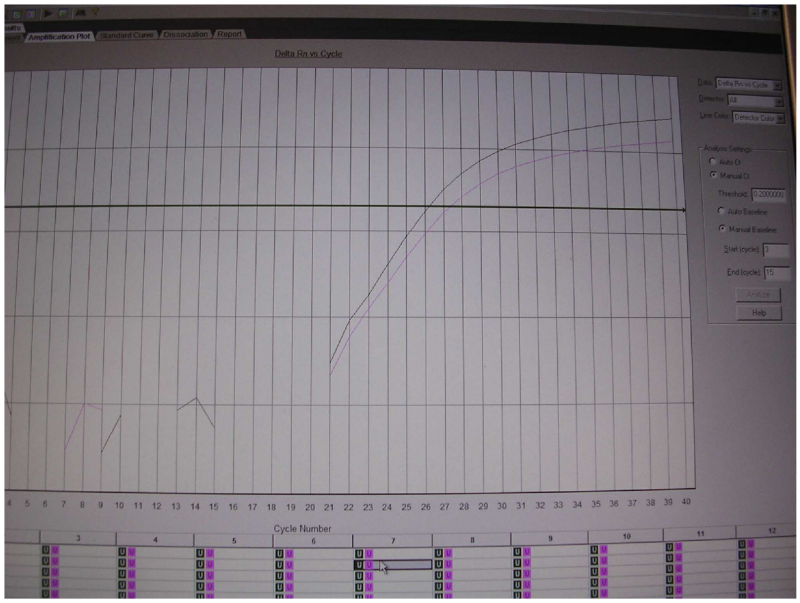
Obrázek 21. Detekovaný genotyp Val/Val Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF



Obrázek 22. Detekovaný heterozygotní genotyp (Val/Met) Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF.



Obrázek 23. Detekovaný homozygotní genotyp (Met/Met) Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF.



6. Diskuze

Za pomocí asociační studie byly srovnány rozdíly v alelické a genotypové frekvenci mezi skupinou hyperaktivních chlapců a skupinou kontrolních chlapců. V rámci práce jsme se pokusili nalézt nebo potvrdit zda se vybrané alely a genotypy kandidátních genů podílejí na hyperkinetické poruše. Při studii jsme vycházeli jsme ze studií provedených na několika pracovištích v zahraničí. Předpokládali jsme, že se nám podaří potvrdit vztah polymorfizmu genu pro DAT1 k hyperkinetické poruše v populaci chlapců České republiky. Dále jsme předpokládali, že se nám podaří potvrdit nebo zpochybnit význam polymorfizmů dalších genů na patogenezi hyperkinetické poruchy a odhalit nové kandidátní geny, které mají podíl na vzniku tohoto onemocnění. Práce a publikované výsledky přispěly k celosvětovému výzkumu molekulárních příčin vzniku psychických onemocnění a hledání kandidátních genů ADHD. Tím, že byl v rámci práce nashromážděn a analyzován reprezentativní vzorek populace České republiky s diagnózou hyperkinetické poruchy/ADHD (118) a k němu adekvátní kontrolní vzorek (153) se Česká republika zařadila mezi jeden ze států, které budou mít v budoucnu možnost získaná data využít např. při diagnostice, léčbě nebo prevenci tohoto onemocnění. Jako důsledek zavedení molekulární diagnostiky do psychiatrie lze v budoucnu očekávat nejen úsporu finančních prostředků na léčbu pacientů, ale i zkvalitnění života pacientů.

V rámci práce byl nashromážděn celkový soubor 271 chlapců. Soubor byl dostatečně obsáhlý pro zjištění závislosti a vyloučení falešně pozitivních výsledků. Falešně pozitivní výsledky mnoha studií jsou způsobeny nedostatečným množstvím osob zařazených do studie. Zejména výsledky prvotních studií, které byly publikovány před deseti lety obsahovaly malý počet osob (< 100) a nacházely pozitivní výsledky, které byly později v rozsáhlejších studiích vyvráceny. Naše studie patří co do souboru osob, tak i počtu zkoumaných polymorfizmů mezi největší studie svého druhu v České republice i Evropě, nicméně v posledních dvou letech se ve světových studiích vyskytují studie čítající řádově i přes 500 osob a zkoumající současně až desítky genů. Takovéto studie jsou prováděny ve spolupráci mnoha pracovišť a souborech osob různého etnika. Pro všechny studie je podstatný výběr osob, který může podstatně ovlivnit výsledek studie. Závěry molekulárně genetických studií u ADHD nejsou zcela konzistentní z několika příčin. Studie téměř vždy zkoumají vztah pouze jednoho polymorfizmu k hyperkinetické poruše. Lepším přístupem může být zkoumání vlivu interakce dvou nebo více polymorfizmů na patogenezi onemocnění. V práci jsem se pokusil provést dvojgenotypovou analýzu. V této souvislosti nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami osob. V práci byl objeven v rámci kontrolního

souboru osob statisticky signifikatní vztah ($p<0,01$) mezi polymorfizmy genů pro Mu receptor a DRD2. Dvojgenotyp AA/A2A2 se vyskytuje signifikantně častěji než jiné genotypy v rámci kontrolní skupiny. Lze sledovat také častější výskyt genotypu AA/A1A2 u osob s hyperkinetickou poruchou, než u kontrolního souboru. Tento rozdíl však není statisticky signifikantní. Některé náznaky lze pozorovat, nicméně pro statisticky relevantní výpočet by bylo třeba studované soubory osob ještě rozšířit. Rozdíl ve výsledcích molekulárně-biologických studií může být způsoben i tím, že studie jsou prováděny v různých populacích a často bez ohledu na rozdělení zkoumaných osob podle pohlaví. Přitom je naprosto jasné, že různé populace mají různé alelické či genotypové frekvence různých polymorfizmů. Stejně tak pohlaví ovlivňuje patogenezi hyperkinetické poruchy. V neposlední řadě je třeba se kriticky zaměřit i na výběr osob do asociačních studií, a to nejen co se týče hyperkinetické poruchy, ale také co se týče kontrolního souboru. Pokud je hyperkinetická porucha polygenní onemocnění, nelze předpokládat, že v populaci se budou vyskytovat na jedné straně pouze zdraví (bezpříznakoví) jedinci a na druhé straně jedinci se symptomy hyperkinetické poruchy. Skutečnost je taková, že se v populaci vyskytuje plynulá škála přechodu od silně hyperkinetické poruchy až po asymptomatické jedince. Z tohoto důvodu je ze statistického hlediska lépe srovnávat skupiny osob vyskytující se na obou pólech této imaginární škály, nikoliv srovnávat jeden pól se středem škály, tedy nevybranou (neléčenou pro ADHD) populací. Naše skupina hyperkinetiků/ADHD byla diagnostikována odbornými pracovníky ve fakultní nemocnici nejen s pomocí diagnostické škály MKN-10 a DSM-IV, ale i za pomocí dalších testů (TENAZO, TDT, NES2). Jednalo se navíc o chlapce dlouhodobě léčené. Skupina hyperkinetiků byla tedy velmi dobře diagnostikována. Skupina kontrolní byla tvořena chlapci vybraných brněnských škol, kteří byli vybráni na zákadě poměrně obsáhlých dotazníků CPQ a CTQ. Dotazníky odhalily příznaky hyperaktivního chování. Mnoho chlapců bylo ze studie vyloučeno, protože některý z dotazníků uváděl informace, které upozorňovaly na symptomy související s hyperaktivitou. Jsem si vědom, že by bylo možné docílit ještě lepší diagnostiky kontrolní skupiny, a to kombinací dotazníků s vyšetření odborníkem. Vyšetření odborníkem nebylo však možné provést, jak z časových, tak i finančních důvodů. Ve studii byli zkoumáni chlapci nacházející se pokud možno na opačných pólech. Zkoumáni byli pouze chlapci, protože u dívek se vyskytuje ADHD méně často. U dívek dochází navíc k rychlejšímu nástupu pohlavního dospívání s nástupem působení některých hormonů, které by mohly mít nebo naopak skrývat projevy působení některých zkoumaných genů.

V práci byl nalezen významný rozdíl v genotypových a alelických frekvencích **TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2** mezi skupinou kontrolní a skupinou hyperaktivních chlapců bělošské populace České republiky ($p=0,0075$ a $p=0,0026$). Frekvence alely A1 byla ve skupině

hyperaktivních výrazně vyšší (0,26) než ve skupině kontrolní (0,15). Nalezené frekvence potvrzují výsledky předchozí studie, kdy vyšší výskyt alely A1 byla nalezena u hyperkinetiků. Comings et al. (1991) zjistil zastoupení alely A1 u 49% ADHD dětí oproti 25% zastoupení této alely u zdravých dětí. Jiné studie zatím zjištění, že se TaqI A polymorfizmus genu pro DRD2 se podílí na příčinách hyperaktivity/ADHD zatím chybějí.

Zastoupení alely A1 je nicméně ve světové populaci velmi odlišné. Skutečnost byla zjištěna v asociačních studiích vztahu TaqI A polymorfizmu k alkoholizmu. Bylo zjištěno, že frekvence alely A1 se signifikantně liší mezi populací černošskou (0,38) a bělošskou (0,18), frekvence alely A1 je v černošské populaci častější. Frekvence alely A1 může být rozdílná i v rámci jedné rasy - frekvence alely A1 je v japonské populaci okolo 0,42, v čínské okolo 0,47 (Kašparovská et al., 2003). Lze se domnívat, že existují menší alelické rozdíly i v bělošských populacích.

V minulosti byl TaqI A polymorfizmus zkoumán v souvislosti s alkoholizmem, látkovými závislostmi (např. nikotin, kokain, amfetamin) a psychickými poruchami, kde dopaminový systém sehrává důležitou úlohu. V roce 1990 nalezl Blum et al. (1990) vztah mezi alkoholizmem a TaqI A polymorfizmem genu pro DRD2 ve studii, ve které srovnával pomocí RFLP DNA z mozkové tkáně 35 alkoholiků (22 osob z bělošské populace, 13 osob z černošské populace) a 35 kontrol (24 osob z bělošské populace, 11 osob z černošské populace). Ovlivnění dispozic k alkoholizmu, závislosti na drogách a některým dalším psychických onemocněním polymorfizmem TaqI A genu pro dopaminový receptor D2 je již několik let bohatě diskutováno. Alela A1 byla také asociována se snížením zrakoprostorové orientace (Berman et Noble, 1995), s prodloužením latence P300 u EEG křivek (Noble et al., 1994), se syndromem Gilles de la Tourette, autismem a ADHD (Comings et al., 1991).

Některé pozitivní nálezy ve starších studiích mohou být způsobeny malým počtem osob ve skupině, kde může snadno dojít k náhodnému uskupení osob se stejnými alelami nebo genotypy a smíšeným vzorkem populací. Vztah tohoto polymorfizmu k alkoholizmu byl s negativními výsledky zkoumán i v bělošské populaci České republiky (Šerý et al., 2004). O polymorfizmu TaqI A genu pro DRD2 je toho doposud známo poměrně málo - nachází se v koncové oblasti genu pro DRD2 a jeho účast na regulaci genové exprese je prozatím hypotetická, protože se nenachází v žádné regulační oblasti genu pro DRD2. TaqI A polymorfizmus může být ve vazebném disekvilibriu s některým zatím neznámým funkčním polymorfizmem, který ovlivňuje expresi DRD2 receptoru (Pohjalainen et al. 1998). Tento fakt by mohl vysvětlit některé pozitivní nálezy tohoto polymorfizmu k výše uvedeným zkoumaným poruchám včetně ADHD. V jiných studiích zkoumající TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2 autoři zjistili vztah mezi fenotypickou expresí

receptorů DRD2 v lidském mozku a A1 alelou, kdy alela A1 snižovala B_{max} v nucleus caudatus (Noble et al. 1991) nebo B_{max}/K_d ve striátu (Pohjalainen et al., 1998).

Výsledky naší práce jednoznačně potvrzuje, že TaqI A polymorfizmus genu pro DRD2 se podílí na příčinách hyperaktivity v populaci chlapců České republiky. K ověření tohoto nálezu bude třeba v budoucnu studii buď rozšířit nebo provést zcela nezávislou studii, která bude zahrnovat alespoň stejně rozsáhlý počet zkoumaných osob.

Pro **3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmus genu pro DAT1** byl nalezen signifikantní rozdíl v genotypové frekvenci (p=0,0127), zjistili jsme statisticky významný vztah genotypů 8/11 a 10/11 k výskytu ADHD. 11-repetitivní alela (520 bp) tohoto polymorfizmu zvyšuje riziko ADHD ve srovnání s ostatními repetitivními alelami. 11-repetitivní alela byla nalezena u třech ADHD chlapců, ale nebyla nalezena ve skupině kontrolní. Jsem si vědom, že alela má velmi nízké procentuelní zastoupení v populaci, a že tento výsledek může být způsoben nahodilým výskytem ve zkoumaných skupinách. Pro ověření by bylo nutné studii ještě rozšířit. V žádné předchozí studii nebyl tento nález publikován. V předchozích studiích byl naopak publikován výsledek, že existuje vztah mezi 10-repetitivní alelou a ADHD. Dle publikovaných studií může DAT1 10-repetitivní alela zvyšovat riziko poruchy ADHD. Tento objev byl poprvé publikován ve studii Cook et al. (1995) a potvrzen ve studii Gill et al. (1997). Dále asociaci potvrzuje několik dalších studií (Cornish et al., 2005, Curran et al., 2001, Daly et al., 1999, Lim et al., 2006, Quian et al., 2003, Quian et al., 2004, Waldman et al., 1998). Ostatní studie vztah 10-repetitivní alely a vztah tohoto polymorfizmu k ADHD nepotvrzují (Bakker et al., 2005, Barr et al., 2001, Bobb et al., 2005, Carrasco et al., 2006, Feng et al., 2005, Holmes et al., 2000, Kim et al., 2005, Kustanovich et al., 2004, Palmer et al., 1999, Roman et al., 2001, Simsek et al., 2006, Simsek et al., 2005, Todd et al., 2001). V roce 2005 byla provedena meta-analýza která nepotvrdila vztah mezi 3´ UTR VNTR polymorfizmem genu pro DAT1 a ADHD (p=0,21), (Wohl et al., 2005). Druhá provedená meta-analýza porovnávala data všech provedených studií do října 2005 na evropské a asijské populaci (Li et al., 2006). Studie nepotvrdila jednoznačný vztah 10-repetitivní alely k ADHD v populaci Evropanů a Asiatů (p=0,20). V nejnovější meta-analýze byl však prokázán malý vliv 10-repetitivní alely k ADHD. Statisticky signifikantní rozdíl byl nalezen ve studiích TDT (p=0,004). Studie zahrnovala 18 TDT studií zkoumajících vztah k ADHD. Pokud však do analýzy byly započítány case-control studie a HHRR studie, nebyl nalezen signifikantní rozdíl (Yang et al., 2007). Tato studie potvrzuje fakt, že studie case-control jsou méně citlivé. Naopak pokud case-control studie potvrdí vztah některého polymorfizmu, pak by měl tento polymorfizmus mít výraznější vliv na vznik poruchy. V naší studii jsme nenalezli signifikantní rozdíl ve výskytu genotypu 10/10 a 10-repetitivní alelou mezi skupinou ADHD a skupinou kontrolní (p=0,531). V obou skupinách jsme

nalezli téměř shodnou frekvenci 10-repetitivní alely a 10/10 genotypu. Ve skupině ADHD byl výskyt 55,9% a ve skupině kontrolní 56,2%. Naše studie nalezla podobný výsledek jako nalezla ve své asociační studii skupina Simsek et al. (2005), která genotypizovala skupinu 92 dětí s ADHD (0,609) a 110 kontrol (0,646). Studie nicméně zkoumala jak chlapce, tak i dívky. Case-control analýza byla také provedena na rozsáhlejším vzorku osob (263 ADHD a 287 kontrol), a to na bělošské populaci (Langley et al., 2005). Ve studii byla srovnávána frekvence 10-repetitivní alely s ostatními alelami 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1. Studie neobjevila žádnou signifikantní závislost mezi skupinami a frekvencí výskytu 10-repetitivní alely (p=0.91). Závěrem bych dodal, že naše studie potvrzuje výsledky asociačních studií case-control, kde nebyla nalezena signifikantní závislost mezi 10-repetitivní alelou a ADHD. Ze všech výsledků doposud provedených studií lze vyvodit závěr, že 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1 má pouze malý vliv ke vzniku ADHD, který je špatně detekovatelný za pomocí case-control studií. Námi nalezená 11-repetitivní alela pouze ve skupině hyperaktivních chlapců podtrhuje fakt, že dlouhé alely mohou podporovat hyperaktivní chování.

Výsledky práce nepotvrdily vztah mezi **Val158Met polymorfizmem genu pro COMT** a hyperkinetickým syndromem. Pozitivní nálezy byly publikovány v některých předchozích studiích. Rogeness et al. (1982) studoval 25 dětí s poruchou chování a 20 dětí v kontrolním souboru a zjistil, že děti s poruchou chování měly signifikantně vyšší plasmatickou aktivitu COMT. Kuperman et al. (1988) zkoumal vztah mezi psychologickými parametry a sérovou hladinou COMT u 31 osob ve věku 21-23 let, které trpěly hyperaktivitou, impulzivitou a nesoustředěností. Hladina COMT byla pozitivně korelována s impulzivitou a negativně asociována s hostilitou. Eisenberg et al. (1999) zkoumal celkem 48 rodin s dítětem s ADHD a zjistil signifikantní vztah mezi ADHD a alelou H (Val) polymorfizmu Val158Met genu pro COMT, znamenající vyšší enzymovou aktivitu. Barr et al. (1999) testoval vazbu mezi ADHD a Val158Met polymorfizmem genu pro COMT na 77 rodinách s negativním výsledkem. Také Hawi et al. (2000) a Tahir et al. (2000) neobjevili na 94 a 72 rodinách vztah mezi tímto polymorfizmem a ADHD. Skupina kolem Eisenberga provedla novou nezávislou studii na nových subjektech a nepotvrdila vztah mezi ADHD a polymorfizmem Val158Met genu pro COMT (Manor et al., 2000). Payton et al. (2001), Zhang et al. (2003), Mills et al. (2004) a Bobb et al. (2005) tento vztah také neobjevili. Studie z čínské populace Han (Qian et al., 2003) použila soubory 202 rodin (340 případů ADHD) a 226 kontrolních osob ke studiu vztahu mezi ADHD a Val158Met polymorfizmem genu pro COMT. Autoři zjistili, že alela Met, znamenající nízkou aktivitu COMT, byla statisticky významně častěji přenášena na chlapce s ADHD (p=0,05), pro dívky toto zjištění neplatilo. ADHD-I subtyp a ADHD bez komorbidit byla u chlapců asociována s polymorfizmem Val158Met genu pro COMT. Alela Val byla častější u

dívek, které splňovaly kritéria pro hyperkinetickou poruchu (MKN-10) nebo pro ADHD (DSM - IV) - 86% a 79.5%, ve srovnání s dívkami z kontrolního souboru. Z výsledků vyplývá, že novější studie provedené na rozsáhlejších souborech osob většinou nepotvrzují vztah mezi Val158Met polymorfizmem genu pro COMT a ADHD. Výsledky jedenácti FBS a dvou case-control studií shrnuje meta-analýza (Cheuk et Wong 2006). Ve studii nebyl nalezen signifikantní rozdíl (p=0,87). Meta-analýza přesto doporučuje opakovaně zkoumat tento polymorfizmus, neboť publikované studie jsou značně nehomogenní a rovněž nemůže být vyloučena interakce tohoto polymorfizmu a genu s ostatními geny. Moje práce podtrhuje výsledky studií, které nenalezly vztah k hyperkinetické poruše. V kontextu s dispozicemi k alkoholizmu, drogové závislosti a schizofrenii může být nicméně vliv Val158Met polymorfizmu diskutován (Šerý et al., 2004).

Dalším zkoumaným polymorfizmem byl **A/G polymorfizmus genu pro MAOB**. Gen pro MAOB byl v minulosti v souvislosti s ADHD zkoumán ve dvou studiích, nicméně byly zkoumány jiné polymorfizmy než zkoumal náš vědecký tým. Jiang et al. (2001) zkoumali v čínské populaci u 82 rodin vazebné ekvilibrium (GT)n lokusu MAOB k ADHD (p>0,05). Ve druhé studii nebyl u markerů rs1799836 a rs3838196 objeven signifikantní vztah k ADHD (Domschke et al., 2005). V práci jsem neobjevil signifikantní vztah mezi A/G polymorfizmem genu pro MAOB a ADHD (p=0,087). Zkoumaný polymorfizmus nemá významný vztah k hyperkinetické poruše.

V práci nebyl nalezen významný rozdíl v alelických frekvencích **I/D polymorfizmu genu pro ACE** a **M235T polymorfizmu genu pro AGT** mezi kontrolní skupinou a skupinou hyperaktivních chlapců v bělošské populaci České republiky (p>0,05). Nalezené rozdíly byly statisticky nevýznamné. Tyto dva polymorfizmy nebyly doposud zkoumány v souvislosti s ADHD, proto nemohu mé výsledky porovnat s ostatními výzkumy. Polymorfizmy pravděpodobně neovlivňují patogenezi ADHD. Oba polymorfizmy jsou intenzivně zkoumány s jinými onemocněními i somatickými poruchami. Nejlépe je prozkoumán vztah I/D polymorfizmu genu pro ACE ke kardiovaskulárnímu onemocnění a hypertenzi.

V práci byly zkoumány geny, který by se mohly podílet na příčinách ADHD prostřednictvím imunitního systému. Podle posledních studií může být za odlišné chování zodpovědný imunitní systém, který má těsný vztah s nervovým a endokrinním systémem. Role endokrinního systému v patofyziologii duševních poruch není zpochybňována a je zdůrazňována, zatímco role imunitního systému je leckdy až nápadně opomíjena. Zdá se, že centrální dopaminergní systém vyvíjí síťový stimulační vliv na imunitní systém. Hypotéza se zakládá na nálezech změn imunitního systému u pacientů trpících neurologickými onemocněními jako je například Parkinsonova choroba. Úbytek striatálního dopaminu potlačuje uvolňování TNF z makrofágů a zvyšuje růst nádoru. Farmakologické charakteristiky vazebných míst poukazují na příbuznost mezi

podtypy receptorů D2 a D4. Na funkční význam DRD2 a DRD4 při zprostředkování nervově-imunitních interakcí ukazuje snížení intercelulárních hladin cAMP v lymfocytech stimulovaných forskolinem při současné aplikaci dopaminu. Mezi geny „pro regulaci imunitního systému“ patřily geny pro **IL-6, IL-2, TNF-α a CCR-5**. V práci nebyl prokázán významný vztah ani jednoho ze zkoumaných polymorfizmů těchto genů. Nadějné výsledky poskytla analýza provedená v polovině studie pro -174 C/G polymorfizmus genu pro IL-6. Použitím metody X^2 testu byl nalezen signifikantní rozdíl v genotypových frekvencích polymorfizmu –174 genu pro IL-6 mezi kontrolní skupinou a skupinou hyperaktivních (p=0,00346). Fisher-exact test prokázal signifikantní rozdíl (p=0,00062) ve frekvenci alely C mezi kontrolní skupinou (0,40) a skupinou hyperaktivních (0,65). Po rozšíření studie nebyl již pozorován rozdíl mezi oběma studovanými skupinami (p=0,16). Po zjištění falešně pozitivního výsledku jsme zřejmě mylně hledali paralelu mezi možnou expresí genu pro IL-6 a ADHD. V souladu s výsledky preklinických studií, hypoteticky u ADHD by nižší exprese IL-6 (v důsledku přítomné alely C) mohla být příčinou vyšší hladiny dopaminu ve striátu a nižší ve frontálním kortexu. Naopak vyšší exprese IL-6 (snad související s alelou G u kontrolních subjektů) by mohla v průběhu ontogenézy přispívat k lepšímu přežívání dopaminových neuronů. Vzhledem k tomu, že genotyp GG převládal u chlapců v kontrolní skupině, považovali jsme jej za protektivní vůči hyperkinetické poruše (Šerý et al., 2003). V práci, která na souboru osob z České republiky srovnávala frekvenci alely C u alkoholiků a u kontrolních osob charakterizovaných jako nenávykových, byla frekvence alely C u alkoholiků 0,48 a u kontrol 0,41 (Šerý et al., 2003). Tento rozdíl byl statisticky signifikantní (p<0,03). Další nezávislá práce, která studovala vztah mezi polymorfizmem -174 genu pro IL-6 a chronickou periodontitidou na české pupulaci byla publikována Izakovičovou-Hollou (Izakovičová-Hollá et al., 2004). V této práci byla nalezena frekvence alely C 0,47 u pacientů s chronickou periodontitidou a 0,41 u kontrolní skupiny osob. Rozdíl těchto frekvencí nebyl statisticky významný. Frekvence alely C v kontrolních souborech dvou posledně zmíněných prací je shodná - totiž 0,41, ale liší se od frekvence alely C nalezené v této práci (0,52). Rozdíl může být dán skutečností, že studované skupiny osob se vzájemně liší věkově - v předkládané práci se jedná o věkovou kategorii 7-13 let, zatímco ve dvou zmíněných pracích se jedná o věkové kategorie cca 20-60 let. Je znám posun v alelických frekvencích např. u polymorfizmu I/D ACE v rámci české populace u různých věkových populací. K mylným závěrům nás vedly i některé studie provedené na potkanech, které vykazovaly, že systémově podaný IL-6 u potkanů významně snižuje hladinu extracelulárního dopaminu v nucleus accumbens (Zalcman et al., 1994). V jiných publikacích byl zjištěn vztah alely C k nižší hladině plasmatického IL-6, naopak alela G zvyšuje až 3,6 násobně expresi IL-6 (Song et al., 1999). V současné době se stavím k jakékoli souvislosti vztahu -176 G/C

polymorfizmu genu pro IL-6 k ADHD skepticky. Zkoumané polymorfizmy genů pro IL-6, IL-2, TNF-α a CCR-5 se dle našich výsledků nepodílejí na příčinách ADHD v chlapecké populaci České republiky.

Výsledky práce nepoukazují ani na důležitou roli **Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF** k ADHD. V práci jsme neobjevili signifikantní statistickou závislost mezi frekvencí výskytu alely Val (G) Val66Met polymorfizmu genu pro BDNF mezi skupinou ADHD a skupinou kontrolní (p=0,24), přestože byl pozitivní nález publikován ve dvou studiích zaměřených přímo na přenos Val alely z rodiče na potomky (Kent et al., 2005, Lanktree et al., 2004). Ve studii Lanktree et al. (2004) byla potvrzena statistická závislost v case-control studii provedené na dospělé populaci. Fridel et al. (2005) neobjevili signifikantní závislost mezi ADHD, obezitou a poruchou příjmu potravy. Dvě nejnovější studie pozitivní nálezy rovněž nepotvrzují (Schimmelmann et al., 2007, Xu et al., 2007). Ve studii Xu et al. (2007) byl studován přenos alely na dvou zcela odlišných populacích, a to na populací Britů a Taiwanců. Schimmelmann et al. (2007) nenašel vztah ve vzorku 294 nezávislých rodin s 463 ADHD dětmi. Odlišné výsledky si vědecké skupiny vysvětlují velkou heterogenitou studií a odlišnými diagnostickými metodami (zařazeni ADHD s různými subtypy poruchy). Všechny uvedené studie byly provedeny na rozsáhlých souborech osob, proto zde nemůže jít o falešně pozitivní výsledky způsobené malým počtem osob - Kentova pozitivní studie zkoumala 341 ADHD probandů. Z naší studie i ostatních uvedených studií se lze domnívat, že Val66Met polymorfizmus genu pro BDNF se nepodílí na příčinách vzniku ADHD, přestože byly nalezeny některé asociace. Definitivní závěry nám snad přinese blízká budoucnost, kdy bude i nadále Val66Met polymorfizmus a gen BDNF intenzivně zkoumán.

Posledním studovaným polymorfizmem byl **Asn40Asp polymorfizmus genu pro Mu opioidní receptor**. Zkoumaný polymorfizmus genu pro Mu opioidní receptor byl zkoumán, protože Mu receptor by se mohl nepřímo podílet na regulaci dopaminového sytému. Asn40Asp polymorfizmus nebyl doposud zkoumán v souvislosti s ADHD, protože nepaří mezi nejužší kandidátní geny. Souvislost tohoto polymorfizmu k hyperkinetické poruše se nám nepodařilo statisticky prokázat (p=0,53). Nebyl nalezen žádný rozdíl v genotypové frekvenci u genotypu AA (0,789 a 0,791) ani v alelickém zastoupení alely A mezi skupinou ADHD (0,84) a skupinou kontrolní (0,89). Z výsledků si dovoluji konstatovat, že Asn40Asp polymorfizmus genu pro Mu opioidní receptor se nepodílí na příčinách hyperkinetického syndromu v bělošské populaci České republiky.

7. Závěr

V práci byl za pomocí asociační studie prozkoumán vztah 12 polymorfizmů 12 kandidátních genů k hyperkinetické poruše. Vztah k hyperkinetické poruše byl prokázán u TaqI A polymorfizmu genu pro DRD2. TaqI A polymorfizmus genu pro DRD2 se podílí na příčinách vzniku ADHD u chlapců v bělošské populaci České republiky. V práci byla nalezena souvislost mezi 11-repetitivní alelou 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1 a hyperkinetickou poruchou. Tato alela se vyskytovala pouze u skupiny hyperkinetických chlapců. Jedná se o řídce se vyskytující alelu v naší populaci, proto je nutné tento nález potvrdit v další studii nebo naši studii rozšířit. Naopak jsme neprokázali vztah 10-repetitivní alely 3´UTR VNTR 40 bp polymorfizmu genu pro DAT1 k hyperkinetické poruše. Nález vztahu 10-repetitivní alely k ADHD byl popsán v několika předchozích studiích. U ostatních polymorfizmů nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v alelických a genotypových frekvencích mezi skupinou hyperaktivních chlapců a skupinou kontrolní. Vztah k hyperkinetické poruše nebyl prokázán pro Val158Met polymorfizmus genu pro katechol-o-methyltransferázu (COMT), A/G polymorfizmus ve 13. intronu genu pro monoaminoxidázu B (MAOB), M235T polymorfizmus genu pro angiotensinogen (AGT), I/D polymorfizmus genu pro angiotensinkonvertázu (ACE), -174 C/G polymorfizmus genu pro interleukin 6 (IL-6), -330 T/G polymorfizmus genu pro interleukin 2 (IL-2), -308 A/G polymorfizmus genu pro tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α), Val66Met polymorfizmus genu pro brain-derived neutrofický faktor (BDNF), Delta 32 polymorfizmus genu pro chemokinový receptor 5 (CCR-5) a Asn40Asp polymorfizmus genu pro μ opioidní receptor (Mu). Zmíněné polymorfizmy se dle našich výsledků nepodílejí na příčinách hyperaktivity v bělošské populaci chlapců České republiky.

Výsledky studie přispěly k celosvětovému výzkumu hledání molekulárních příčin hyperkinetické poruchy/ADHD. Výsledky získané a ověřené ve více studiích a různých populacích by měly v budoucnu pomoci k lepší diagnostice onemocnění a léčbě hyperkinetického syndromu. Na základě polymorfizmů, které mají vztah k poruše budou sestaveny haplotypy, které budou určující pro vznik poruchy. Na základě haplotypu bude v budoucnu možné vybrat typ nejúčinnější léčby onemocnění.

8. Přílohy

8.1. Oslovovací dopis pro kontrolní soubory chlapců

8.2. Informovaný souhlas

8.3. Rodičovský dotazník CPQ

8.4. Učitelský dotazník CTQ

8.5. Označení některých zkoumaných polymorfizmů pomocí rs čísla v databázi GeneBank

9. Seznam zkratek

AC – adenylylcykláza

ACE – angitensin konvertující enzym

ACH – acetylcholin

ADD – porucha s deficitem pozornosti (Attention deficit disorder)

ADHD – porucha s deficitem pozornosti a hyperaktivitou (Attention deficit hyperactivity disorder

ADRA1 – alpha adrenergní receptor A1

ADRA2, ADRA2B, ADRA1C – různé typy adrenergních receptorů

AGT – angiotensinogen

AMK – aminokyselina

AMPA – podtyp glutatových receptorů, zprostředkovávají rychlý synaptický přenos v CNS

ATP – adenosin trifosfát

BDNF – brain derived neutrofický faktor

B_{max} – celková koncentrace receptorů

B_{max}/K_d – poměr celkové koncentrace receptorů ku rovnovážné disociační konstantě

CCR-5 – chemokinový receptor 5

CCS – asociační studie porovnávající soubory osob (case-control study)

cDNA – molekula DNA vzniklá reverzní transkripcí RNA (complementary DNA)

CNS – centrální nervová soustava

COMT – katechol-o-methyl transferáza

CPQ – dotazník Connersové pro rodiče (Conners Parents Questionnaire)

CTQ – dotazník Connersové pro učitele (Conners Teachers Questionnaire)

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

D1-D5 – dopaminové receptory 1-5

DA – dopamin

DAT – dopaminový přenašeč (dopamine transporter)

DBH – enzym dopamin-beta-hydroxyláza (dopamine-beta-hydroxylase)

DOPA – enzym dopamin dekarboxyláza

DRD2 – dopaminový receptor D2

DRD4 – dopaminový receptor D4

DSM-IV – Diagnostický a statistický manuál Americké psychiatrické asociace, 4. revize

EEG – electronencephalograph

EDTA – pufr disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové

FBS – rodinná studie (family based study)

GABA – kyselina γ-aminomáselná

HHRR – haplotype-based haplotype relative risk

HIV-1 – Human imunodeficiency virus typu I

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high liquid chromatography)

HRR – haplotype relative risk

5-HT – 5-hydroxytryptamin (serotonin)

5-HTT – serotoninový přenašeš (5-hydroxytryptamine transporter)

5-HTR1A, 5-HTR2A – zkoumané serotoninové receptory 1A a 2A

HVA – kyselina homovanilová

IgG – imunoglobulin G

IL-1α a IL-1β – interleukin 1 alfa a beta

IL-1RN – antagonista interleukinu 1

IL-6, IL-2 – interelukin 6, interleukin 2

LC – locus coeruleus

LDE – lehká dětská encefalopatie

LMD – lehká mozková dysfunkce

MAO – enzym monoaminooxidáza

MAOA – monoaminooxidáza A

MAOB – monoaminooxidáza B

MBD – malé poškození mozku (minimal brain damage)

MHPG – 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol, metabolit noradrenalinu

MKN-10 – Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize, odpovídá ICM-10

MRI – magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)

Mu – opioidní receptor Mu

mRNA – messenger ribonukleová kyselina

NA – noradrenalin

NC – nucleus caudatus

NES2 – neurobehaviorální hodnotící systém (Neurobehavioral Evaluation System 2)

NK-buňky – natural killer buňky

NMR –nukleární magnetická rezonance

PCR – polymerázová řetězcová reakce

PEA – fenyletylamin

PET – pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)

RA – renin angiotensinogen

RNA – ribonukleová kyselina

RT-PCR – Real time PCR, PCR umožňující měření v reálném čase

SNP – single nucleotide polymorphism, polymorfizmus, záměna báze v nukleotidovém řetězci

SPECT – jednofotonová emisní výpočetní tomografie (single photon emission computer tomography

SRBC – červená krevní buňka ovce (sheep red blood cell)

TCA – tricyklická antidepresiva

TDT – transmission disequilibrium test – statistická metoda

TENAZO – test nacházení známých obrazců

TH – tyrozin hydroxyláza

TNF alfa – tumor nekrotizující faktor alfa

VNTR – variabilní repetitivní polymorfizmus (variable number tandem repeat)

WURS – Wenderova hodnotící stupnice (Wender Utah Rating Scale)

3´UTR – neznámý blíže neurčený polymorfizmus (3´untranslated polymorphism)

10. Seznam literatury

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistic Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV). American Psychiatric Association, Washington DC 1994.

Amouyel P, Richard F, Cottel D, Amant C, Codron V, Helbecque N. The deletion allele of the angiotensin I converting enzyme gene as a genetic susceptibility factor for cognitive impairment. Neurosci Lett 1996, 217: 203-205

Arenberger P, Obstová I. Obecná dermatovenerologie. Czechopress agency, Praha 2001

Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Konecki D, Lopera F, Pineda D, Palacio JD, Rapoport JL, Berg K, Bailey-Wilson J, Muenke M. Pedigree disequilibrium test (PDT) replicates association and linkage between DRD4 and ADHD in multigenerational and extended pedigrees from a genetic isolate. Mol Psychiatry 2004, 9: 252-259

Arnold E. Contemporary Diagnosis and Management of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. Newtown PA, Handbooks in Healthcare Co, USA 2002

Aylwyrd EH, Reiss AL, Reader MJ, Singer HS, Brown JE, Denckla MB. Basal ganglia volumes in children with ADHD. J Child Neurol 1996, 111: 12-115

Bakhiet M, Tjernlund A, Mousa A, Gad A, Stromblad S, Kuziel WA, Seiger A, Andersson J. RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes. Nat Cell Biol. 2001, 3 (2): 150-157

Bakker SC, van der Meulen EM, Oteman N, Schelleman H, Pearson PL, Buitelaar JK, Sinke RJ. DAT1, DRD4, and DRD5 polymorphisms are not associated with ADHD in Dutch families. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2004, 132: 50-52

Barkley RA. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. Scientific American 1998, 9: 44-49

Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet 2001, 105: 84-90

Barr CL, Wigg K, Bloom S, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. Further evidence from haplotype analysis for linkage of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet 2000, 96: 262-267

Barr CL, Wigg K, Malone M, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Kennedy JL. Linkage study of catechol-O-methyltransferase and attention-deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet 1999, 88: 710-713

Barr CL, Wigg K, Zai G, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL. Attention-deficit hyperactivity disorder and the adrenergic receptors alpha 1C and alpha 2C. Mol Psychiatry 2001, 6: 334-337

Barr CL, Xu C, Kroft J, Feng Y, Wigg K, Zai G, Tannock R, Schachar R, Malone M, Roberts W, Nothen MM, Grunhage F, Vandenbergh DJ, Uhl G, Sunohara G, King N, Kennedy JL. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. Biol Psychiatry 2001, 49: 333-339

Baumgartner TL, Singer HS, Denckla MB, Rubin MA, Abrams MT, Colli MJ, Reiss AL. Corpus callosum morphology in children with Tourette syndrome and ADHD. Neurology 1996, 4: 477-482

Bellgrove MA, Domschke K, Hawi Z, Kirley A, Mullins C, Robertson IH, Gill M. The methionine allele of the COMT polymorphism impairs prefrontal cognition in children and adolescents with ADHD. Exp Brain Res 2005, 163: 352-360

Bellgrove MA, Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Robertson IH, Gill M. DRD4 gene variants and sustained attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of associated alleles at the VNTR and -521 SNP. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 136: 81-86

Berman SM, Noble EP. Reduced visuospatial performance in children with the D2 dopamine receptor A1 allele. Behav Genet 1995, 25 (1): 45-58

Bhaduri N, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Singh M, Mukhopadhyay KK. Analysis of polymorphisms in the dopamine Beta hydroxylase gene: association with attention deficit hyperactivity disorder in Indian children. Indian Pediatr, 2005, 42: 123-129

Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. Biol. Psychiatry, 2005, 1; 57 (11): 1215-20

Biederman J. Spencer T. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) as a Noradrenergic Disorder. Biol Psychiatry 1999, 1234

Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, Nogami H, Briggs AH, Cohn JB. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. JAMA 1990, 263 (15): 2055-2060

Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK, Clasen, LS, Sharp WS, Inoff-Germain G, Wavrant-De Vrieze F, Arcos-Burgos M, Straub RE, Hardy JA, Castellanos FX, Rapoport JL. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 134: 67-72

Brazsko JJ, Wisniewski K. Alpha 1- and alpha 2 -adrenergic receptor blokade influences angiotensin II facilitation of avoidance behavior and stereotypy in rats. Psychoneuroendocrinology 1990, 15 (4): 239-252

Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R, Buitelaar J, Sham P, Campbell D, Knight J, Andreou P, Altink M, Arnold R, Boer F, Buschgens C, Butler L, Christiansen H, Feldman L, Fleischman K, Fliers E, Howe-Forbes R, Goldfarb A, Heise A, Gabriels I, Korn-Lubetzki I, Johansson L, Marco R, Medad S, Minderaa R, Mulas F, Muller U, Mulligan A, Rabin K, Rommelse N, Sethna V, Sorohan J, Uebel H, Psychogiou L, Weeks A, Barrett R, Craig I, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda A, Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Taylor E, Thompson M, Faraone SV, Asherson P. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. Mol Psychiatry. 2006 11 (10): 934-53

Brookes KJ, Xu X, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. No evidence for the association of DRD4 with ADHD in a Taiwanese population within-family study. BMC Med Genet 2005, 6: 31

Brunner D, Hen R. Insight into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. Ann NY Acad. Sci 1997, 836: 81-105

Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M. BDNF Val(66)Met Allele Is Associated with Reduced Hippocampal Volume in Healthy Subjects. Biol Psychiatry 2006, Biol Psychiatry 2006, 1, 59 (9): 812-815

Cadoret RJ, Langbehn D, Caspers K, Troughton EP, Yucuis R, Sandhu HK, Philibert R. Associations of the serotonin transporter promoter polymorphism with aggressivity, attention deficit, and conduct disorder in an adoptee population. Compr Psychiatry 2003, 44: 88-101

Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henriquez H, Aboitiz F, Rothhammer F. Presence of DRD4/7R and DAT1/10R allele in Chilean family members with attention deficit hyperactivity disorder. Rev Med Chil 2004, 132: 1047-1052

Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dickstein DP. Quantive brain magnetic resonance imaging in attention deficit hyperactive disorder. Arch Gen Psychiatry 1998, 53 :607-616

Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Dietz G, Shahbahrami B, Tast D, Knell E, Kocsis P, Baumgarten R, Kovacs BW. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. JAMA 1991, 266 (13): 1793-1800

Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Blake H, Wu S, MacMurray JP. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2a, ADRA2C, DBH) on attention-deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. Clin Genet 1999, 55: 160-172

Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henriquez H, Chakraborty R, Aboitiz F, Rothhammer F. Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. Am J MedGenet B Neuropsychiatr Genet 2006, 141: 51-54

Castellanos FX, Lau E, Tayebi N, Lee P, Long RE, Giedd JN, Sharp W, Marsh WL, Walter JM, Hamburger SD, Ginns EI, Rapoport JL, Sidransky E. Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic and brain morphometric analyses. Mol Psychiatry 1998, 3: 431-434

Clauser E, Gaillard I, Wei L, Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. Am J Hypertens 1989, 2: 403-410

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Eighth edition. Oxford University Press, New York 2003

Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL. Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. Am J Hum Genet 1995, 56: 993-998

Cubells JF, Kranzler HR, McCance-Katz E, Anderson GM, Malison RT, Price LH, Gelernter J. A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta hydroxylase activity, also associated with cocaine-induced paranoia. Mol Psychiatry 2000, 5: 56-63.

Culman J, Hohle S, Quadri F, Edling O, Blume A, Lebrun C, Unger T. Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. Clin Exp Hypertens 1995, 17: 281-293

Curran S, Mill J, Tahir E, Kent L, Richards S, Gould A, Huckett L, Sharp J, Batten C, Fernando S, Ozbay F, Yazgan Y, Simonoff E, Thompson M, Taylor E, Asherson P. Association study of a dopamine transporter polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in UK and Turkish samples. Mol Psychiatry 2001, 6: 425-428

Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. Mol Psychiatry 1999, 4: 192-196

De Luca V, Muglia P, Vincent JB, Lanktree M, Jain U, Kennedy JL. Adrenergic alpha 2C receptor genomic organization: association study in adult ADHD.
Am J Med Genet 2004, 127B: 65-67

Denckla MB, Rudel RG. Anomalies of motor development in hyperactive boys. Ann Neurol 1978, 3: 231-233.

Domschke K, Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, O'sullivan R, Freitag C, Becker T, Conroy J, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 134: 110-114

Drtílková I. Hyperkinetická porucha z hlediska biologické psychiatrie. Česká a slovenská psychiatrie, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, Praha 1997, 3.

Drtílková I, Šerý O, Balaštíková B, Theiner P, Uhrová A, Žáčková M. Hyperkinetická porucha/ADHD. Galén, Praha 2007

Dwoskin LP, Jewell A, Cassis LA. DuP 753, a nonpeptide angiotensin II - 1 receptor antagonist, alters dopaminergic function in rat striatum. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1992, 345 (2): 153-159

Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Zohar A, Gritsenko I, Nemanov L, Ebstein RP. Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype. Am J Med Genet 1999, 88: 497-502

Eisenberg J, Zohar A, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Gritsenko I, Nemanov L, Ebstein RP. A haplotype relative risk study of the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Am J Med Genet 2000, 96: 258-261

El-Faddagh M, Laucht M, Maras A, Vohringer L, Schmidt MH. Association of dopamine D4 receptor (DRD4) gene with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in a high-risk community sample: a longitudinal study from birth to 11 years of age. J Neural Transm 2004, 111: 883-889

Ernst M, Liebenauer LL, King AC. Reduced brain metabolism in hyperactive girls. J Am Acad Chil Adolesc Psychiatry 1994, 33: 858-868.

Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Pascualvaca D, Jons PH, Cohen MA, Cohen RM. High midbrain [^{18}F]DOPA accumulation in children with ADHD. Am J Psychiatry 1999, 156, 8: 1209-1215

Eubanks JH, Djabali M, Selleri L, Grandy DK, Civelli O, McElligott DL, Evans GA. Structure and linkage of the D2 dopamine receptor and neural cell adhesion molecule genes on human chromosome 11q23. Genomics 1992; 14 (4): 1010-1018

Eugen-Olsen J, Hagemeister JJ, Hellung-Larsen P. Expression of Tetrahymena snRNA gene variants including a U1 gene with mutations in the 5' splice site recognition sequence. Gene 1997, 21, 189 (2): 221-225

Faraone SV, Biederman J, Weiffenbach B, Keith T, Chu MP, Weaver A, Spencer TJ, Wilens TE, Frazier J, Cleves M, Sakai J. Dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention deficit hyperactivity disorder. Am J Psychiatry 1999, 156: 768-770

Feng Y, Wigg KG, Makkar R, Ickowicz A, Pathare T, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Schachar R, Barr CL. Sequence variation in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 139: 1-6

Filus JF, Rybakowski J. Neurotrophic factors and their role in the pathogenesis of affective disorders. Psychiatr Pol 2005, 39 (5): 883-897

Fischer SE, Francks C, McCracken JT, McGough JJ, Marlow AJ, MacPhie IL, Newbury DF, Crawford LR, Palmer CG, Woodward JA, Del´Homme M, Cantwell DP, Nelson SF. A genomwide scan for loci involved in ADHD. Am J Hum Genet 2002, 70 (5): 1183-96

Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin-6 produced in the CNS in viral diseases. Eur J Immunol 1989,19: 689-694

Friedel S, Horro FF, Wermter AK, Geller F, Dempfle A. Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 132 (1): 96-99

Ganong WF. Blood, pituitary and brain renin-angiotensin systems and regulation of anterior pituitary gland. Neuroendocrinology 1993, 14: 233-249

Garpenstrand H, Ekblom J, Forslund K, Rylander G, Oreland L. Platelet monoamine oxidase activity is related to MAOB intron 13 genotype. J Neural Transm 2000, 107 (5): 523-30

Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH Jr. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. Am J Psychiatry 2004, 161 (9): 1698-700

Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. Mol Psychiatry 1997, 2: 311-313

Gordon MS. Neurobiology. Oxford University Press, New York 1983

Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. Am J Hum Genet 1989; 45 (5): 778-785

Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. Hum Mol Genet 1993, 2 (12): 2197

Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. Neuroscience. 1991, 40 (2): 445-52

Hamarman S, Fossella J, Ulger C, Brimacombe M, Dermody J. Dopamine receptor 4 (DRD4) 7-repeat allele predicts methylphenidate dose response in children with attention deficit hyperactivity disorder: a pharmacogenetic study. J Child Adolesc Psychopharmacol 2004, 14: 564-574

Hartmann T. ADD - A Different Perspective. Underwood Books, Grass Valley 2000

Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhage F, Nothen M, Greenwood T, Kelsoe J, Fitzgerald M, Gill M. Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. Mol Psychiatry 2003, 8: 299-308

Hawi Z, McCarron M, Kirley A, Daly G, Fitzgerald M, Gill M. No association of the dopamine DRD4 receptor (DRD4) gene polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the Irish population. Am J Med Genet 2000, 96: 268-272

Hawi Z, Millar N, Daly G, Fitzgerald M, Gill M. No association between catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample. Am J Med Genet 2000, 96: 282-284

Hisaoka T, Morikawa Y, Kitamura T, Senba E. Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. Brain Res Dev Brain Res. 2003, 143 (1): 105-109.

Hisaoka T, Morikawa Y, Kitamura T, Senba E. Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing olfactory system. Glia. 2004, 45 (4): 313-324

Hogarty DC, Speakman EA, Puig V, Phillips MI. The role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to central angiotensin. Brain Res 1992, 586: 289-294

Holmes J, Payton A, Barrett J, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Worthington J, Gill M, Kirley A, Hawi Z, Fitzgerald M, Asherson P, Curran S, Mill J, Gould A, Taylor E, Kent L, Craddock N, Thapar A. Association of DRD4 in children with ADHD and comorbid conduct problems. Am J MedGenet 2002, 114: 150-153

Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Worthington J, Thapar A. A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry 2000, 5: 523-530

Hříbková H. Genetické dispozice k závislosti na alkoholu. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta MU, Brno 2002

Huang Y, Liu X, Li T, Guo L, Ma X, Yuan G, Peng R. Transmission disequilibrium test of DRD4 exon III 48bp variant number tandem repeat polymorphism and tic disorder. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2002, 19: 100-103

Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier E. Structure of angiotensin I - converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of duplicated gene. J Biol Chem 1991, 266 (23): 15377-83

Chen CK, Chen SL, Mill J, Huang YS, Lin SK, Curran S, Purcell S, Sham P, Asherson P. The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. Mol Psychiatry 2003, 8: 393-396

Cheon KA, Ryu YH, Kim JW, Cho DY. The homozygosity for 10-repeat allele at dopamine transporter gene and dopamine transporter density in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder: relating to treatment response to methylphenidate. Eur. Neuropsychopharmacol 2005, 15: 95-101

Cheuk DK, Wong V. Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. Behav Genet. 2006, 36 (5): 651-659

Inkster B, Muglia P, Jain U, Kennedy JL. Linkage disequilibrium analysis of the dopamine beta-hydroxylase gene in persistent attention deficit hyperactivity disorder. Psychiatr. Genet 2004, 14: 117-120

Izakovičová Hollá L, Fassmann A, Stejskalová A, Znojil V, Vaněk J, Vácha J. Analysis of the Interleukin 6 (IL-6) Gene Promoter Polymorphisms in Czech Patients with Chronic Periodontitis. J Periodontol 2004, 75 (1): 30-36

Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F, Menard J, Corvol P. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. J Hypertens Suppl 1993, 11(5): 80-81

Jaunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Willians CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen . Cell 1992, 71 (1): 169-80

Jiang S, Xin R, Lin S, Qian Y, Tang G, Wang D, Wu X. Linkage studies between attention-deficit hyperactivity disorder and the monoamine oxidase genes.
Am J Med Genet 2001, 105: 783-788

Jönsson EG, Goldman D, Spurlock G, Gustavsson JP, Nielsen DA, Linnoila M, Owen MJ, Sedvall GC. Tryptophan hydroxylase and catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms: relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 1997, 247 (6): 297-302

Kahn RS, Khoury J, Nichols WC, Lanphear BP. Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive, and oppositional behaviors. J Pediatr 2003, 143: 104-110

Kašparovská J, Hříbková H, Hloušková R, Novotný M, Gláslová K, Šimek V, Mikeš V, Zvolský P, Šerý O. TaqI A polymorfismus genu pro dopaminový receptor D2 a alkoholismus v České republice. Česká a slovenská psychiatrie 2003, 99 (1): 5-9

Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, Kirley A, Lowe N, Fitzgerald M, Gill M, Craddock N. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. Mol Psychiatry 2002, 7: 908-912

Kent L, Green E, Hawi Z, Dudbridge F, Lowe N, Raybould R, Langley K, Bray N, Fitzgerald M, Owen MJ, O´Donovan MC, Gill M, Thapar A, Craddock N. Association of the paternally transmitted copy of common Valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic fyctor (BDNF) gene with susceptibility to ADHD. Mol Psychiatry 2005

Kim JW, Kim BN, Cho SC. The dopamine transporter gene and the impulsivity phenotype in attention deficit hyperactivity disorder: A case-control association study in a Korean sample. J Psychiatr Res 2005, [Epub ahead of print].

Kim YS, Leventhal BL, Kim SJ, Kim BN, Cheon KA, Yoo HJ, Kim SJ, Badner J, Cook EH. Family-based association study of DAT1 and DRD4 polymorphism in Korean children with ADHD. Neurosc Lett 2005, 390: 176-181

Kirley A, Hawi Z, Daly G, McCarron M, Mullins C, Millar N, Waldman I, Fitzgerald M, Gill M. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. Neuropsychopharmacology 2002, 27: 607-619

Kirley A, Lowe N, Mullins C, McCarron M, Daly G, Waldman I, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. Phenotype studies of the DRD4 gene polymorphisms in ADHD: Association with oppositional defiant disorder and positive family history. Am J Med Genet 2004, 124B: 111-118

Kotler M, Manor I, Sever Y, Eisenberg J, Cohen H, Ebstein RP, Tyano S. Failure to replicate an excess of the long dopamine D4 exon III repeat polymorphism in ADHD in a family-based study. Am J Med Genet 2000, 96: 278-281

Koukolík F. Lidský mozek. Portál, Praha 2002

Krause KH, Dressel SH, Krause J. Increased striatal transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computer tomography. Neurosci Lett, 2000, 285: 107-110.

Kuperman S, Kramer J, Loney J. Enzyme activity and behavior in hyperactive children grown up. Biol Psychiatry 1988, 24(4): 375-383

Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, McGough JJ, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. Mol Psychiatry 2004, 9: 711-717

Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J, Kajander J, Haaparanta M, Solin O, Syvalahti E, Hietala J. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. Pharmacogenet Genomics 2005, 15 (6): 387-91

LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy J L. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry 1996, 1: 121-124

Lachman H, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski Cl, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics. Description and functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. Pharmacogenetics 6: 243-250

Langley K, Marshall L, van den Bree M, Thomas H, Owen M, O'Donovan M, Thapar A. Association of the dopamine D4 receptor gene 7-repeat allele with neuropsychological test performance of children with ADHD. Am J Psychiatry 2004, 161: 133-138

Langley K, Payton A, Hamshere ML, Pay HM, Lawson DC, Turic D, Ollier W, Worthington J, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. No evidence of association of two 5HT transporter gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder. Psychiatr Genet 2003, 13: 107-110

Langley K, Turic D, Peirce TR, Mills S, Van Den Bree MB, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 130: 7-10

Lanktree M, Muglia P, Squassina A, Krinsky M, Jain U, Macciadi F, Kennedy JM. 2004. A potential role for brain derived neutrophisc factor (BDNF) in adult ADHD. Abstract Am J Med Genet Part B 130B: 96-97

Lawson DC, Turic D, Langley K, Pay HM, Govan CF, Norton N, Hamshere ML, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. Association analysis of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet 2003, 116B: 84-89

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. Annu Rev Neurosci. 1996, 19: 289-317. Review

Lewis M. Child and Adolescent Psychiatry. 1996: 1298

Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Hum Mol Genet 2006, 15 (14) : 2276-2284

Lim MH, Kim HW, Paik KC, Cho SC, Yoon DY, Lee HJ. Association of the DAT1 polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): A family-based approach. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2006, [Epub ahead of print]

Lohoff FW, Sander T, Ferraro TN, Dahl JP, Gallinat J, Berrettini WH. Confirmation of association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 5, 139: 51-53

Lowe N, Kirley A, Hawi Z, Sham P, Wickham H, Kratochvil CJ, Smith SD, Lee SY, Levy F, Kent L, Middle F, Rohde LA, Roman T, Tahir E, Yazgan Y, Asherson P, Mill J, Thapar A, Payton A, Todd RD, Biederman J, Faraone

SV, Gill M. Joint analysis of the DRD5 marker concludes association with attention-deficit/hyperactivity disorder confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. Am J Hum Genet 2004, 74: 348-356

Lynch KR, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. Mol Brain Res 1987, 2:149-158

Lynn DE, Lubke G, Yang M, McCracken JT, McGough JJ, Ishii J, Loo SK, Nelson SF, Smalley SL. Temperament and character profiles and the dopamine D4 receptor gene in ADHD. Am J Psychiatry 2005, 162: 906-913

Maes M, Bosman E, Meltzer HY. Immunoendocrine aspects of major depression. Relationships between plasma interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor, prolactin and cortisol. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 1995, 245: 172-178

Maher BS, Marazita ML, Ferrell RE, Vanyukov MM. Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. Psychiatr Genet 2002, 12: 207-215

Manor I, Corbex M, Eisenberg J, Gritsenkso I, Bachner-Melman R, Tyano S, Ebstein RP. Association of the dopamine D5 receptor with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and scores on a continuous performance test (TOVA). Am J Med Genet 2004, 127b: 73-77

Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, Kotler M. Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet 2001, 105: 91-95

Manor I, Kotler M, Sever Y, Eisenberg J, Cohen H, Ebstein RP, Tyano S. Failure to replicate an association between the catechol-O-methyltransferase polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in a second, independently recruited Israeli cohort. Am J Med Genet 2000, 96: 858-860

Manor I, Tyano S, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, Ebstein RP. The short DRD4 repeats confer risk to attention deficit hyperactivity disorder in a family-based design and impair performance on a continuous performance test (TOVA). Mol Psychiatry 2002, 7: 790-794

Manor I, Tyano S, Mel E, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, Ebstein RP. Family-based and association studies of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): preferential transmission of the long promoter-region repeat and its association with impaired performance on a continuous performance test (TOVA). Mol Psychiatry 2002b, 7: 626-632

McCracken JT, Smalley SL, McGough JJ, Crawford L, Del'Homme M, Cantor RM, Liu A, Nelson SF. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Mol Psychiatry 2000, 5: 531-536

Meador-Woodruft JH, Damask SP, Wang J, Haroutunian V, Davis KL, Watson SJ. Dopamine receptor mRNA expression in human striatum and neocortex. Neuropsychofarmacology, 1996, 15, (1): 17-29

Mercugliano M. MD. What is attention - deficit / Hyperactivity disorder. Pediatric clinics of north america 1995, 46 (5): 832-834

Meredith GE, Callen S, Scheuer DA. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. Brain Res. 2002, 13, 949: 218-27

Mezinárodní klasifikace nemocí. Mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů ve znění desáté decennální revize MKN-10 (kapesní formát). Ústav zdravotnických informací a statistiky, Praha 1992.

Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. Am J Med Genet 2002, 114: 975-979

Mill J, Curran S, Kent L, Richards S, Gould A, Virdee V, Huckett L, Sharp J, Batten C, Fernando S, Simanoff E, Thompson M, Zhao J, Sham P, Taylor E, Asherson P. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and the dopamine D4 receptor gene: evidence of association but no linkage in a UK sample. Mol Psychiatry 2001, 6: 440-444

Mill J, Curran S, Richards S, Taylor E, Asherson P. Polymorphisms in the dopamine D5 receptor (DRD5) gene and ADHD Am J Med Genet 2004, 125B: 38-42

Mill J, Xu X, Ronald A, Curran S, Price T, Knight J, Craig I, Sham P, Plomin R, Asherson P. Quantitative trait locus analysis of candidate gene alleles associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in five genes: DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and 5HT1B. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 133: 68-73

Mills S, Langley K, Van den Bree M, Street E, Turic D, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. No evidence of association between Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Val158Met genotype and performance on neuropsychological tasks in children with ADHD: a case-control study. BMC Psychiatry 2004, 4: 15

Mitchell RJ, Howlett S, Earl L, White NG, McComb J, Schanfield MS, Briceno I, Papiha SS, Osipova L, Livshits G, Leonard WR, Crawford MH. Distribution of the 3' VNTR polymorphism in the human dopamine transporter gene in world populations. Hum Biol 2000, 72 (2): 295-304

Muglia P, Jain U, Macciardi F, Kennedy JL. Adult attention deficit hyperactivity disorder and the dopamine D4 receptor gene. Am J Med Genet. 2000, 96: 273-277

Muller DJ, de Luca V, Sicard T, King N, Strauss J, Kennedy JL. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and rapid-cycling bipolar disorder: family-based association study. Br J Psychiatry 2006, 189: 317-323

Munden A, Arcelus J. Poruchy pozornosti a hyperaktivita. Portál, Praha 2002

Naoe Y, Shinkai T, Hori H, Fukunaka Y, Utsunomiya K, Sakata S, Matsumoto C, Shimizu K, Hwang R, Ohmori O, Nakamura J. No association between the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and schizophrenia in Asian populations: Evidence from a case-control study and meta-analysis. Neurosci Lett 2007, 26, 415: 108-12

Neves-Pereira M, Cheung JK, Pasdar A, Zhang F, Breen G, Yates P, Sinclair M, Crombie C, Walker N, St Clair DM. BDNF gene is a risk factor for schizophrenia in a Scottish population. Mol Psychiatry 2005, 10 (2): 208-212

Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. Am J Hum Genet 2002, 71 (3): 651-655

Noble EP, Blum K, Ritchie T, Montgomery A, Sheridan PJ. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. Arch Gen Psychiatry 1991; 48 (7): 648-654

Noble EP, Noble R, Ritchie T, Syndulko K, Bohlman MC, Noble LA, Zhang Y, Sparkes RS, Grandy DK. D2 dopamine receptor gene and obesity. Int J Eat Disord 1994; 15 (3): 205-217

Norris JG, Benveniste EN. Interleukin-6 production by astrocytes: introduction by the neurotransmitter norephinephrine. J Neurimmunol 1993, 45: 137-146

Obermüller N, Unger T, Culman J, Gohlke P, Bottari SP. Distribution of ANG II receptor subtypes in rat brain nuclei. Neurosci Lett 1991, 132: 11-15

Ohtsuki S. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. Biol Pharm Bull 2004, 27 (10): 1489-1496

Paclt I, Florian J. Deficit pozornosti u hyperaktivních dětí. Čs Psychiatrie 1996, 1:23-40

Paclt I, Florian J, Heller J. Psychofarmakoterapie dětského a dorostového věku, Praha 1998.

Paclt I, Uhlíková P, Florian J. Farmakoterapie - Hyperkinetický syndrom v dětském věku. Remedia 1999, 9 (6): 333-344

Palmer CG, Bailey JN, Ramsey C, Cantwell D, Sinsheimer JS, Del'Homme M, McGough J, Woodward JA, Asarnow R, Asarnow J, Nelson S, Smalley SL. No evidence of linkage or linkage disequilibrium between DAT1 and attention deficit hyperactivity disorder in a large sample. Psychiatr Genet 1999, 9: 157-160

Park L, Nigg JT, Waldman ID, Nummy KA, Huang-Pollock C, Rappley M, Friderici KH. Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. Mol Psychiatry 2005, 10: 572-580

Payton A, Holmes J, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, O'Donovan M, Owen M, Ollier W, Worthington J, Thapar A. Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study. Am J Med Genet 2001, 105: 464-470

Payton A, Holmes J, Barrett JH, Sham P, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Worthington J, Thapar A. Susceptibility genes for a trait measure of attention deficit hyperactivity disorder: a pilot study in a non-clinical sample of twins. Psychiatry Res, 2001, 105: 273-278

Pickering M, Cumiskey D, O´Connor JJ. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. Exp Physiol 2005, 90, (5): 663-70

Prekopová J, Schweizerová Ch. Neklidné dítě. Portál, Praha 1994

Pohjalainen T, Rinne JO, Nagren K, Lehikoinen P, Anttila K, Syvalahti EK, Hietala J. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. Mol Psychiatry 1998; 3 (3): 256-260

Qian Q, Wang Y, Zhou R, Li J, Wang B, Glatt S, Faraone SV. Family-based and case-control association studies of catechol-O-methyltransferase in attention deficit hyperactivity disorder suggest genetic sexual dimorphism. Am J Med Genet 2003, 118B: 103-109

Qian Q, Wang Y, Zhou R, Yang L, Faraone SV. Family-based and case-control association studies of DRD4 and DAT1 polymorphisms in Chinese attention deficit hyperactivity disorder patients suggest long repeats contribute to genetic risk for the disorder. Am J Med Genet 2004, 128B: 84-89.

Qian Q, Wang Y, Zhou R, Yang L, Li J. Association studies of G352A polymorphism of dopamine transporter gene in Han Chinese attention deficit hyperactivity disorder patients. Beijing Da Xue Xue Bao 2004, 36: 626-629

Quadri F, Culman J, Veltmar A, Maas K, Rascher W, Unger T. ANG II-induced vasopresin release is mediated through alpha 1 adrenoreceptors and angiotensin II AT1 receptors in the supreoptic nucleus. J Pharmacol Exp Ther 1993, 267: 567-574

Retz W, Thome J, Blocher D, Baader M, Rosler M. Association of attention deficit disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin transporter promoter region polymorphism. Neurosci Lett 2002, 22, 319 (3): 133-6

Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res 1992, 25 (6): 1433

Rogeness GA, Hernandez JM, Macedo CA, Mitchell EL. Biochemical differences in children with conduct disorder socialized and undersocialized. Am J Psychiatry 1982, 139(3): 307-11

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. Am J Med Genet 2001, 105: 471-478

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. Am J Med Genet 2002, 114: 154-158

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? Am J Med Genet 2003, 120B: 116-120

Rosa A, Cuesta MJ, Fatjo-Vilas M, Peralta V, Zarzuela A, Fananas L. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with risk for psychosis: evidence from a family-based association study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2006, 5, 141: 135-138

Rosypal S. Úvod do molekulární biologie. Druhé vydání, díl třetí, PřF MU, Brno 1997

Rosypal S, Doškář J, Pantůček R, Kailerová J, Relichová J, Růžičková V, Šmarda J ml. Šmarda J, Štěpán J. Terminologie molekulární biologie. PřF MU, Brno 2001

Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry 1998, 3: 419-426.

Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. Mol Psychiatry 2001, 6: 429-433.

Rowe DC, Van den Oord EJ, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Gilson M, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. The DRD2 TaqI polymorphism and symptoms of attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry 1999, 4: 580-586

Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235-->Thr allele of the human angiotensinogen gene. Hum Mol Genet 1993, 2 (5): 609-610

Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. Functional polymorphism within the promotor of the serotonin transporter gene is associated with severe hyperkinetic disorder. Mol Psychiatry 2001, 6 (2): 235-238

Shinohara M, Mizushima H, Hirano M, Shioe K, Nakazawa M, Hiejima Y, Ono Y, Kanba S. Eating disorders with binge-eating behaviour are associated with the s allele of the 3'-UTR VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene. J Psychiatry Neurosci 2004, 29 (2): 134-137

Schanberg SM, Stone RA, Kirshner N, Gunnells JC, Robinson RR. Plasma dopamine beta-hydroxylase: a possible aid in the study and evaluation of hypertension. Science, 1974, 183: 523-525

Schimmelmann BG, Friedel S, Dempfle A, Warnke A, Lesch KP, Walitza S, Renner TJ, Romanos M, Herpertz-Dahlmann B, Linder M, Schafer H, Seitz C, Palmason H, Freitag C, Meyer J, Konrad K, Hinney A, Hebebrand J. No evidence for preferential transmission of common valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) in ADHD. J Neural Transm. 2007, 114 (4): 523-526

Simsek M, Al-Sharbati M, Al-Adawi S, Ganguly SS, Lawatia K. Association of the risk allele of dopamine transporter gene (DAT1*10) in Omani male children with attention-deficit hyperactivity disorder. Clin Biochem 2005, 38: 739-742

Skidgel RA, Defendini R, Erdos EG. Angiotensin I concerting enzyme end its role in neuropeptide metabolism. Neuropeptides and their peptidases, Ellis Horwood, New York 1987

Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neutrophic factor. Mol Psychiatry 2002, 7 (6): 579-593

Smalley SL, Bailey JN, Palmer CG, Cantwell DP, McGough JJ, Del'Homme MA, Asarnow JR, Woodward JA, Ramsey C, Nelson SF. Evidence that the dopamine D4 receptor is a susceptibility gene in attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatry 1998, 3: 427-430

Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, Navia BA. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. Am J Med Genet 2003, 119B: 77-85.

Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. Behav Brain Res. 1998, 94 (1): 127-152, Review

Song C, Leonard BE. Základy psychoneuroimunologie, Artax Brno 2002

Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FAO. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. J Comp Neurol 1992, 316: 467-484

Song C, Merali Z, Anisman H. Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. Neuroscience 1999, 88 (3): 823-836

Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone SV. Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2000, 39 (11): 1432-1437

Stein MA, Waldman ID, Sarampote CS, Seymour KE, Robb AS, Conlon C, Kim SJ, Cook EH. Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. Neuropsychopharmacology 2005, 30: 1374-1382

Stevenson J, Langley K, Pay H, Payton A, Worthington J, Ollier W, Thapar A. Attention deficit hyperactivity disorder with reading disabilities: preliminary genetic findings on the involvement of the ADRA2A gene. J Child Psychol Psychiatry 2005, 46: 1081-1088

Stornetta RL, Lynch KR, Hawelu-Johnson CL, Guyenet P. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. Science 1988, 242: 1444-1446

Strauss J, Barr CL, George CJ, Devlin B, Vetro A. Brain-derived neurotrophic factor variants are associated with childhood-onset mood disorder: confirmation in a Hungarian sample. Mol Psychiatry. 2005, 10 (9): 861-867

Sunohara GA, Roberts W, Malone M, Schachar RJ, Tannock R, Basile VS, Wigal T, Wigal SB, Schuck S, Moriarty J, Swanson JM, Kennedy JL, Barr CL. Linkage of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit/hyperactivity disorder. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2000, 39: 1537-1542

Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wiga T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ, Wigal S. Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. Mol Psychiatry 1998, 3: 38-41

Šerý O, Hladilová R, Novotný M, Hříbková H, Znojil V, Zvolský P. Association between -174 G/C polymorphism of interleukin-6 gene and alcoholism. Acta Neuropsychiatrica 2003, 15 (5): 257-261

Šerý O, Hladilová R, Zvolský P. Gen pro COMT ovlivňuje dispozice k alkoholizmu u mužů České republiky. Česká a slovenská psychiatrie 2004, 100 (6): 339-342

Šerý O, Slabý O, Zvolský P. Genetika alkoholizmu II: souhrn asociačních studií z let 1990-2002 - dopaminové receptory. Česká a slovenská psychiatrie 2004, 100 (5): 284-294

Šerý O, Štaif R, Didden W. Neurobiologie hyperkinetické poruchy. Česká a slovenská psychiatrie, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, Praha, 2007, 103, 1: 28-46, Review

Štaif R. Molekulární příčiny hyperkinetické poruchy v dětském věku. Diplomová práce PřF MU, Brno 2003

Štaif R. Molekulárně-genetická podstata odlišného vnímání akutní bolesti. Rigorózní práce PřF MU, Brno 2006

Taerk E, Grizenko N, Ben Amor L, Lageix P, Mbekou V, Deguzman R, Torkaman-Zehi A, Ter Stepanian M, Baron C, Joober R. Catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158 Met polymorphism does not modulate executive function in children with ADHD. BMC Med Genet 2004, 5: 30

Tahir E, Curran S, Yazgan Y, Ozbay F, Cirakoglu B, Asherson PJ. No association between low- and high-activity catecholamine-methyl-transferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. Am J Med Genet 2000, 96: 285-288

Tahir E, Yazgan Y, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson PJ. Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. Mol Psychiatry 2000, 5: 396-404

Thapar A, Holmes J, Poulton K, Harrington R. Genetic basis of attention deficit hyperactivity. British Journal of Psychiatry 1999, 174:105-111

Theiner P. Kognitivní funkce jako endofenotypy hyperkinetické poruchy v dětství. Disertační práce, Psychiatrická klinika LF MU, Brno 2006

Thomas WF, Sernia C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain. Neuroscience 1988, 25: 319-341

Todd RD, Jong YJ, Lobos EA, Reich W, Heath AC, Neuman RJ. No association of the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism with ADHD subtypes in a population sample of twins. Am J Med Genet 2001, 105: 745-748

Todd RD, Neuman RJ, Lobos EA, Jong YJ, Reich W, Heath AC. Lack of association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with ADHD subtypes in a population sample of twins. Am J Med Genet 2001, 105: 432-438

Torchinsky A, Shepshelovich J, Orenstein H, Zaslavsky Z, Savion S. TNF-alpha protects embryos exposed to developmental toxicants. Am J Reprod Immunol 2003, 49 (3): 159-168

Tsai SJ. Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: Clinical and therapeutic implications. Med Hypotheses 2007, 68 (4): 896-869.

Tsai SJ. Attention-deficit hyperactivity disorder and brain-derived neurotrophic factor: a speculative hypothesis. Med Hypotheses 2003, 60 (6): 849-851.

Turic D, Langley K, Williams H, Norton N, Williams NM, Moskvina V, Van den Bree MB, Owen MJ, Thapar A, O'Donovan MC. A family based study implicates solute carrier family 1-member 3 (SLC1A3) gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. Biol Psychiatry 2005, 57: 1461-1466

Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. Genomics 1992, 14: 1104-1106

van der Meulen EM, Bakker SC, Pauls DL, Oteman N, Kruitwagen CL, Pearson PL, Sinke RJ, Buitelaar JK. High sibling correlation on methylphenidate response but no association with DAT1-10R homozygosity in Dutch sibpairs with ADHD. J Child Psychol Psychiatry 2005, 46: 1074-80

Veltmar A, Culman J, Quadri F, Rascher W, Unger T. Involvement of adrenergic and angiotensinergic receptors in the paraventrical nucleus in the ANG II-induced vasopressin release. J Pharmacol Exp 1992, 263: 1253-1260

Vuchetich JP, Dunnette J, Lunetta KL, Weinshilboum RM, Price RA. Inheritance of human plasma dopamine-beta-hydroxylase. Genet Epidemiol 1991, 8:237-251

Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, Cleveland HH, Sanders ML, Gard JM, Stever C. Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. Am J Hum Genet 1998, 63: 1767-1776

Wang B, Wang Y, Zhou R, Li J, Qian Q, Yang L, Guan L, Faraone SV. Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr Genet 2006, 141: 130-134

Wei J, Ramchard CN, Hemmings GP. Possible control of dopamine beta-hydroxylase via a codominant mechanism associated with the polymorfic (GT)n repeat at its gene locus in healthy individuals.Hum Genet 1997, 99: 52-55

Westmoreland SV, Alvarez X, deBakker C, Aye P, Wilson ML, Williams KC, Lackner AA. Developmental expression patterns of CCR5 and CXCR4 in the rhesus macaque brain. J Neuroimmunol 2002, 122: 146-58

Wigg K, Zai G, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Barr CL. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine Beta-hydroxylase. Am J Psychiatry, 2002, 159, 1046-1048

Winsberg BG, Comings DE. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1999, 38: 1474-1477

Wohl M, Purper-Ouakil D, Mouren MC, Ades J, Gorwood P. Meta-analysis of candidate genes in attention-deficit hyperactivity disorder. Encephale. 2005, 31: 437-47

Xu C, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Barr CL. Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. Am J Med Genet 2001, 105: 159-62

Xu X, Mill J, Chen CK, Brookes K, Taylor E, Asherson P. Family-based association study of serotonin transporter gene polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder: no evidence for association in UK and Taiwanese samples. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005, 139: 11-13

Xu X, Mill J, Zhou K, Brookes K, Chen CK, Asherson P. Family-based association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in UK and Taiwanese samples. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2007, 5 144 (1): 83-86

Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2007, [Epub ahead of print]

Zalcman S, Green-Johnson JM, Murray L, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. Brain Res. 1994, 18, 643: 40-49

Zametkin AJ, Nordhal TE. Cerebral glukose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset. N. Engl. J. Med 1990, 323:1361-1366

Zametkin AJ, Liebernauer LL, Fitzgerald GA. Brain metabolism in teenagers with attention deficit hyperactivity disorder. Arch Gen Psychiatry 1993, 50:333-340

Zametkin AJ, Rapoport JL. Noradrenergic hypothesis of ADHD and hyperactivity: A critical rewiew. Psychopharmacology, The third Generation of Progress. Raven Press, New York, 1999, 837-842

Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder in children Beijing Da Xue Xue Bao 2004, 36, 290-3

Zhang XN, Ruan LM, Le YP, Zhang Y. Association analysis between attention-deficit hyperactivity disorder and Val158Met polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2003, 20: 322-324

Zoroglu SS, Erdal ME, Alasehirli B, Erdal N, Sivasli E, Tutkun H, Savas HA, Herken H. Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of tandem repeat polymorphism in attention deficit hyperactivity disorder. Neuropsychobiology 2002, 45: 176-181

11. Internetové zdroje

http://www.nimh.nih.gov/healthinformation/adhdmenu.cfm.

http://www.cdc.gov/ncbddd/adhd/

http://www.understandingadhd.com/?spg=PPC&sky=hgy|goo|understandingadhd|adhd|adhd+general+words.

http://www.adhd.org.nz/neuro1.html

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed

http://www.vscht.cz/trp/UTRP-cs/Vyzkum/Vybaveni/HPLC.html

http://www.mobio.com

http://pn.psychiatryonline.org/cgi/content/full/39/1/26

12. Publikace a výstupy autora ke studii

Štaif R, Drtílková I, Theiner P, Didden W, Pitelová R, Mikeš V, Šerý O. Two candidate gene polymorphisms in ADHD children: a case-control study of catechol-o-methyltransferase (COMT) and monoamine oxidase B (MAOB) genes. Archives of Medical Science, Poland, Termedia Publishing House 2006, 2, 4: 235-239. 2006.

Štaif R, Šerý O, Pitelová R, Lochman J, Mikeš V, Drtílková I, Theiner P, Didden W. A case-control study of the relationship between 13 candidate genes and ADHD. American Journal of Medical Genetics, Hoboken, NJ, Wiley-Liss, Inc. 2006, 141B, 7: 729-730.

Štaif R, Drtílková I, Pitelová R, Šerý O, Theiner P. Molecular biology of ADHD: an association study of DAT1, DRD2, DRD4, COMT and MAOB gene polymorphisms with hyperactive disorder in children. Abstract book 3rd International Biology Students Conference 2006, Riga, Latvia, LUBSA 2006, 47-47.

Šerý O, Drtílková I, Theiner P, Pitelová R, Štaif R, Znojil V, Lochman O, Didden W. Polymorphism of DRD2 gene and ADHD. Neuroendocrinology Letters, Sweden, Stockholm, Maghira and Maas Publications 2006, 27, 1: 236-240

Šerý O, Hrazdilová O, Didden W, Klenerová V, Štaif R, Znojil V, Ševčík P. The association of monoamine oxidase B functional polymorphism with postoperative pain intensity. Neuroendocrinology Letters, Sweden, Stockholm, Maghira and Maas Publications 2006, 27, 3: 333-337.

Šerý O, Štaif R, Pitelová R, Lochman J, Mikeš V, Drtílková I, Zvolský P, Didden W. The gene for interleukin 6: the candidate gene for neuropsychiatric illness? American Journal of Medical Genetics, Hoboken, NJ, Wiley-Liss, Inc. 2006, 141B: 728-728.

Šerý O, Štaif R, Didden W. Neurobiologie hyperkinetické poruchy. Česká a slovenská psychiatrie, Praha, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně 2007, 103, 1: 28-46, Review.

Theiner P, Drtílková I, Šerý O, Uhrová A, Balaštíková B, Štaif R. Polymorfismy genů pro dopaminové receptory D2 a D4 a pro dopaminový transportér (DAT) u českých hyperkinetických chlapců nesouvisejí s kognitivní poruchou. Česká a slovenská psychiatrie, Praha, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně 2006, 102, 6: 307-318.

Theiner P. Drtílková I, Štaif R, Šerý O, Uhrová A. Kognitivní funkce jako endofenotypy ADHD v dětském věku. Psychiatrie, Praha, Tigis, 2006, 10, 1: 74-74.

Štaif R, Theiner P, Pitelová R, Drtílková I, Šerý O. Polymorfizmus genu pro dopaminový přenašeč a jeho vztah k patogenezi ADHD. Psychiatrie, Praha, Tigis 2006, 10, 1: 73-73.

Drtílková I, Šerý O, Žáčková M, Štaif R, Theiner P. Reakce na methylfenidát v závislosti na genotypu u dětí s ADHD. Psychiatrie, Praha, Tigis 2006, 10, 1: 55-55.

Štaif R, Šerý O, Pitelová R, Theiner P, Drtílková I. Genetické dispozice ADHD: vztah genů pro COMT, ACE a AGT k hyperkinetické poruše v dětském věku. Konference mladých lékařů, Brno, Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně 2005, 30-30.

Drtílková I, Šerý O, Theiner P, Uhrová A, Štaif R. Klinická a molekulárně genetické studie u chlapců s hyperkinetickou poruchou v ČR. The scientific proceedings of the 2005 joint annua. Toronto, Canada, Neal Ryan 2005, 1.

Štaif R, Pitelová R, Theiner P, Drtílková I, Šerý O. The association of IL-6 gene polymorphism with ADHD in children. IX. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno, Masarykova univerzita v Brně 2005: 29-30.

Štaif R, Šerý O, Hladilová R, Theiner P, Drtílková I. DNA polymorfizmus dopaminového receptoru D2 má vztah k hyperkinetické poruše. Česko-slovenská studentská vědecká konference, Brno, Masarykova univerzita v Brně 2004: 82-82.

Šerý O, Theiner P, Hladilová R, Štaif R, Balaštíková B, Drtílková I. Geny pro IL-6 a DRD2 souvisejí s hyperkinetickou poruchou. Česká a slovenská psychiatrie, Praha, Česká lékařská společnost J.E. Purkyně 2003, 99, 8: 404-409.

Štaif R, Šerý O, Hladilová R, El Khaled Y, Šimek V, Hrazdilová O, Ševčík P. Asociačníé studie vztahu polymorfizmu genu pro CCR-5 ke vnímání akutní bolesti. VII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, Masarykova univerzita 2003: 10-11.

Štaif R, Šerý O, Hladilová R, Šimek V, El Khaled Y, Hrazdilová O, Ševčík P. Asociační studie vztahu polymorfizmů genů pro TNF alfa a ACE ke vnímání akutní bolesti. Psychiatrie, Praha, Tigis, 2003 7 (1): 45-45.

Šerý O, Hladilová R, Štaif R, Ševčík P, Hrazdilová O. Gen pro IL-6 má vztah ke vnímání akutní bolesti. Psychiatrie, Praha, Tigis 2003, 7, (1): 43-44.

Štaif R, Šerý O, Hladilová R, Ševčík P, Hrazdilová O. Gen pro IL-6 má vztah ke vnímání akutní bolesti. http://hema.uhkt.cz/forms/konfprs.sqw?P=1406. Praha, SLG 2002.