



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Možný vliv genových variant v genu *COMT* na projevy ADHD a/nebo ASD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Miroslava Šmelcová

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Možný vliv genových variant v genu COMT na projevy ADHD a/nebo ASD*“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2024

Poděkování

Děkuji své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a vytvoření kvalitního prostředí pro zpracování této bakalářské práce. Dále velký dík patří všem, kteří se jakýkoliv způsobem podíleli na vzniku této práce.

Možný vliv genových variant v genu *COMT* na projevy ADHD a/nebo ASD

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na prověření vlivu genu *COMT* u dvou onemocnění: ADHD (porucha pozornosti s hyperaktivitou) a ASD (porucha autistického spektra). Porucha autistického spektra je behaviorální syndrom, jehož základní charakteristikou je oslabená sociální interakce, narušená komunikace a abnormality v chování, zájmech a hře. ADHD je neurovývojové onemocnění, které způsobuje problémy hlavně v oblasti soustředění, přizpůsobení aktivity a přehnané impulsivity.

Obě zmíněná onemocnění mohou být geneticky podmíněná, a proto je tato práce zaměřena na výzkum frekvenčního zastoupení genových variant zodpovědných za nízkou nebo vysokou hladinu dopaminu u osob s poruchou autistického spektra a s poruchou pozornosti s hyperaktivitou ve srovnání s kontrolní populací. Genetickou analýzu jsme prováděli u dvou polymorfismů genu *COMT* a to u známějšího rs4680 a dále u rs4818. Samotná analýza zahrnovala izolaci DNA, amplifikaci metodou PCR, kontrolu PCR produktu pomocí gelové elektroforézy, přečištění a sekvenaci PCR produktu a v posledním kroku vyhodnocení sekvence DNA. Na základě našich výsledků v laboratoři jsme nepotvrdili hypotézu, že výše uvedené polymorfismy v genu *COMT* představují rizikový faktor pro ASD a ADHD.

Naše výsledky pravděpodobně ovlivnil malý počet osob ve sledovaných skupinách, ale přesto i tato práce pomohla malým fragmentem k pochopení příčiny komplikované patologie těchto onemocnění.

Klíčová slova

Gen *COMT*; rs4680; rs4818; poruchy autistického spektra; poruchy pozornosti s hyperaktivitou

Possible influence of gene variants in the COMT gene on ADHD and/or ASD symptoms

Abstract

This work is focused on examining the influence of the COMT gene in two diseases: ADHD (attention deficit hyperactivity disorder) and ASD (autism spectrum disorder). Autism spectrum disorder is a behavioral syndrome characterized by impaired social interaction, impaired communication, and abnormalities in behavior, interests, and play. ADHD is a neurodevelopmental disease that causes problems mainly in the area of concentration, adjustment of activity and excessive impulsivity.

Both mentioned diseases can be genetically conditioned, and therefore this work is focused on researching the frequency representation of gene variants responsible for low or high levels of dopamine in people with autism spectrum disorder and with attention deficit hyperactivity disorder compared to the control population. We performed a genetic analysis on two polymorphisms of the COMT gene, namely the more well-known rs4680 and rs4818. The analysis itself included DNA isolation, PCR amplification, control of the PCR product using gel electrophoresis, purification and sequencing of the PCR product and, in the last step, evaluation of the DNA sequence. Based on our results in the laboratory, we did not confirm the hypothesis that the above polymorphisms in the COMT gene represent a risk factor for ASD and ADHD.

Our results were probably influenced by the small number of people in the monitored groups, but even this work helped in a small fragment to understand the cause of the complicated pathology of these diseases.

Key words

Gen *COMT*; rs4680; rs4818; autism spectrum disorders; attention deficit hyperactivity disorder

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární rešerše	9
2.1	Neurochemie.....	9
2.1.1	Dopamin.....	9
2.1.2	Noradrenalin	10
2.1.3	Adrenalin	11
2.1.4	Katabolismus katecholaminů	11
2.2	Enzymy COMT	12
2.2.1	Struktura	12
2.2.2	Fyziologická funkce enzymu COMT.....	12
2.2.3	Struktura, exprese a lokalizace genu COMT.....	13
2.2.4	Genová rozmanitost v genu COMT	14
2.2.4.1	Polymorfismus rs4680.....	15
2.2.4.2	Polymorfismus rs4818.....	16
2.3	ADHD a polymorfismus COMT	17
2.3.1	ADHD: pojem, etiologie a patologie.....	17
2.3.2	Vliv polymorfismu genu COMT na ADHD.....	18
2.3.3	Léčba ADHD.....	19
2.4	ASD a polymorfismus COMT	20
2.4.1	ASD, pojem a etiologie.....	20
2.4.2	Vliv polymorfismu COMT na ASD.....	21
2.4.3	Léčba ASD.....	22
3	Cíl práce a hypotéza	24
3.1	Cíl práce.....	24
3.2	Hypotéza	24
4	Metodika	25
4.1	Materiál a jeho odběr	25
4.2	Pracovní postup	25
4.2.1	Izolace	25
4.2.2	Měření kvantity DNA.....	26
4.2.3	Amplifikace metodou PCR.....	26
4.2.4	Kontrola PCR produktu gelovou elektroforézou	27
4.2.5	Přečištění PCR produktu pomocí SAP-Exo Kit	28

4.2.6	Sekvenace.....	28
5	Výsledky	29
5.1	Kontrola PCR produktu pomocí gelové elektroforézy	29
5.2	Výsledek sekvenace PCR produktu	29
5.3	Vliv polymorfismu genu COMT na ADHD.....	30
5.3.1	Výsledná evaluace genotypů SNP rs4680 u ADHD.....	30
5.3.2	Výsledná evaluace genotypů SNP rs4818 u ADHD.....	33
5.4	Vliv polymorfismu genu COMT na ASD	35
5.4.1	Výsledná evaluace genotypů SNP rs4680 u ASD.....	35
5.4.2	Výsledná evaluace genotypů SNP rs4818 u ASD.....	37
5.5	Vliv haplotypu na ADHD a ASD.....	39
6	Diskuze	41
6.1	Vliv polymorfismu na ADHD.....	41
6.2	Vliv polymorfismu genu COMT na ASD	43
6.3	Propojení vlivu polymorfismu genu COMT na ASD a ADHD	44
7	Závěr.....	47
8	Seznam použité literatury	48
9	Seznam obrázků	62
10	Seznam tabulek.....	64
11	Seznam zkratk	65

1 Úvod

Poruchy autistického spektra a poruchy pozornosti s hyperaktivitou jsou neurovývojové choroby, které jsou spojeny s odchylkami v regulaci na úrovni neurotransmiterových systémů. V současné době počet diagnostikovaných osob s PAS nebo ADHD stále závratným tempem přibývá. Přesná příčina vzniku je stále zahalena tajemstvím a někteří odborníci označují současnou situaci za epidemii autismu. Na jejich vzniku se podílí široká škála faktorů, mezi nimiž jsou i dědičné faktory. Předpokládá se, že znalost genových variant nám pomůže přispět k pochopení komplexnosti těchto onemocnění. V centru pozornosti experimentů je zejména složitý vztah mezi aktivitou enzymu *COMT* ovlivňující hladinu dopaminu v mozkové kůře a genetickou variabilitou genu *COMT*. Naprostá většina publikovaných studií o genu *COMT* se věnuje vlivu rs4680 na ASD a ADHD. Tato práce se zaměřila nejen na rs4680, ale i na polymorfismus rs4818, protože bylo zjištěno, že právě rs4818 by mohl být daleko více zodpovědný za příznaky onemocnění. Proto u prověřovaných osob s ADHD a s ASD bylo vyšetřováno frekvenční zastoupení obou genových variant zodpovědných za nízkou nebo vysokou hladinu dopaminu ve srovnání s kontrolní populací a diskutován možný vliv genotypů na rozvoj poruch autistického spektra a poruch pozornosti s hyperaktivitou

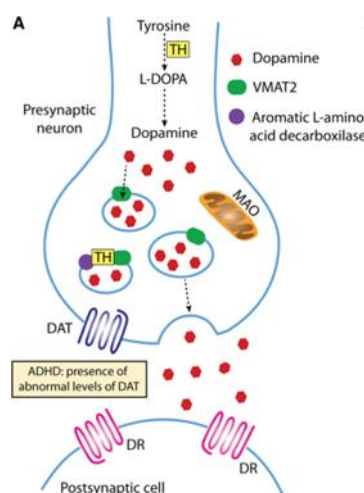
2 Literární řešerše

2.1 Neurochemie

Určité neurologické a neuropsychiatrické onemocnění, jako je například PAS nebo ADHD, jsou často vysvětlovány patologickou změnou v neurotransmisi. Změny probíhají hlavně na úrovni abnormální koncentrace neurotransmiterů tzv. katecholaminů. Katecholaminy jsou odvozené od aminokyseliny tyrosinu a zahrnují tyto tři esenciální neurotransmitery: noradrenalin (norepinefrin), adrenalin (epinefrin) a dopamin (Fernstrom a Fernstrom, 2007).

2.1.1 Dopamin

Hlavní monoaminový neurotransmitter dopamin má zásadní roli v regulaci motorických neuronů, ovlivňuje prostorovou paměť, motivaci, odměnu a potěšení (Klein et al., 2019). Dopamin je syntetizován především z tyrosinu (Fernstrom a Fernstrom, 2007). Primární metabolická cesta zahrnuje dvoustupňovou syntézu v cytosolu. Tyrosinhydroxyláza přeměňuje tyrosin na levodopu (L-DOPA, L-dihydroxyfenilalanin) pomocí enzymu tetrahydrobiopterinu, kyslíku (O₂) a železa (Fe²⁺) jako kofaktorů. Poté může být L-DOPA převeden na dopamin za přítomnosti enzymu aromatická L-aminoskyselinová dekarboxyláza (DOPA dekarboxyláza), který obsahuje pyridoxal fosfát jako kofaktor. Dopamin je přenesen z cytosolu do synaptických vezikul, kde je uložen do té doby, než je uvolněn do synaptické štěrby (Liang at al., 2004).



Obrázek 1: Syntéza dopaminu a jeho uvolnění do synaptické štěrby. Upraveno dle Klein et al., 2019.

Dopamin je v kyselém prostředí synaptického vesikulu stabilizován a nedochází zde k jeho oxidaci (Guillot a Miller 2009). V nekyselém mikroprostředí je dopamin citlivý na oxidaci nebo se za přítomnosti monoaminoxidázy B (MAO-B) konvertuje na 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd (DOPAL), který se přednostně přeměňuje na 3,4-dihydroxyfenylacetic kyselinu (DOPAC) enzymem aldehyddehydrogenáza (ALDH). V dalším kroku může enzym katechol-O-methyltransferáza (COMT) degradovat DOPAC na kyselinu homovanilovou (HVA) nebo se může také přímo přeměňovat dopamin na 3-methoxytyramin (Eisenhofer et al., 2004).

Dopamin nemůže snadno procházet hematoencefalickou bariérou sám, a proto musí být syntetizován v mozkové tkáni. Protože dopamin funguje jako neurochemický modulátor ve více oblastech mozku, kde má potenciál ovlivnit mnoho aspektů mozkové aktivity. V mozku je několik center dopaminu; hlavní jsou ventrální tegmentální oblast, která směřuje směrem k *nucleus accumbens* a prefrontální kůra podél oblasti *substantia nigra*, která tvoří část bazálních ganglií (Gasmi et al., 2022). Mnohá onemocnění jsou právě výsledkem dysfunkce dopaminu v jednotlivých částech mozku.

V důsledku degradace dopaminu v *substantia nigra* lidé vykazují emoční, kognitivní a pohybové abnormality. Tato patogeneze je častá u pacientů s Parkinsonovou chorobou (Klein et al., 2019). Také u schizofrenie byly zjištěny patologické změny v koncentraci dopaminu ve frontálních lalocích, což u těchto pacientů vede k psychotickým epizodám (Seeman a Kapur, 2000). Snížení hladiny dopaminu je základem onemocnění, jako je porucha pozornosti/hyperaktivita (ADHD). Kromě toho výzkum v posledních několika desetiletích ukázal, že dopamin může mít podstatný vliv na funkci imunitních buněk jak v CNS, tak na periférii. Dopaminergní imunomodulace ovlivňuje vrozenou i adaptivní imunitu a stává se stále důležitějším cílem pro objevování léků a léčbu onemocnění (Channer et al., 2023).

2.1.2 Noradrenalin

Noradrenalin (norepinefrin) má stěžejní roli v centrálním nervovém systému, kde se účastní pochodů ovlivňující chování člověka (Prokopová, 2010). Je syntetizován z dopaminu v cytoplasmě noradrenergických neuronů enzymem dopamin- β -hydroxylázou, který je lokalizován na membráně sekrečních vezikul (Mravec, 2007). Noradrenalin má mnoho uplatnění v CNS. Aktivace jeho receptorů může mít inhibiční i excitační účinky na chování v závislosti na exponované mozkové struktuře, typu a hustotě receptorů a

načasování aktivace. Těla noradrenergických neuronů leží na pomezí prodloužené míchy a Valerova mostu a jejich axony sahají do většiny oblastí mozku (Prokopová, 2010). Noradrenergí axony tvoří běžně terminální synapse s cílovými neurony, ale také specifické synapse. V průběhu akčního potenciálu se u těchto typů synapse noradrenalin uvolňuje parakrinně do mezibuněčného prostoru a tímto způsobem může ovlivnit větší množství neuronů a gliových buněk. Právě zmíněná modulace se uplatňuje ve zvýšené míře v prefrontálním kortexu a hipokampu, mozkových strukturách úzce spojených s pamětí (Prokopová, 2010). Mnozí autoři spojují abnormality v těchto částech mozku s neurovývojovými onemocněními jako je ASD (Pardo a Eberhart, 2007; Marotta at al., 2020) nebo ADHD (Dean et al., 2020).

Noradrenalin ovlivňuje bdělost, pozornost, emoce, učení, paměť a motoriku. Jakákoliv porucha jeho funkce se může projevit hyperkinetickým syndromem (ADHD) (Mravec, 2007; Prokopová, 2010).

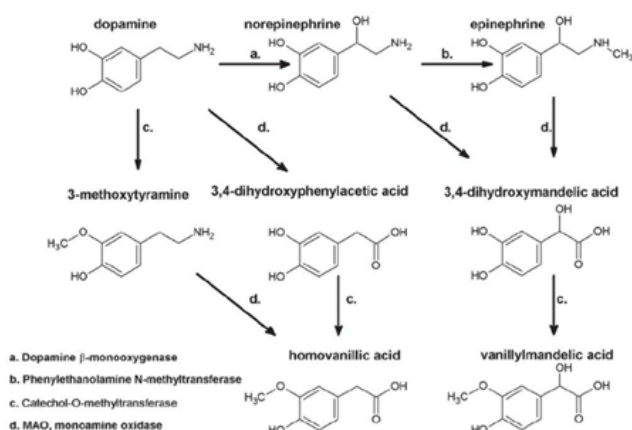
2.1.3 Adrenalin

Adrenalin (epinefrin) se syntetizuje z noradrenalinu. Noradrenalin se transportuje z vezikul do cytoplasmy a enzym fenyletanolamin-N-methyltransferáza ho přeměňuje na adrenalin. Hlavním zdrojem adrenalinu v organismu jsou chromafinní buňky dřeně nadledvinek. Adrenalin uvolněný z nadledvinek stimuluje adrenergí receptory buněk jednotlivých orgánů (Mravec, 2007). Adrenalin byl také lokalizován v neuronech v dolní části mozkového kmene v centrální nervové soustavě. Adrenalinergické neurony se v CNS nevyskytují tak hojně jako noradrenergí neurony, a proto koncentrace adrenalinu není tak vysoká ve srovnání s dopaminem a noradrenalinem (Eisenhofer et al., 2004). Předpokládá se, že adrenalin řídí bdělost a odpovědi organismu ve stresových situacích (reakci boj a uteč) (Fernstrom a Fernstrom, 2007).

2.1.4 Katabolismus katecholaminů

Katecholecholaminy jsou deaktivovány L-monoaminoxidázou (MAO) a katechol-O-methyltransferázou (COMT), což vede k syntéze kyseliny homovanilové z dopaminu nebo kyseliny vanilmandlové z adrenalinu na noradrenalin. Alternativně, jak je ukázáno u metabolismu dopaminu, může být pořadí reakce změněno tak, že nejprve působí COMT a poté MAO. Degradční produkty jsou následně vylučovány močí. Celý katabolismus je

přehledně zakreslen na obr. 2 a současně je zde přesně ukázáno, kde a jak působí enzym *COMT* (Slominkski et al., 2012).



Obrázek 2: Katabolismus katecholaminů. Častým cílem léků, které jsou předepisovány pacientům s neuropsychiatrickými poruchami, jsou právě výše zmíněné regulační katabolické dráhy katecholaminů. Léky přímo působí na dopaminergní dysregulaci (Finberg, 2019).

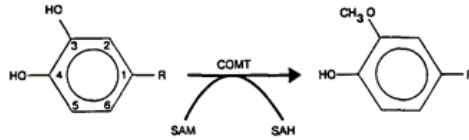
2.2 Enzymy *COMT*

2.2.1 Struktura

Enzym *COMT* je jednodoménový α/β -složený protein, který se skládá z centrálního smíšeného sedmivláknového β -listu, který je obtočen osmi α -helixy (Sun et al., 2013). Aktivním místem *COMT* je mělká rýha umístěná ve vnější části na povrchu enzymu a skládá se z vazebné domény S-adenosyl-L-methionin-(AdoMet) a z katalytického místa. Katalytické místo, na němž probíhá O-methylace, se skládá z několika aminokyselin, které hrají významnou roli při vazbě substrátu, vody a Mg^{2+} . Ionty Mg^{2+} kontrolují orientaci koncové části katecholu a správnou pozici aktivované metylové skupiny. (Vidgren et al., 1994).

2.2.2 Fyziologická funkce enzymu *COMT*

Katechol-O-methyl transferáza neboli *COMT* je enzym, který katalyzuje přenos metylové skupiny z S-adenosyl – L- methioninu na hydroxylovou skupinu v substrátu katecholu. (Lundstrom et al., 1995). Viz obr. 3.



Obrázek 3.: Funkce *COMT* enzymu

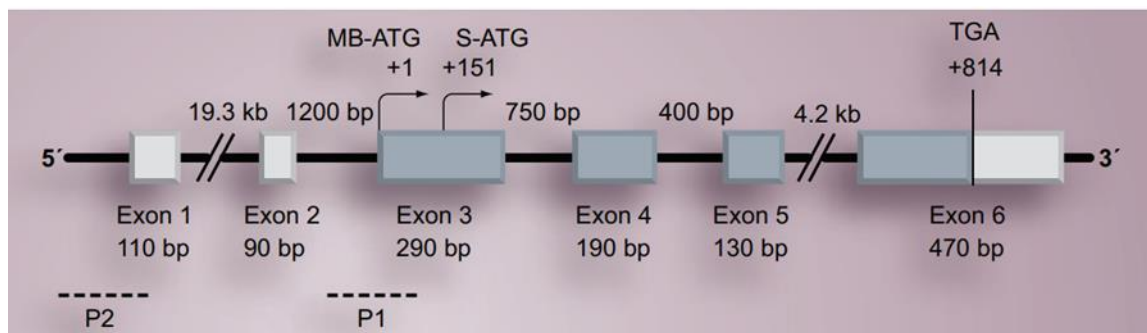
V současnosti jsou známy dva typy dva typy enzymů *COMT*. V buněčné cytoplazmě byla nalezena rozpustná forma *COMT* (*S-COMT*: soluble *COMT*) a membránově vázaná forma *COMT* (*MB-COMT*: membrane-bound *COMT*) (Esmail et al., 2020). Oba typy obsahují 221 aminokyselinových zbytků a *MB-COMT* má navíc na svém konci přidáno 50 aminokyselin, které vytváří reziduální zbytek, jenž se propojuje s intracelulární membránou. Zároveň katalytické místo enzymu je orientováno směrem do cytoplazmatického prostoru buňky (Bonifácio et al., 2007).

Distribuce obou transkriptů byla zjištěna ve většině lidských tkání. *S-COMT* je převážně exprimován v krvi, játrech a ledvinách, zatímco *MB-COMT* byl zjištěn hlavně v mozkové tkáni, což je důležitý předpoklad k řízení metabolismu dopaminu (Sun et al., 2013). Membránově vázaná *MB-COMT* je lokalizován v axonech, dendritech, postsynaptických a presynaptických strukturách hlavně v prefrontální části mozku (Chen et al., 2011). Na základě provedených pokusů, které sledovali regulaci dopaminu přes inaktivaci jeho transportérů v prefrontální části mozku byla potvrzena hypotéza, že enzym *COMT* hraje hlavního aktéra při regulaci neurotransmise v prefrontální části mozku (Garris et al., 1993).

2.2.3 *Struktura, exprese a lokalizace genu COMT*

Genetické pokusy prokázali, že proteiny *COMT* jsou kódovány pouze jedním genem u různých druhů savců. Lidský gen pro *COMT* je lokalizován na dlouhém rameni chromosomu 22 v pozici 22q11.2. (Tenhunen et al., 1994). Gen má velikost přibližně 27 kb a jeho součástí jsou dva promotory, které řídí syntézu dvou odlišných transkriptů. Vzdálenější 5'promotor, označovaný jako P2, reguluje syntézu transkriptu o velikosti 1,5kb kódujícího membránově vázanou formu (*MB-COMT*, 271 aminokyselin) a také rozpustnou formu (*S-COMT*, 221 aminokyselin). Translace obou forem je zahájena iniciačním translačním ATG kodónem, který je umístěn na exonu 3 (Andersen a Skorpen, 2009). Druhý promotor P1 je lokalizován mezi těmito dvěma ATG kodóny. Promotor P1

reguluje pouze syntézu transkriptu o velikosti 11,3 kb kódujícího formu S-COMT (Tenhunen et al., 1994). Celá struktura genu je přehledně zobrazena na obrázku 4.



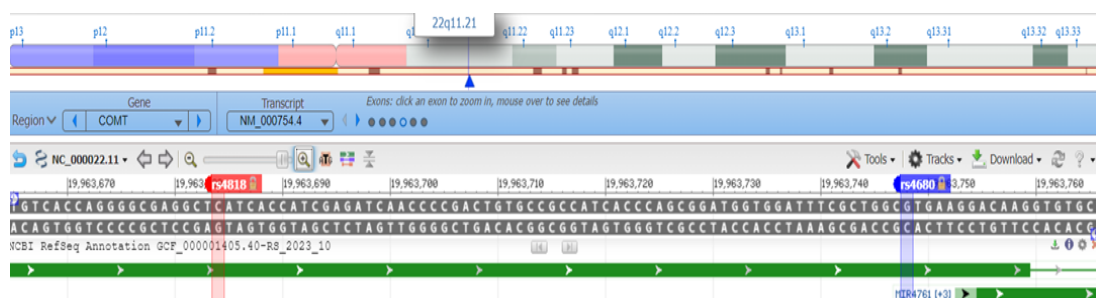
Obrázek 4: Struktura lidského genu *COMT*. Černá linie představuje introny a pomocí rámečků jsou zobrazeny exony. Tmavé rámečky odpovídají regionům kódující protein, zatímco bílé rámečky jsou oblasti nekódujících exonů. Dále jsou na obrázku uvedeny počáteční kodony translace pro membránově asociovanou formu *COMT* a rozpustnou formu *COMT*, dva promotory P1 a P2, stop kodon TGA v exonu 6. Upraveno dle Andersen a Skorpen, 2009.

V roce 1994 Tehnunen et al. zkoumal distribuci specifických transkriptů *COMT* v různých lidských tkáních pomocí laboratorní metody Northern blot. Prokázal přítomnost obou transkriptů s různou distribucí. Nejvyšší koncentrace obou transkriptů byla nalezena v játrech, mozku, ledvinách, nadledvinkách a plicích, zatímco nižší hladina byla přítomna v srdci, prsní žláze a lymfocytech. Ukázalo se, že většina transkriptu o velikosti 1,3kb byla prokázána v játrech, ledvinách a prsních žlázách a delší 1,5 kb transkript převládá hlavně v centrální nervové soustavě. Podle jiné studie, Hong et al. (1998), tento transkript převažuje v míše a mozku. Nižší hladina byla zjištěna v limbické části mozku, amygdale, která je odpovědná za emoce, vztek, hněv a úzkost. Poznatky o expresi genů *COMT* doplňuje Matsumoto et al. (2003), který díky metodě *in situ* hybridizace signifikantně prokázal přítomnost obou transkriptů i v kortikální a subkortikální oblasti mozku.

2.2.4 Genová rozmanitost v genu *COMT*

Variabilitu našeho genomu můžeme sledovat na různých úrovních. Cytogenetik pozoruje mikroskopicky počet, velikost a tvar chromozomů, variabilitu hetero- a euchromatických regionů apod. Zatímco molekulární genetik, vyšetřující nukleové kyseliny, analyzuje nejčastěji místa jednonukleotidových změn (SNP, single nucleotide polymorphism). Změna jednoho nukleotidu znamená existenci nejméně dvou variant daného genu, které

mohou nebo nemusí podmiňovat různý fenotyp, případně rozvoj geneticky podmíněné choroby. V případě SNP může jít o substituční záměnu nukleotidů, které mohou měnit sekvenci aminokyselin v peptidovém řetězci. To může mít za následek poruchu funkce kódovaného produktu (Beránek, 2016). V genu *COMT* byla prokázána řada polymorfismů. Polymorfismus genu *COMT* Val158Met (rs4680) je součástí haplobloku s dalšími SNP: rs6269, rs4633 a rs4818, který se nachází v jeho centrální oblasti (Nackley et al., 2006). Tato práce je zaměřena na studium polymorfismu rs4680 a rs4818, u nichž se předpokládá asociace s psychiatrickými poruchami. Přesné určení místa námi studovaných polymorfismů v genu *COMT* je zobrazeno na následujícím obrázku 5.

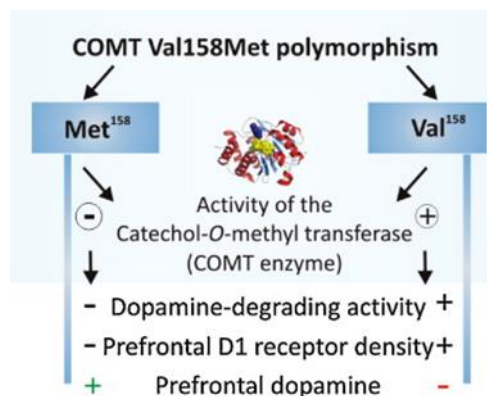


Obrázek 5: Část sekvence genu *COMT* s vyznačenými polymorfismy rs4818 a rs4680 (převzato z National Library of Medicine).

2.2.4.1 Polymorfismus rs4680

Varianta Val/Met na exonu 4 je výsledkem substituce nukleotidu guaninu za adenin, což vede k záměně aminokyseliny valinu za methionin v kodonu 158 v enzymu *MB-COMT* a na kodonu 108 v enzymu *S-COMT*. Tato záměna způsobuje rozdíly v aktivitě a termostabilitě enzymu (Lotta et al, 1995). Podle Chen et al. (2004) jedinci Met/Met vykazují sníženou enzymovou aktivitu, což vede k vyšším hladinám synaptického dopaminu a ovlivňuje tak dopaminergní postsynaptickou stimulaci frontálního laloku.

Bylo prokázáno, že homozygoti Met/Met ve srovnání s homozygoty Val/Val mají 3x-4x nižší aktivitu enzymu *COMT*, což znamená vyšší koncentraci dopaminu. U Val/Met heterozygotů byla naměřena střední hladina enzymu a u genotypu Val/Val byla prokázána nejvyšší aktivita enzymu *COMT* (Lachman et al., 1996). Vliv polymorfismu rs4680 shrnuje následující obrázek 6.



Obrázek 6: Vliv funkčního jednonukleotidového polymorfismu *COMT* Val158Met. Alela Val158 je spojena s vyšší degradací dopaminu, následně vyšším obratem uvolněného dopaminu, a tím nižší hladinou dopaminu v prefrontálním kortexu (Witte a Flöel, 2012).

Četné studie uvádí, že polymorfismus rs4680 je jedním z predispozičních prvků neuropsychiatrických onemocnění jako je schizofrenie (Egan et al., 2001), bipolární porucha, obsedantně kompulsivní porucha, ADHD a porucha autistického spektra. Analýza psychiatrických pacientů prokázala vliv polymorfismu Val158Met na kognitivní funkce, pracovní paměť, exekutivní funkce a udržení pozornosti (Bonifácio et al, 2007).

2.2.4.2 Polymorfismus rs4818

Polymorfismus *COMT* rs4818 se nachází stejně jako rs4680 na exonu 4. Jedná se o substituci cytosinu (C) za guanin (G), přičemž nedochází k záměně aminokyseliny (Leu/Leu) na kodonu 86 v případě *S-COMT* a na kodonu 136 v případě *MB-COMT*. Přesto, že k záměně AK nedochází, přítomnost varianty G souvisí s vyšší aktivitou *COMT* a sníženou prefrontální dopaminovou aktivitou. To znamená, že jedinci GG mají vyšší aktivitu *COMT* ve srovnání s jedinci CC (Roussos et al., 2008). Je třeba poznamenat, že alela G je původní alela, zatímco alela C je výsledkem mutace, která je považována za výhodnou z hlediska lidské evoluce, protože je jedinečná pro člověka a vztahuje se k vyšší inteligenci (Jiang et al, 2015).

Ukázalo se, že rs4680 (Val158Met) je funkční polymorfismus ovlivňující aktivitu *COMT*, koncentraci a stabilitu proteinu a je spojen se změněnými hladinami *S-COMT* v lidském dorzolaterálním prefrontálním kortexu (Parkin et al, 2018). Polymorfismus rs4818 ovlivňuje aktivitu enzymové exprese *COMT* až 18krát více změnou stability mRNA (Nackley et al., 2006). Dokonce se předpokládá, že aktivita *COMT* je více ovlivněna polymorfismem rs4818 než polymorfismem rs4680 (Sagud et al., 2023) a zároveň se

ukázalo, že různé s haplotypy rs4818 různě ovlivňují prefrontální kortexové funkce, včetně řešení neemocionálních problémů (Ioannidis et al., 2020).

2.3 ADHD a polymorfismus COMT

2.3.1 ADHD: pojem, etiologie a patologie

Porucha pozornosti s hyperaktivitou – ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder) představuje široce rozšířenou neurobiologickou poruchu v dětském věku s poměrně vysokou mírou genetické podmíněnosti. V současné době se používají nejčastěji dva termíny, které vycházejí z 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN 10, ICD 10) Světové zdravotnické organizace a z Americké psychiatrické asociace (podle DSM IV). V souladu s MKN 10 je užíván termín hyperkinetická porucha a její subtypy: porucha pozornosti a aktivity a hyperkinetická porucha chování. V české terminologii se používá i označení typu hyperkinetický nebo hyperaktivní syndrom. Označení ADHD vychází z terminologie Americké psychiatrické asociace. Jedná se o označení pro syndrom deficitu pozornosti spojený s hyperaktivitou (ADHD) anebo syndrom deficitu pozornosti bez hyperaktivity (ADD) (Kuželová, 2014).

Příznaky onemocnění se objevují již v dětství a přetrvávají do dospělosti. U menší části pacientů dochází k remisi v průběhu dospívání (Theiner, 2012). ADHD se projevuje poruchou pozornosti, hyperaktivitou a impulzivitou. U pacientů s ADHD lze předpokládat tyto dílčí poruchy pozornosti: slabá koncentrace pozornosti, krátká tenacita (schopnost podržet jedno zaměření pozornosti na delší dobu), méně adaptabilní vigilita, nízká selektivita. Hyperaktivita se projevuje jako puzení k neustálému pohybu, k neúčelné činnosti, pacienti mají potíže zůstat v klidu, přičemž vykonávají různé neúčelné pohyby (Neumannová et al., 2010). U impulzivního jedince můžeme vidět, že nezadržitelně mluví, často vyhrkne odpověď dříve, než byla dokončena otázka nebo mívá velký problém vyčkat, než na něj přijde řada (Paclt, 2016). Shrnutí projevů u jedinců s ADHD vidíme na následujícím obrázku 7.

<p>Nepozornost</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ obtížně se koncentruje na úkoly ■ nedokáže udržet pozornost ■ zdá se, že neposlouchá ■ nedokončuje započaté činnosti ■ vyhýbá se úkolům s velkým mentálním úsilím ■ je nepořádný ■ je roztržitý, ztrácí věci, zapomíná 	<p>Nepozornost</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ špatné plánování a nakládání s časem ■ problémy se začátkem a dokončením úkolu, problémy přecházet mezi úkoly ■ prokrastinace – odkládání neplíjímých úkolů ■ vyhýbání se činnostem vyžadujícím soustředění
<p>Hyperaktivita</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ neposedný, vrtí se, nevydrží sedět na místě ■ pobíhá ■ vyrušuje, je hlučný, obtížně zachovává klid ■ pořád je v pohybu ■ mnohomyšlný 	<p>Hyperaktivita</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ nepřijemný vnitřní pocit neklidu, potřeby stále něco konat ■ drobné příznaky zevního neklidu, např. poklepávání nohou, rukou ■ zapojení do mnohých aktivit, workoholismus ■ snadno se nudí a vyhýbají se situacím, kdy „není co dělat“
<p>Impulzivita</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ nezadržitelný v řeči ■ odpovídek vyhrkne bez přemýšlení ■ nedokáže čekat ■ přerušuje ostatní v činnostech, skáče do řeči 	<p>Impulzivita</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ nízká frustrační tolerance ■ časté změny zaměstnání, partnerů ■ rychlá jízda a pokuty za dopravní přestupky ■ rychlá rozhodnutí, netolerance nejistoty ■ skákání do řeči
	<p>Emoční dysregulace</p>

Obrázek 7: Projevy jedinců s ADHD. Upraveno dle Theiner, 2012.

Klinické příznaky ADHD jsou způsobeny strukturálními a funkčními odchylkami v prefrontálním kortexu a subkortikálních oblastech, které se podílejí na řízení exekutivních funkcí. A právě v těchto oblastech se hledá hlavní příčina ADHD, což je podle katecholaminové hypotézy snížená tvorba dopaminu a jeho využití (Příhodová, 2011).

2.3.2 Vliv polymorfismu genu *COMT* na ADHD

Na základě dostupných studií je ADHD multifaktoriální polygenní porucha způsobená přispěním každého jednotlivého genu. Doposud nebyly odhaleny kauzální geny, které by ADHD přímo způsobovaly, ale existuje celá řada kandidátních genů, jež mají na rozvoji poruchy podíl. Mezi nejvýznamnější patří zejména geny dopaminergního, noradrenergního serotoninergního a GABAergního systému (geny pro transportéry a receptory transmiterů, geny pro některé enzymy, např. dopamin-beta- hydroxyláza, monoaminoxidáza, katechol-O-metyltransferáza). Molekulárně-genetické studie se zaměřují především na geny dopaminového systému, geny kódující dopaminové receptory a transportéry (Kuželová, 2014). Jedná se o geny dopaminových receptorů DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DRD5 a dále geny *COMT*, *MAO* a geny kódující transportér DAT1 (Kopečková, 2008). Jedním z nejvíce prostudovaných genů je gen pro katechol-O-methyltransferázu (*COMT*).

Teoreticky, vyšší aktivita enzymu *COMT* spojená s alelou Val může zvýšit degradaci dopaminu a způsobit snížení jeho koncentrace na synapsích. Protože dopaminová dráha je zahrnuta do regulace kognitivních funkcí, předpokládá se, že za deficit ve výkonech u

děti s ADHD, odpovídá právě alela Val (Cheuk a Wong, 2006). Výsledky různých studií zabývajících se vlivem polymorfismu *COMT* však bývají mnohdy kontroverzní.

Hypotézu podporuje průzkum provedený u dětí s ADHD s homozygotním genotypem Val/Val. Tyto děti měly významně lepší trvalou pozornost než děti s ADHD a alespoň jednou kopií Met varianty. Děti s variantou Met dosahovaly v testech trvalé pozornosti výrazně horších výsledků. Varianta Met pravděpodobně narušila prefrontálně zprostředkovanou kognici u ADHD a její účinek může být vysvětlen hyperfunkcí prefrontálních dopaminergních systémů, tedy pomalejší degradací dopaminu.

Také během farmakogenetické analýzy bylo zjištěno, že alela Val byla u pacientů s ADHD častější ve srovnání se zdravou populací a homozygotní děti Val/Val měly po léčbě lékem methylfenidát významně méně závažné symptomy než děti s genotypem Met/Met. Tato interakce by mohla odrážet regulační účinek prefrontálního přenosu dopaminu ovládaného *COMT* na subkortikální dopaminové systémy, které jsou skutečným místem působení methylfenidátu (Bellgrove et al, 2005).

Jiné populační studie neprokázaly žádnou souvislost mezi genotypem *COMT* a závažností symptomů u ADHD (Hawi et al., 2000; Tahir et al., 2000; Yatsuga et al., 2014).

2.3.3 Léčba ADHD

Včasná a adekvátní intervence má potenciál snížit riziko negativních výsledků souvisejících s ADHD v oblasti duševního a fyzického zdraví (Da Silva et al., 2023). Možnosti léčby mohou být nefarmakologické, farmakologické nebo jejich kombinace. Nefarmakologická léčba zahrnuje psychosociální, kognitivní a behaviorální trénink, který stimuluje specifické neuropsychologické domény spojené s ADHD. Behaviorální terapie je intervence zaměřená na změnu chování. V praxi to znamená, že se terapeut snaží podpořit žádoucího chování a eliminovat nežádoucí chování. Zároveň se v léčbě uplatňuje kognitivní trénink, který posiluje pracovní paměť zahrnující adaptivní rozvrhy, o kterých se předpokládá, že posilují neuropsychologické procesy s deficitem ADHD (Catalá-Lopez et al, 2017). V léčbě ADHD je využívána i alternativní medicína. Patří sem dietní terapie, což zahrnuje vyloučení položek spojených s přecitlivělostí na potraviny a vyřazení umělých potravinářských barviv z dětské stravy. Dále lze do této skupiny zahrnout také homeopatickou léčbu (Verkuijl et al, 2015).

Farmakologická léčebná strategie je závislá na klinickém profilu pacienta, zejména s ohledem na přítomnost komorbidit, které jsou u pacientů s ADHD často pozorovány. Obecně se doporučují stimulační léky, jmenovitě lisdexamfetamin a methylfenidát jako farmakologická léčba první volby pro středně těžké až těžké případy ADHD a pacienty ve věku 6 let a starší. U pacientů, kteří netolerují nebo nereagují na léčbu těmito léky, jsou druhou volbou farmakoterapie nestimulanty (např. atomoxetin), následně adrenergní látky (např. klonidin a guanfacin) nebo alternativní nestimulační léky, včetně antidepresiv, jako jsou tricyklicka a bupropion (Cortese, 2020).

Methylfenidát je v současnosti nejrozšířenější molekulou ve farmakologické léčbě poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD). Methylfenidát, zvyšuje dostupnost dopaminu a noradrenalinu v synaptické štěrbině, což vede ke zvýšené neurotransmisí. Farmakologická aktivita methylfenidátu vyplývá především z blokování transportérů dopaminu a noradrenalinu (DAT, resp. NET), čímž se inhibuje zpětné vychytávání těchto neurotransmiterů do presynaptických neuronů (Zimmer, 2017). Methylfenidát má výrazný efekt na mentální a motorické funkce. Zlepšuje studijní výkon, pozitivně ovlivňuje zvraty nálady, denní ospalost a kognitivní funkce (Storebo et al, 2015).

Mezi nestimulanty patří hlavně atomoxetin. Atomoxetin je silný a selektivní inhibitor zpětného vychytávání norepinefrinu, který působí prostřednictvím blokády NET přenašeče. Taková presynaptická inhibice přenašeče vede ke zvýšeným extracelulárním hladinám norepinefrinu a vyskytuje se hlavně v prefrontálním kortexu (Bymaster et al., 2002). Atomoxetin je účinnou léčbou hlavních symptomů ADHD a zlepšuje funkční výsledky a kvalitu života u různých skupin osob s ADHD (tj. muži/ženy, pacienti s komorbiditami, děti/dospívající) (Savill et al., 2015).

Provedené studie prokázaly výrazný efekt léků na základní symptomy ADHD, ale zároveň se objevují i nežádoucí účinky. Nejčastěji se jedná o sníženou chuť k jídlu, sucho v ústech, podrážděnost, poruchy spánku, tachykardii, bolest hlavy a kardiovaskulární onemocnění (Chang et al, 2019).

2.4 ASD a polymorfismus COMT

2.4.1 ASD, pojem a etiologie

Poruchy autistického spektra (PAS), v anglické terminologii Autism Spectrum Disorders (ASD), patří mezi pervazivní vývojové poruchy. V mezinárodní klasifikaci nemocí

(MKN-10) k těmto poruchám řadíme dětský autismus, Aspergerův syndrom, atypický autismus a velmi vzácně se vyskytující jinou desintegrační poruchu v dětství. Americký statistický manuál DSM-5 slučuje tyto poruchy do jediné jednotky nazvané porucha autistického spektra (Diagnostic and statistical manual, 2013). Všechny tyto poruchy vznikají na základě abnormálního vývoje mozku, označujeme je tedy jako neurovývojové (Žampachová a Čadilová, 2015).

Počet pacientů s poruchami autistického spektra vykazuje v posledních desetiletích trvalý nárůst. Současná prevalence PAS se odhaduje na 1 až 1,5% v dětské populaci. Pravděpodobně to lze připsat lepší diagnostice, zvýšenému povědomí a znalostem odborníků i rodičů o autismu, vyššímu věku rodičů při zakládání rodiny a geografickému shlukování rodin s postiženými dětmi (Dudová a Mohaplová, 2016).

Společným jmenovatelem PAS jsou navenek pozorovatelné abnormality ve třech oblastech vývoje dítěte. Mluvíme o tzv. „autistické triádě“:

1. narušená sociální interakce,
2. narušená komunikace,
3. abnormality v chování, zájmech a hře.

(Žampachová a Čadilová, 2015).

2.4.2 Vliv polymorfismu COMT na ASD

Příčiny vzniku poruch autistického spektra jsou velmi pravděpodobně komplexní se zastoupením jak genetických faktorů, tak faktorů vnějšího prostředí. Podíl genetických faktorů neboli heritabilita se u autismu odhaduje nad 60% (Dudková a Mohaplová, 2016). Dosud byly provedeny četné studie věnující se hledání biomarkerů pro diagnostiku poruch autistického spektra. Jedním z kandidátních genetických faktorů, který pravděpodobně kontroluje fenotypové projevy ASD, je polymorfismus Val158Met (Blasi et al., 2005). Avšak interpretace jeho vlivu na ASD je složitá a kontroverzní. Podle Esmail et al. (2020) byla u pacientů s PAS významně rozšířena především alela Met. Alela Met je spojena s vyšší hladinou dopaminu a tyto zvýšené hladiny katecholaminů, které stimulují β 2-adrenergní receptory periferního a centrálního nervového systému, by mohly nejspíše vést k středním až silným projevům autistického chování (Esmail et al., 2020). Přesto polymorfismus Met je spojen s lepšími kognitivními vlastnostmi, zatímco

homozygotní jedinci pro alelu Val vykazovali horší výkon v testech na kognici a v testech pozornosti. Stejně tak další vědecké studie u dětí zaznamenaly v případě jedinců Met/Met lepší výkon v úkolech vyžadující pracovní paměť než u jedinců Val/Val (Diamond et al., 2004). Na druhé straně Karam et al. (2013) prokázal, že genotyp Va/Val významně koreloval se zvyšující se hyperaktivitou u pacientů s ASD. V souladu s tímto tvrzením lze prefrontální výkonné deficity u pacientů s ASD vysvětlit zvýšeným obratem prefrontálního dopaminu, který je spojený právě s valinovou variantou COMT. Navíc alela Val je spojena s antisociálním chováním (Caspi et al., 2008). Naopak Guo et al. (2013) zjistil, že frekvence genotypu Val/Val byla signifikantně nižší u pacientů s ASD než u kontrolní skupiny.

Další působení polymorfismu rs4680 bylo rozsáhle studováno v normální a neuropsychiatrické korejské populaci. Kvantitativní analýza v této studii odhalila, že rs4680 má okrajově významnou souvislost s kvalitativními abnormalitami v komunikaci u pacientů s ASD (Yoo et al., 2013).

Některé studie neprokázaly žádnou souvislost mezi geny *COMT* a ASD. Např. u thajských dětí neměl SNP rs4680 žádný prokazatelný vliv na jejich chování (Limprasert et al., 2014).

Je třeba si uvědomit, že poruchy autistického spektra neovlivňuje pouze polymorfismus *COMT* Val158Met, ale také například rs4818, který spolu s SNP rs6269, rs4633 a rs 4680, tvoří haploblok ležící v centrální oblasti genu *COMT* (Diatchenko et al., 2005). Recentní výzkumy ukazují, že nejvíce funkci enzymu *COMT* ovlivňuje SNP rs4818. Haplotyp s nízkou enzymovou aktivitou obsahuje převážně alelu C, zatímco nejvyšší aktivitě *COMT* odpovídá alela G. Výskyt alely G ve středoevropské populaci je více jak 40% a homozygoti GG kompenzují svoje relativně neefektivní schopnosti abstraktního řešení problémů efektivnějším zapojením emocionálních podnětů do rozhodování. Tedy jedinci s alelou G jsou více zatíženi sníženou schopností plánovat a řešit problémy (Roussos et al., 2008).

2.4.3 Léčba ASD

V současné době není dostupná kauzální léčba poruch autistického spektra. Odborníci na danou problematiku se pouze snaží zmírnit projevy autismu. Terapie ASD je velmi komplexní problematikou již kvůli množství oborů, které se svým působením podílejí na

formování terapie (Novák, 2014). Při vlastní léčbě lze využít poznatky z oboru psychoterapie a farmakologie. Někteří odborníci se přikládají i k dietním opatřením (Dudová a Mohaplová, 2016).

Při psychoterapii se využívají dvě základní metody a to kognitivně-behaviorální terapie a trénink sociálních dovedností (Lerner at al., 2012).

Kognitivně-behaviorální terapie je zaměřena na řešení psychických problémů pomocí změn v chování a způsobu uvažování jedince (Atkinson, 2003). Metody se používají k nácviku každodenních dovedností (např. pravidelná hygiena). Pokud osoba s ASD zvládne základní praktiky, pokračuje terapeut v nácviku správného chování, komunikace nebo rozeznávání emocí (Hanková, 2013). Podle Sukhodolsky et al. (2013) se tato terapie využívá především u dětí například k zmírnění depresí, repetitivního jednání nebo při sociálních fobiích.

Trénink sociálních dovedností je pravděpodobně nejrozšířenějším intervenčním přístupem ke zlepšení sociálního fungování u starších dětí a mladých dospělých s ASD. Trénink, který se často poskytuje ve skupinovém prostředí, je založen na předpokladu, že strukturované učení specifického prosociálního chování spolu s příležitostmi k procvičování během sezení a strategiemi generalizace mimo sezení je ideální pro vyvolání zobecněných zlepšení vhodného sociálního chování (Lerner at al., 2012).

Jako doplňková léčba se využívá také farmakologie. Autismus není důvodem, aby někdo užíval medikaci, ale často se s tímto onemocněním pojí různé přidružené potíže (deprese, úzkost, obsedantně kompulzivní porucha, porucha aktivity a pozornosti), u nichž bývá farmakoterapie efektivní, někdy dokonce i velmi účinná (Thorová, 2021)

Pro ovlivnění agresivity, zvýšené dráždivosti a sebepoškozování je lékem první volby risperidon, jediné antipsychotikum, které je v ČR registrováno pro užití u dětí od pěti let s poruchami chování a agresivitou. Druhou volbou je aripiprazol, jako třetí krok je možné zvolit olanzapin, ziprasidon nebo valproát. Pro ovlivnění stereotypního a repetitivního chování, obsedantního syndromu a rituálů autoři doporučují fluoxetin, escitalopram a citalopram. Při neúčinnosti těchto dvou SSRI antidepresiv spočívá třetí krok v použití clomipraminu. Jedinou volbou pro řešení poruchy spánku je melatonin (Dudová a Mohaplová, 2016).

3 Cíl práce a hypotéza

3.1 Cíl práce

Práce byla zaměřena na zvládnutí základních molekulárně-biologických vyšetřovacích metod jako izolace DNA, metoda PCR, gelová elektroforéza, seznámení s metodou sekvenování, přičemž byly prověřeny varianty genu *COMT* rs4818 a rs4680 u vybraných jedinců. Získané výsledky sekvenačních reakcí byly zpracovány a vyhodnoceny.

3.2 Hypotéza

U prověřovaných osob ADHD a ASD bude jiné frekvenční zastoupení genových variant zodpovědných za nízkou nebo vysokou hladinu dopaminu ve srovnání s kontrolní populací.

4 Metodika

4.1 Materiál a jeho odběr

Pro získání patientské DNA jsme využili neinvazivní odběr genetického materiálu, tzv. bukální stěr, který si pacienti prováděli sami. Pacient předem dostal speciální jednorázovou odběrovou sadu spolu s návodem, jak správně odebrat vzorek. Odběr DNA se prováděl pomocí sterilní vatové tyčinky (Isohelix SK1 Buccal Swab). Po stěru z vnitřní strany dutiny ústní pacient vložil tyčinku do sterilní zkumavky, aniž by se dotýkal prsty vatové části tyčinky. Poté zkumavku odevzdal do laboratoře spolu s příslušnými průvodními dokumenty. Jednalo se o informovaný souhlas pacienta s molekulárně-genetickým vyšetřením a Žádanku pro genetické laboratorní vyšetření, které musel každý pacient laboratoře řádně vyplnit a podepsat.

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Izolace

1. K izolaci jsme používali stěr z bukální sliznice. V prvním kroku jsme provedli izolaci DNA šetrnou extrakcí z buněčného jádra pomocí speciálního izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini dle protokolu doporučeného výrobcem GeneAll. Lýza buněk byla dosažena přidáním 25 μ l proteinázy K (enzymově rozštěpí proteiny) a 300 μ l BL pufru k vatové tyčince v odběrové zkumavce.
2. Následovala inkubace zkumavky 20 minut při 56°C v termostatu (Dry Block Thermostat TDB-120; Biosan).
3. V dalším kroku jsme zkumavky vložili do centrifugy a krátce stočili, abychom neztratili žádný materiál na stěnách zkumavky.
4. Potom jsme přidali k lyzátu 300 μ l 100% ethanolu, zkumavky jsme zvortexovali v krátkých pulsech na vortexu (Microspin FV-2400; Biosan) a krátce stočili na centrifuze (Centrifuga/vortex CVP-2 – Biosan)
5. Pak jsme pipetou přenesli veškerý materiál (max. 700 μ l) ze zkumavky na kolonku, vložili do centrifugy (Centrifuge 5415 R; Eppendorf) a stočili při otáčkách > 8 000 rpm po dobu 1 min.
6. Po centrifugaci jsme vyměnili sběrnou zkumavku za novou, přidali jsme ke vzorku 600 μ l BW pufru a znova centrifugovali při otáčkách > 8 000 rpm po dobu 1 min. Poté jsme znova vyměnili sběrnou zkumavku za novou.

7. Následně jsme přidali 700 μ l TW pufru a centrifugovali při otáčkách $> 8\ 000$ rpm po dobu 1 min. Dále jsme odstranili obsah sběrné zkumavky a vrátili kolonku do téže sběrné zkumavky
8. Opět následovala centrifugace po dobu 1 min, ale při otáčkách při 13 000 rpm.
9. Po odstranění promývacích pufrů jsme vložili kolonku do nové čisté 1,5ml zkumavky, přidali 50 μ l AE pufru, inkubovali 5 min při 56°C v termostatu a po uběhnutí doby jsme centrifugovali po dobu 1 min při otáčkách při 13 000 rpm.
10. Poslední eluční krok byl zopakován, následně jsme kolonku vyjmuli z 1,5ml zkumavky a v této uzavíratelné zkumavce zůstala izolovaná DNA z bukálního stěru. Získaný vzorek byl uložen do mrazicího boxu, kde byla teplota -20°C.

4.2.2 Měření kvantity DNA

Koncentraci izolované DNA jsme měřili fluorometricky pomocí reagentu Qubit™ dsDNA BR Assay Kit na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer. Do čisté a označené zkumavky jsme napipetovali 198 μ l zásobního roztoku, přidali 2 μ l vzorku a inkubovali 2 minuty při pokojové teplotě. Zkumavku jsme vložili do fluorometru a odečetli koncentraci DNA na displeji. Zobrazenou hodnotu jsme zaznamenali.

4.2.3 Amplifikace metodou PCR

Příprava reakčního mixu pro analýzu polymorfismů pomocí metody PCR byla realizována v chladicí kazetě v laminárním boxu. V této studii byl použit enzym MyTaq™ DNA polymeráza (Bioline). Složení reakčního mixu je uvedeno v tabulce 1

Tabulka 1: Směs reakčního mixu pro PCR

Reakční mix	Objem (μ l)
H ₂ O	34,3
MyTaq Red Reaction Buffer	10
5xMyTaq polymeráza (5U/ μ l)	0,2
DMSO (100%)	2,5
COMT rev (20 pmol)	0,5
COMT_for (20 pmol)	0,5
DNA	2
Celkem	50

Pro vlastní reakci byly použity specifické primery, jejichž sekvence je uvedena v tabulce 2. Primery byly převzaty z publikace Tahara a kol. (2009). Syntéza primerů byla zadána u firmy ELISABETH PHARMACON.

Tabulka 2: Sekvence primeru pro PCR amplifikaci

Název primeru	Sekvence
COMT for	5'-TCG TGG ACG CCG TGA TTC AGG-3'
COMT rev	5'-AGG TCT GAC AAC GGG TCA GGC-3'

Vlastní reakce probíhala v přístroji The MultiGene Mini Personal Thermal Cycler (Labnet) podle následujícího PCR profilu, jež je přehledně vidět v tabulce 3.

Tabulka 3: PCR profil

Postup reakce		Čas	Teplota °C
Denaturace		5 min.	95
Denaturace		30 s	95
Anealing	32 cyklů	30 s	55
Extenze		60 s	72
Extenze		10 min.	72

4.2.4 Kontrola PCR produktu gelovou elektroforézou

V dalším kroku jsme kontrolovali amplifikované PCR produkty na 4% agarózovém gelu v 1xTBE pufru (Tris-borate-EDTA, Thermo Scientific). Nejdříve jsme rozpustili 4 tablety agarózy (FastGene Agarose Tablets, Nippon Genetics) ve 150 ml 1xTBE pufru. Následně byla směs přenesena do mikrovlnné trouby, kde se zahřívala tak dlouho, dokud se nevytvořil tekutý gel. Dále jsme ke směsi přimíchali 15 µl fluorescenční barvičky (EliDNA PS Green, Elisabeth Pharmacon), směs přelili do elektroforetické formy s hřebeny a po ztuhnutí gelu vyndali hřebeny, přendali gel do elektroforetické vany (Mupid® One Electrophoresis System), zalili pufrem a pomocí pipety nanесли 5 µl našeho vzorku a do poslední jamky 5µl hmotnostní markeru (100 bp DN A Ladder H3 R T U, Nippon Genetics). Vlastní elektroforéza probíhala 10 minut při 135V. Kontrola PCR produktů byla provedena na detekčním zařízení (FastGene® GelPic LED Box). Gely byly vyfoceny a fotografie gelu přeneseny na paměťové kartě do počítače.

4.2.5 Přečištění PCR produktu pomocí SAP-Exo Kit

Dle protokolu výrobce jsme k 5 µl PCR produktu přidali 2 µl Exo SAP IT™, (Thermo Fisher Scientific). Mix ExoSAP-IT využívá dva hydrolytické enzymy exonukleázu I a alkalickou fosfatázu. Exonukleáza I odstraňuje zbytky jednovláknových primerů a nesespecifickou jednovláknovou DNA vzniklou během PCR. Alkalická fosfatáza odstraňuje zbývající dNTP ze směsi, které by interferovaly s následnými reakcemi. Po smíchání byl PCR produkt spolu s enzymy inkubován 10 minut v PCR cycleru (MultiGene, Labnet) při 37°C. Inaktivace ExoSAP-IT™ probíhá zahřátím směsi na 80 °C po dobu 10 minut. Přečištěné PCR produkty byly nyní připraveny pro následnou analýzu v aplikacích, které vyžadují, aby DNA byla bez nadbytečných primerů a nukleotidů.

4.2.6 Sekvence

Vzorky připravené v laboratoři GENLABS byly odeslány na sekvenační analýzu specializované firmě SEQme s.r.o. Jednalo se o nejběžnější postup sekvenování tzv. Sangerovo sekvenování. Vzorky pro sekvenační reakci byly připraveny na základě požadavků SEQme s.r.o. Pro sekvenaci jsme do 0,2 PCR zkumavky připravili 1 µl PCR produktu, 8,5 µl vody a 0,5 µl jednoho z primerů použitého pro PCR (COMT for se sekvencí 5'-TCG TGG ACG CCG TGA TTC AGG-3'). Výsledky sekvenačních reakcí byly hodnoceny v počítačovém programu Chromas. Možné výsledky sekvenace pro jednotlivé polymorfismy jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4: Výsledné sekvence polymorfismu

POLYMORFISMUS	SEKVENACE	GENOTYP	VÝSLEDEK	AKTIVITA COMT
rs4818	C	CC	Wild type	normální
rs4818	S	CG	heterozygot	snížená
rs4818	G	GG	Mutovaný homozygot	snížená
rs4680 Val158Met	G	Val/Val	Wild type	Zvýšená/normální
rs4680 Val158Met	R	Val/Met	heterozygot	optimální
rs4680 Val158Met	A	Met/Met	Mutovaný homozygot	snížená

5 Výsledky

5.1 Kontrola PCR produktu pomocí gelové elektroforézy

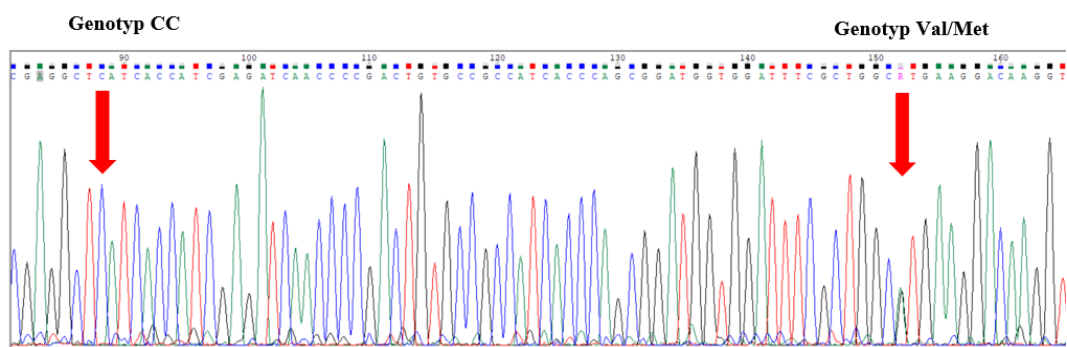
Pro ověření správné amplifikace byla provedena gelová elektroforéza. PCR produkty o velikosti 217 bp vidíme na obr. 8.



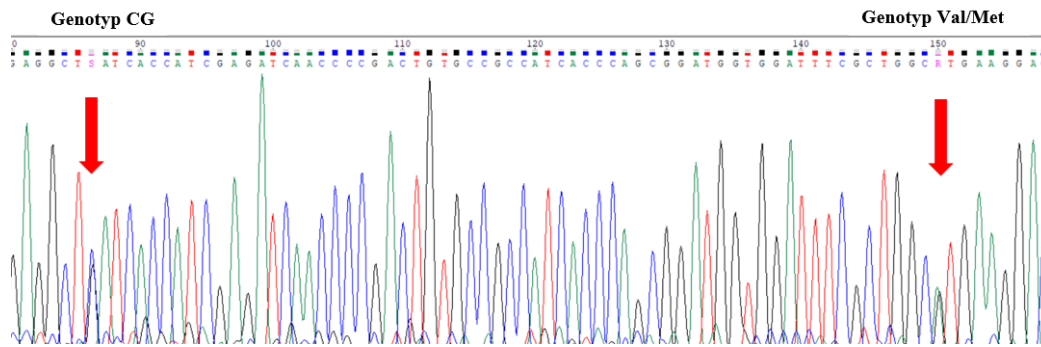
Obrázek 8.: Příklad vizualizace PCR produktu o velikosti 217bp pomocí gelové elektroforézy. M – hmotnostní marker, vzorek 1,2,3 – produkty PCR reakce.

5.2 Výsledek sekvenace PCR produktu

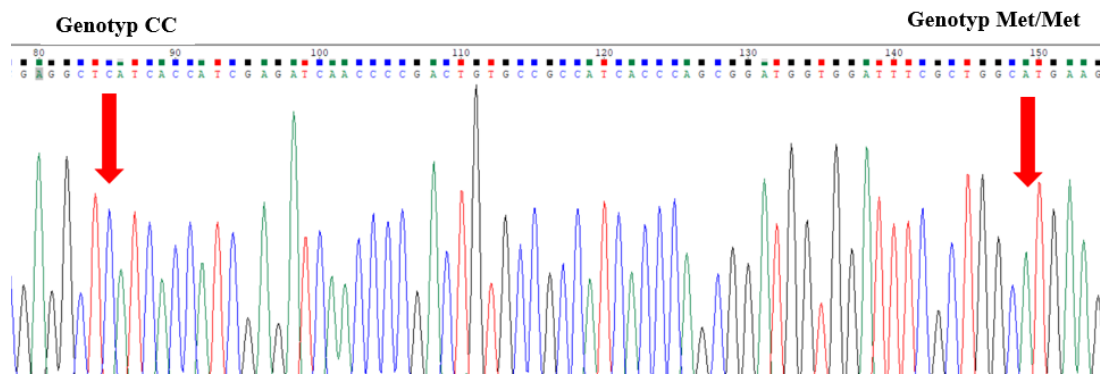
Sekvence daného úseku byla provedena externí firmou SEQme s.r.o., která následně zaslala výsledky on-line a sekvenace byla hodnocena v počítačovém programu Chromas. Příklady grafických výsledků sekvenace jsou zobrazeny na následných obrázcích 9, 10, a 11.



Obrázek 9: Příklad sekvenace genu *COMT*. Výsledkem je v případě SNP rs4818 genotyp CC a v případě rs4680 genotyp Val/Met (červená šipka prezentuje hledaný polymorfismus).



Obrázek 10: Příklad sekvence genu *COMT*. Výsledkem je v případě SNP rs4818 genotyp CG a v případě rs4680 genotyp Val/Met (červená šipka prezentuje hledaný polymorfismus).



Obrázek 11: Příklad sekvence genu *COMT*. Výsledkem je v případě SNP rs4818 genotyp CC a v případě rs4680 genotyp Met/Met (červená šipka prezentuje hledaný polymorfismus).

5.3 Vliv polymorfismu genu *COMT* na ADHD

Po sekvenaci byly porovnány frekvence genových variant rs4818 a rs4680 u pacientů s ADHD a u kontrolní skupiny bez diagnózy. V experimentální části práce bylo prověřeno 30 osob s diagnózou ADHD a v kontrolní skupině bylo vyšetřeno 34 osob bez stanovené diagnózy.

5.3.1 Výsledná evaluace genotypů SNP rs4680 u ADHD

V tabulkách 5 a 6 jsou zaznamenány zjištěné genotypové frekvence testovaných jedinců pro polymorfismus rs4680.

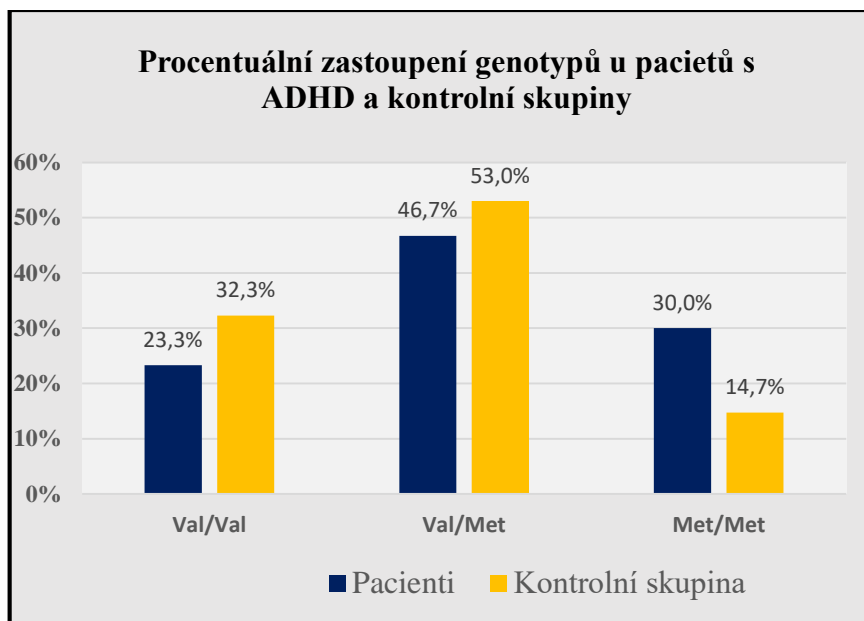
Tabulka 5: Zastoupení genotypů SNP rs4680 u pacientů s diagnózou ADHD.

genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
Val/Val	7	23,3	Val	28	43,1
Val/Met	14	46,7	Met	37	56,9
Met/Met	9	30,0			
Celkem	30	100			

Tabulka 6: Zastoupení genotypů SNP rs4680 v kontrolní skupině bez diagnózy ADHD.

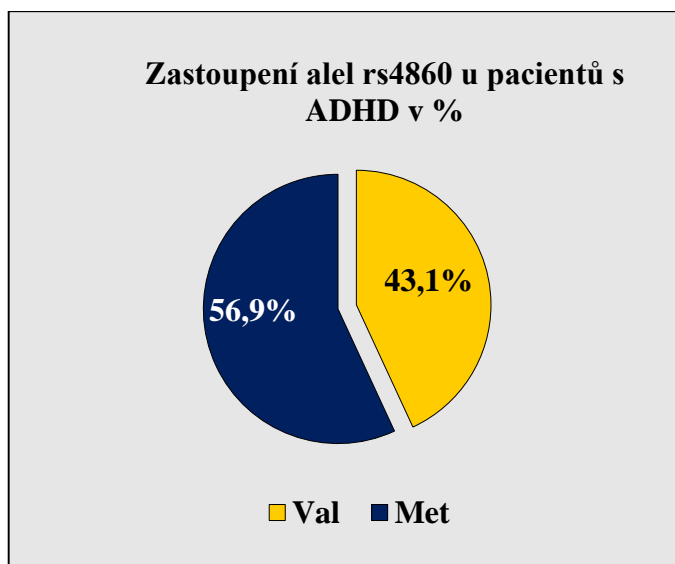
genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
Val/Val	11	32,4	Val	40	58,8
Val/Met	18	52,9	Met	28	41,2
Met/Met	5	14,7			
Celkem	34	100			

Na obr. 12 je graficky znázorněno porovnání genotypových frekvencí polymorfismu rs4680 u pacientů s ADHD a kontrolní skupinou. Ve skupině pacientů s ADHD byly nejvíce zastoupeny heterozygoti Val/Met (46,7%) stejně jako v kontrolní skupině (52,9%). Homozygotní jedinci Val/Val byly více zastoupeni v kontrolní skupině (32,4%) oproti pacientům s ADHD (23,3%). Významnější rozdíly bylo možné vidět u homozygotů Met/Met, v kontrolní skupině bylo 14,7% jedinců s Met/Met a ve skupině pacientů s ADHD bylo 30,3% jedinců s Met/Met.



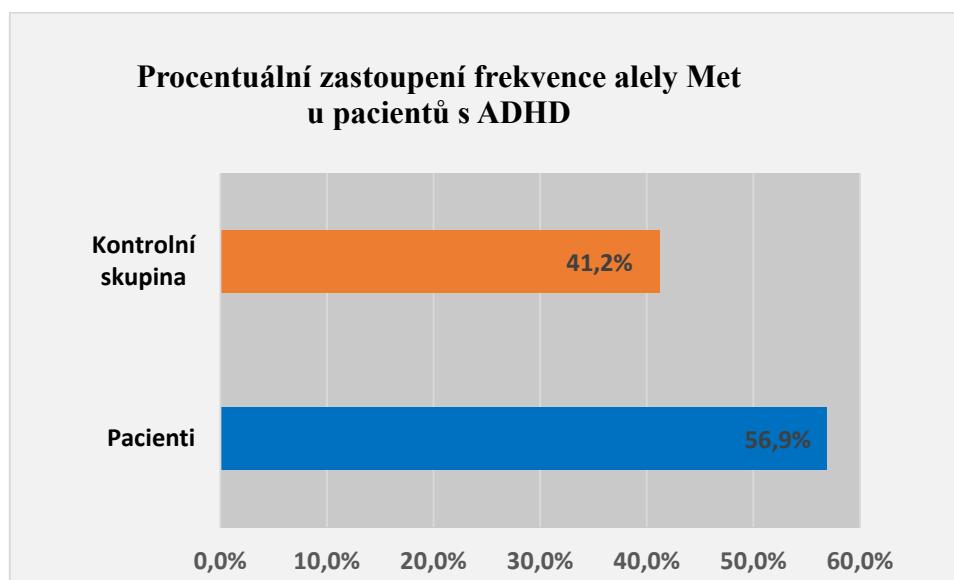
Obrázek 12: Porovnání frekvencí genotypů mezi pacienty s ADHD a kontrolní skupinou.

V dalším postupu jsme se zaměřili na výskyt frekvencí jednotlivých alel Val a Met, který je zachycen v tabulce 5 a graficky znázorněn na obrázku 13. U pacientů s ADHD byla zachycena mírně vyšší frekvence alely Met (56,9%), zatímco frekvence alely Val byla 43,1%. Naopak v kontrolní skupině bylo zjištěno nepatrně vyšší výskyt alely Val (58,8%) oproti alele Met (41,2%), což je zaznamenáno v tabulce 6.



Obrázek 13: Srovnání frekvence alel Val a Met u pacientů s ADHD. Bylo prověřeno 30 osob s diagnózou ADHD.

Pokud jsme se zabývali pouze studiem frekvenčního zastoupení alely Met, lze vidět zřetelnější zvýšení výskytu této alely u pacientů s ADHD ve srovnání s kontrolní skupinou. Jak je vidět na obrázku 14 ve skupině pacientů s ADHD byla frekvence alely Met 56,9% a v kontrolní skupině 41,2%.



Obrázek 14: Porovnání frekvence alely Met ve skupině pacientů s ADHD (30 testovaných jedinců) a v kontrolní skupině (34 testovaných jedinců).

5.3.2 Výsledná evaluace genotypů SNP rs4818 u ADHD

Dále byl prověřen polymorfismus genu *COMT* rs4818 u vybraných jedinců a výsledky byly zpracovány do následujících tabulek 7, 8 a grafu na obrázku 15.

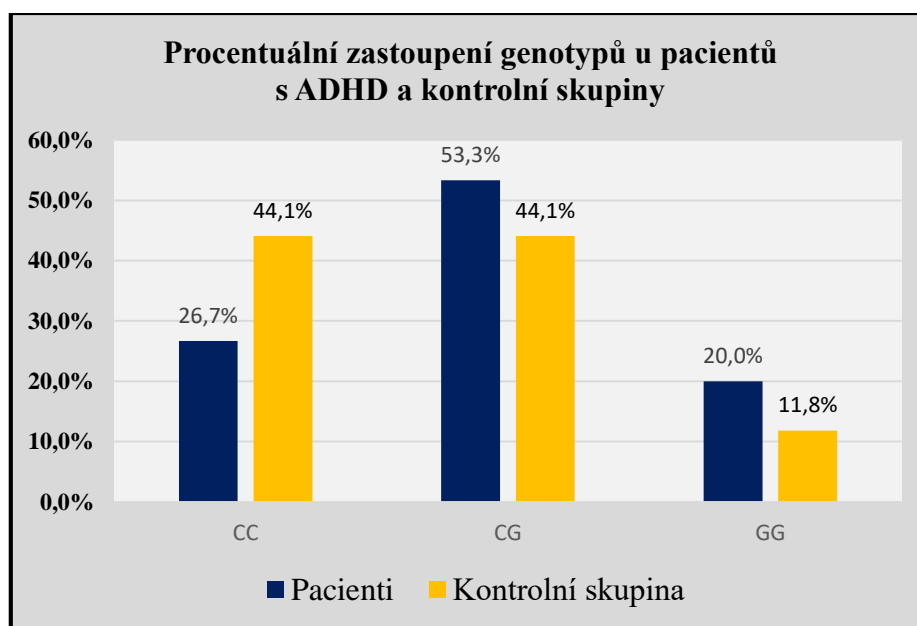
Tabulka 7: Zastoupení genotypů SNP rs4818 u pacientů s diagnózou ADHD.

genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
CC	4	26,7	C	16	53,3
CG	8	53,3	G	14	46,7
GG	3	20,0			
Celkem	15	100			

Tabulka 8: Zastoupení genotypů SNP rs4818 v kontrolní skupině bez diagnózy ADHD.

genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
CC	15	44,1	C	45	66,2
CG	15	44,1	G	23	33,8
GG	4	11,8			
Celkem	34	100			

Na obr. 15 je graficky znázorněno porovnání genotypových frekvencí polymorfismu rs4818 u pacientů s ADHD a kontrolní skupiny. V této práci nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi genotypů u pacientů s ADHD a v kontrolní skupině (užit Chí kvadrát test). Ve studovaném souboru byli ve skupině pacientů nejvíce zastoupeni heterozygoti CG (53,3%) a druhým nejvíce rozšířeným genotypem byl genotyp CC (26,7%). V kontrolní skupině byla frekvence genotypů CC a genotypu CG stejná (44,1%). Nejméně zastoupeným genotypem byl homozygotní genotyp GG, který se v kontrolní skupině vyskytoval u 11,5% a ve skupině pacientů s ADHD u 20% jedinců.



Obrázek 15: Porovnání frekvencí genotypů rs4818 mezi pacienty s ADHD (15 testovaných jedinců) a kontrolní skupinou (34 testovaných jedinců).

5.4 Vliv polymorfismu genu COMT na ASD

V následujících tabulkách 9 a 10 jsou zaznamenány zjištěné genotypové frekvence prověřovaných jedinců.

5.4.1 Výsledná evaluace genotypů SNP rs4680 u ASD

Tabulka 9: Zastoupení genotypů SNP rs4680 u pacientů s diagnózou ASD.

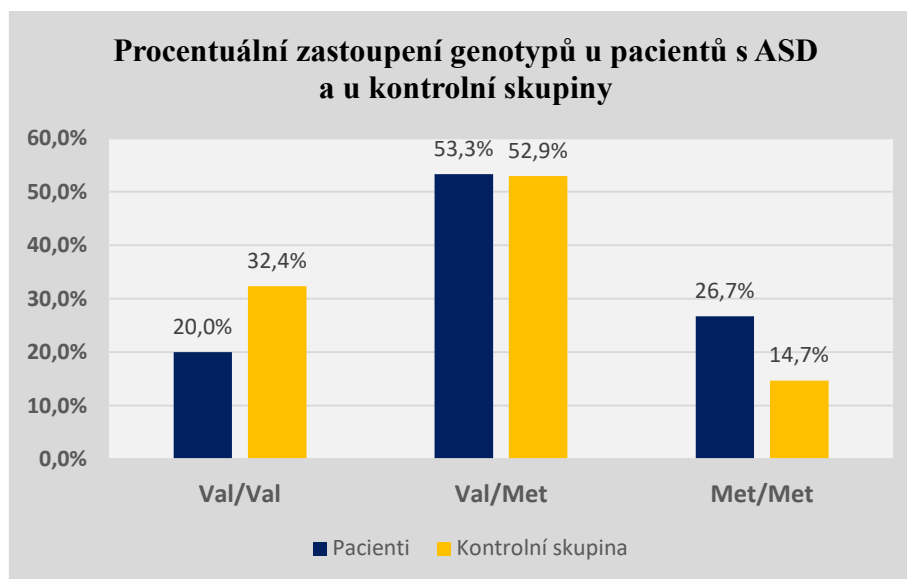
genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
Val/Val	9	20,0	Val	42	46,7
Val/Met	24	53,3	Met	48	53,3
Met/Met	12	26,7			
Celkem	45	100			

Tabulka 10: Zastoupení genotypů SNP rs4680 v kontrolní skupině.

genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
Val/Val	11	32,4	Val	40	58,8
Val/Met	18	52,9	Met	28	41,2
Met/Met	5	14,7			
Celkem	34	100			

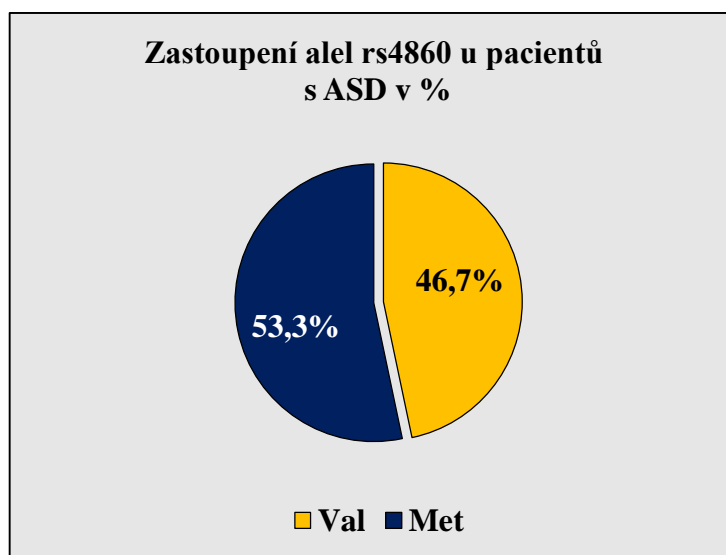
Z tabulky 9 je patrné, že bylo ve skupině pacientů s ASD nejvíce heterozygotů Val/Met (53,5%) a nejméně bylo homozygotů Val/Val (20,0%). Porovnání genotypových frekvencí polymorfismu rs4680 u pacientů s ASD a kontrolní skupinou je znázorněno na obr. 16. Při porovnání tabulky 9 a tabulky 10 je zajímavé frekvenční zastoupení homozygotů v obou skupinách. Ve skupině pacientů s ASD bylo zastoupeno 26,7% homozygotů Met/Met ve srovnání s kontrolní skupinou, kde bylo prokázáno 14,7% homozygotů Met/Met. Druhý rozdíl lze vidět mezi homozygoty Val/Val u pacientů

s ASD (20,2%) a kontrolní skupinou (32,4%). Tyto rozdíly však nebyly statisticky průkazné (použit Chí kvadrát test).



Obrázek 16: Porovnání frekvencí genotypů rs4860 mezi pacienty s ASD (testováno 45 jedinců) a kontrolní skupinou (testováno 34 jedinců).

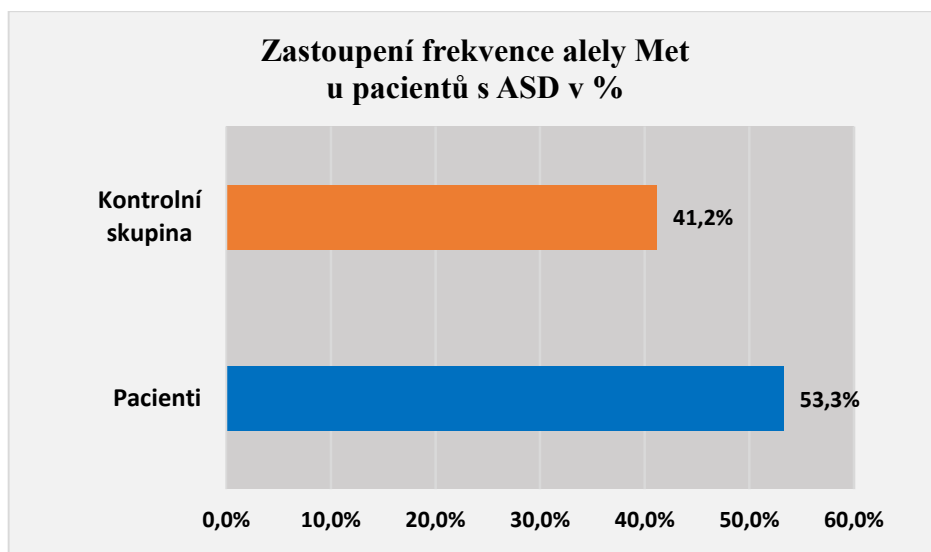
V této studii jsme v dalším postupu prověřovali frekvenční zastoupení jednotlivých alel u rs4860 u pacientů s ASD. Obrázek 17 jasně demonstruje, že u osob s ASD byla více zastoupena alela Met (53,3%).



Obrázek 17: Srovnání frekvence alel Val a Met u 45 testovaných pacientů s ASD.

Na základě předcházejících výsledů jsme zaměřili pozornost na frekvenční zastoupení alely Met. Ve skupině pacientů s ASD byla zaznamenána vyšší frekvence alely Met

(53,3%) v porovnání s kontrolní skupinou (41,2%). Tento rozdíl je zobrazen na obrázku 18.



Obr. 18: Porovnání frekvence alely Met ve skupině pacientů s ASD. Bylo prověřeno 45 osob s diagnózou ASD a v kontrolní skupině bylo vyšetřeno 34 osob bez stanovené diagnózy.

5.4.2 Výsledná evaluace genotypů SNP rs4818 u ASD

Dále jsme pokračovali v analýze genu COMT rs4818 u ASD. Níže uvedené tabulky 11, 12 zobrazují frekvence jednotlivých genotypů.

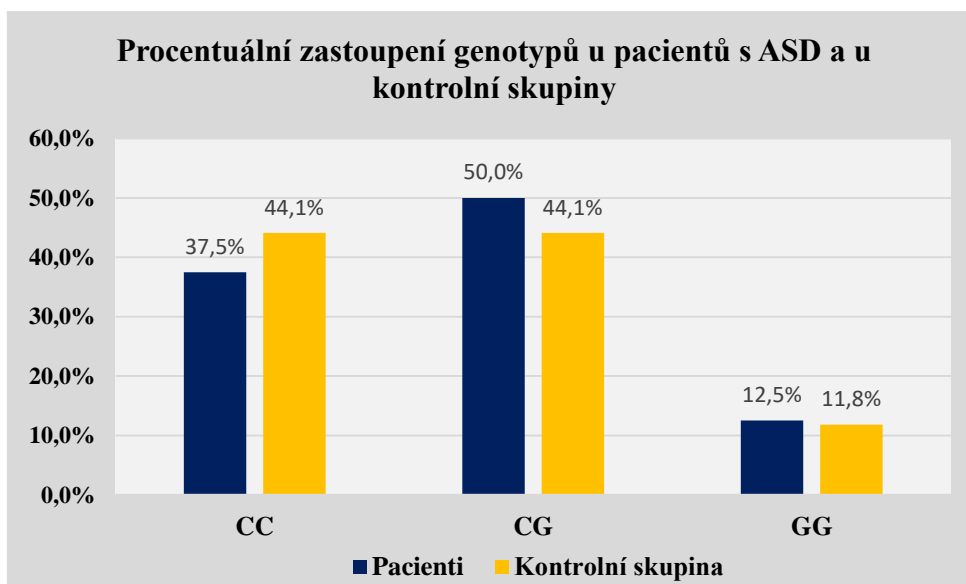
Tabulka 11: Zastoupení genotypů SNP rs4818 u pacientů s diagnózou ASD

genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
CC	12	37,5	C	40	62,5
CG	16	50	G	24	37,5
GG	4	12,5			
Celkem	32	100			

Tabulka 12: Zastoupení genotypů SNP rs4818 v kontrolní skupině

genotyp	počet	zastoupení v %	alela	počet	zastoupení v %
CC	15	44,1	C	45	66,2
CG	15	44,1	G	23	33,8
GG	4	11,8			
Celkem	34	100			

V tabulkách 11, 12 a obrázku 19 je znázorněno procentuální zastoupení genotypů u polymorfismu rs4818 v skupině pacientů s ASD a kontrolní skupině bez psychiatrické diagnózy. V obou skupinách byli nejvíce zastoupeni heterozygoti CG (50% ve skupině pacientů, 44,1% v kontrolní skupině). Na druhém místě byli homozygoti CC, u nichž ve skupině pacientů bylo 37,5 % a v kontrolní skupině 44,1%. Nejméně bylo homozygotů GG 12,5% ve skupině s ASD a 11,8% v kontrolní skupině.



Obr. 19: Porovnání frekvencí genotypů pro rs4818 mezi pacienty s ASD (32 testovaných jedinců) a kontrolní zdravou skupinou (34 testovaných jedinců).

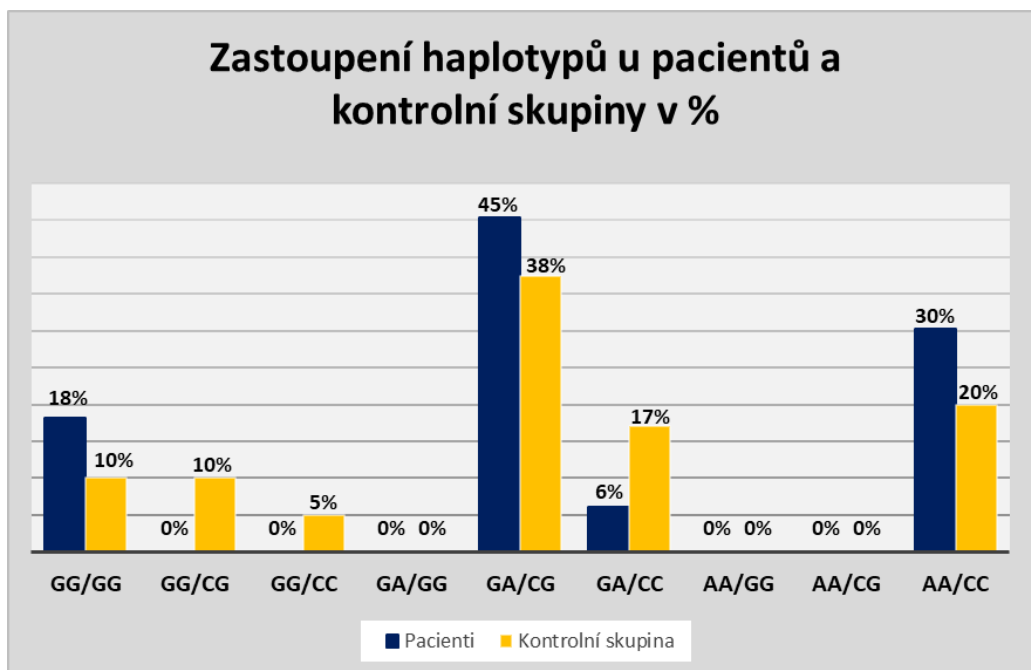
5.5 Vliv haplotypu na ADHD a ASD

Na výsledný fenotyp pacienta může mít vliv jeden SNP samostatně, ale v případě přítomnosti více SNP v genu předpokládáme jejich interakci, tedy výsledný genotyp je ovlivněn složením haplotypu. Logicky jsme předpokládali výskyt 9ti různých haplotypů, které jsou uvedeny spolu s jejich frekvenčním zastoupením v tabulce 13. Protože u sledovaného onemocnění ASD se souběžně vyskytuje ADHD jako přidružená komorbidita, spojili jsme tyto skupiny onemocnění do jedné větší skupiny pacientů.

Haplotyp	Počet pacientů	Zastoupení u pacientů v %	Počet osob v kontrolní skupině	Zastoupení v kontrolní skupině v %
GG/GG	6	18	4	10
GG/CG	0	0	4	10
GG/CC	0	0	2	5
GA/GG	0	0	0	0
GA/CG	15	46	15	37,5
GA/CC	2	6	7	17,5
AA/GG	0	0	0	0
AA/CG	0	0	0	0
AA/CC	10	30	8	20
Celkem	33	100	40	100

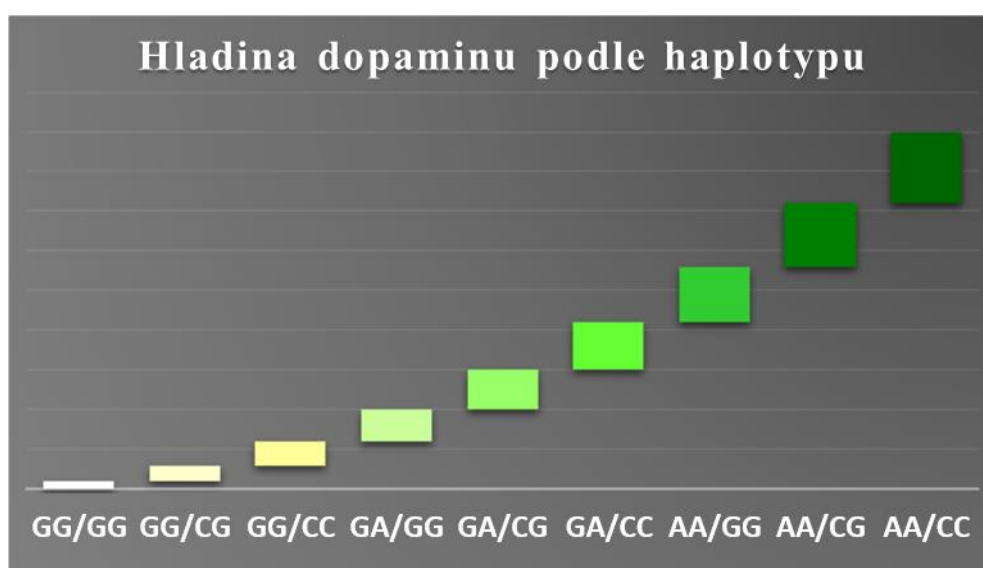
Tabulka 13: Distribuce haplotypů pro rs4860 a rs4818 v genu COMT ve skupině pacientů a v kontrolní skupině.

V naší testované skupině pacientů byly nejvíce zastoupeny haplotypy GA/CG (46%) a AA/CC (30%). V kontrolní skupině osob byla většina haplotypů GA/CG (37,5%). Frekvenční zastoupení jednotlivých haplotypů u pacientů a v kontrolní skupině je přehledně zobrazeno na následujícím obrázku 20. V této práci nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi frekvenčním zastoupením haplotypů u skupiny pacientů a v kontrolní skupině (užit Chí kvadrát test).



Obrázek 20: Frekvenční zastoupení haplotypů ve skupině pacientů a v kontrolní skupině.

V testované skupině pacientů nebylo nalezeno 5 haplotypů: GG/CG, GG/CC, GA/GG, AA/GG a AA/CG. Pro tyto haplotypy by byla aktivita COMT příliš nízká a hladina dopaminu zřejmě příliš vysoká nebo naopak. Na základě dostupných informací v odborné literatuře jsme sestavili graf, který znázorňuje pravděpodobnou hladinu dopaminu v prefrontální části mozku. Nejvyšší koncentraci dopaminu by mohl mít haplotyp AA/CC, optimální haplotyp GA/CG a nejnižší haplotyp GG/GG (znázorněno na obrázku 21).



Obrázek 21.: Srovnání haplotypů podle zvyšující se hladiny dopaminu.

6 Diskuze

V současné době jsou ASD spolu s ADHD hojně skloňovanými pojmy a zároveň narůstá počet nově diagnostikovaných případů. Nárůst je pravděpodobně způsoben větším povědomím o tomto tématu u odborné i široké veřejnosti a navíc se lidé za problémy související s těmito onemocněními již nestydí. Je také možné se zamyslet nad tím, jestli zvyšující se prevalence dětí s PAS nebo ADHD není spojena s vyšším věkem rodičů. Současně existují lepší diagnostické nástroje, které dokáží zachytit i děti mírnějšími projevy nemoci. Navzdory četným vědeckým studiím zatím nebyl prokázán jasně definovaný spouštěč, ale mnohé práce se snaží najít důkazy o tom, že poruchy autistického spektra a ADHD patří mezi geneticky podmíněná psychiatrická onemocnění. Proto jsme se také v této práci zabývali frekvenčním zastoupením genových variant dvou polymorfismů rs4680 a rs4818 v genu COMT u osob s diagnózou ADHD a ASD.

6.1 Vliv polymorfismu na ADHD

Příčiny vzniku ADHD mohou být částečně dědičné, a proto i genetické faktory mohou hrát při vzniku a průběhu onemocnění významnou roli. Vzhledem k obrovskému rozvoji epigenetiky můžeme mluvit spíše o predispozicích, které se mohou a nemusí projevit vlivem environmentálního prostředí. V posledních letech bylo publikováno velké množství studií o různých kandidátních genech asociovaných s ADHD, přičemž velká část se zaměřila na geny zapojené do metabolické dráhy enzymu COMT, který je zodpovědný za degradaci katecholaminů ve frontální části mozku (Banaschewski et al., 2010). Studovaným polymorfismem s předpokládaným vztahem k ADHD je funkční SNP v exonu 4 (rs4680), který vede k substituci aminokyseliny valinu za methionin. Tento polymorfismus rs4680 ovlivňuje enzymatickou aktivitu COMT, kdy u homozygotní formy Val/Val byla popsána 3-4krát vyšší aktivita COMT než u homozygotní formy Met/Met s tím, že alela Val byla dříve označena jako "riziková" pro ADHD (Lotta et al, 1995).

Cílem této práce bylo zjištění zastoupení frekvencí jednotlivých genotypů u pacientů s diagnózou ADHD v laboratoři GENLABS s.r.o. Nejdříve byla stanovena hypotéza na základě předchozích zahraničních studií, že u prověřovaných osob ADHD bude jiné frekvenční zastoupení genových variant zodpovědných za nízkou nebo vysokou hladinu dopaminu ve srovnání s kontrolní populací. V případě SNP rs4860 byli nejvíce v obou testovaných skupinách zastoupeni heterozygoti Val/Met (ve skupině pacientů s ADHD

46,7% a v kontrolní skupině 52,9%). Je to pravděpodobně dáno tím, že se jedná o selektivně nejvýhodnější genotyp, u kterého je hladina dopaminu v prefrontální části mozku v rovnovážné koncentraci. Takový jedinci jsou následně ve svém životním cyklu úspěšnější, jednak při používání pracovní paměti, udržení pozornosti, ale převyšují ostatní také v oblasti sociálního chování. Homozygotní jedinci Val/Val převažovali v kontrolní skupině. Rozdíl v zastoupení genotypu byl možný vidět u homozygotů Met/Met, v kontrolní skupině jich bylo 14,7% a u pacientů s ADHD 30,3%. V této práci nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi jednotlivých genotypů v testovaných skupinách. Ačkoliv některé předchozí studie ukázaly, že alela Val byla častější ve skupině pacientů s ADHD ve srovnání s běžnou populací (Eisenberg et al., 1999; Kereszturi et al., 2008), jiné výzkumy neprokázaly žádnou spojitost mezi genem COMT a ADHD (Barr et al., 1999; Shiffrin et al., 2013). Tyto výsledky lze přičíst možné polygenní povaze ADHD. Jednotlivé polymorfismy mohou hrát relativně malou roli jako modifikátory etiologie ADHD, které lze obtížně detekovat v malých studijních skupinách (Unal et al., 2016).

Vysvětlením zjištěného frekvenčního zastoupení testovaných genotypů u ADHD může být další velmi významný biologický mechanismus, epigenetika. Metylace DNA, nejvíce studovaná z hlediska exprese genů, významně ovlivňuje genové aktivity v závislosti na faktorech prostředí. Metylace je schopná ovlivňovat kognitivní funkce mozku (Moore et al., 2013), které mohou být hodnoceny jako patologické v rámci diagnostiky ADHD.

V dalším postupu jsme se zaměřili na porovnání frekvencí jednotlivých alel ve skupině osob s ADHD. Bylo zjištěno vyšší frekvenční zastoupení alely Met rs4680 (56,9%) oproti alele Val (43,1%) u pacientů s ADHD. Literatura sice uvádí, že spíše alela Val je charakteristická pro skupinu osob s ADHD. Na druhou stranu se naše výsledky shodují s prací Unal et al., 2016, kde byla alela Met častější ve skupině pacientů s charakteristickým podtypem ADHD, u nichž se více projevovaly poruchy pozornosti a neschopnost organizovat myšlenky, stanovit si priority a rozhodovat se (Qian et al., 2009). Navíc se předpokládá, že do vztahu mezi polymorfismem Val/Met zasahuje pohlaví jedince. U chlapců riziko stoupá v přítomnosti alely Met, zatímco u dívek může zvyšovat riziko ADHD alela Val (Neumannová et al., 2010).

Druhá prověřovaná frekvence genotypů se týkala polymorfismu rs4818. Polymorfismus COMT rs4818, lokalizovaný také v exonu 4, je synonymní polymorfismus, který se

skládá ze substituce C/G v kodonu 86 S-COMT a kodonu 136 v MB-COMT (Perkovic et al, 2020). Tento polymorfismus ovlivňuje prefrontální dopaminovou funkci. Jedinci s genotypem COMT rs4818 GG mají vyšší aktivitu COMT než jedinci s genotypem CC a přítomnost alely G vede ke snížené tonické dopaminové signalizaci v prefrontálním kortexu (Roussos et al, 2008). Změna hladin dopaminu by měla souviset s různou genovou expresí, což bychom měli poznat na rozdílné frekvenci genotypů mezi pacienty s ADHD a kontrolní skupinou bez stanovené diagnózy. V této práci však nebyl ani v případě rs4818 nalezen statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi genových variant ve studovaných skupinách.

Při porovnání námi zjištěných genových frekvencí v rs4818 s evropskou populací na základě dat uvedených v genetické databázi Ensembl Genome Browser (dostupné na ensembl.org), jsou naše výsledky podobné. Podle této databáze se u jedinců žijící na evropském kontinentě vyskytuje nejvíce heterozygotů CG (46,7%) a nejméně homozygotů GG (16,9%) (Ensembl Genome Browser, 2024), což odpovídá i námi zjištěným genotypovým frekvencím v kontrolní skupině. Pokud bychom chtěli lépe porozumět našim výsledkům ohledně genetického vlivu na ADHD, bylo by lepší porovnat získaná data s kontrolní databází genetické informace typické pro českou populaci. V červnu minulého roku byl ukončen pilotní projekt A-C-G-T, jež měl za cíl sestavit kontrolní databázi pro účely lepší diagnostiky genetických onemocnění. V současné době je v databázi přes tisíc vzorků a stále je doplňován novými výsledky. Tedy až bude možné volně nahlížet do této databáze, jistě tudy povede společná cesta i s dalšími lékařskými obory, což umožní přesnější rozpoznání diagnózy a použití individuální léčby.

Zásadní problémem této práce je malý počet vyšetřených jedinců ve skupině jak pacientů s ADHD, tak i v kontrolní skupině. Hlavně v oblasti výzkumu geneticky podmíněných onemocnění může být nízký počet jedinců v prověřované skupině spojován s vyšší pravděpodobností falešně pozitivních nebo negativních výsledků (Lepš a Šmilauer, 2016). Proto při pokračování výzkumu v této oblasti by bylo vhodné rozšířit testované soubory o další vzorky.

6.2 Vliv polymorfismu genu COMT na ASD

Porucha autistického spektra je komplexní vývojové onemocnění s mnoha etiologiemi a různými stupni závažnosti (Karam et al, 2013). V této práci jsme zkoumali asociaci

polymorfismů v genu COMT s ASD. Na základě našich výsledků v laboratoři jsme nepotvrdili, že genetická variabilita v genu COMT by mohla být kandidátním faktorem pro stanovení ASD. Studium polymorfismů COMT je stále diskutabilní a kontroverzní. Výsledky některých prací korelují s výstupy naší práce, jiné naopak tvrdí, že polymorfismus rs4680 má statisticky významný vliv na patologický vývoj ASD (Karam et al., 2013). Tato rozdílné výsledky mohou mít mnoho příčin jako je například populační variabilita, věk, pohlaví, velikost zkoumané skupiny. Jedno je ale jasné. Pro správnou fyzickou i psychickou pohodu je životně důležitá správná rovnováha dopaminu. Výkyvy hladiny dopaminu na jednu nebo druhou stranu mohou mít za následek patologické změny, které mohou vést k různě dynamickým fenotypovým charakteristikám autismu.

Další autoři také přicházejí s různými zajímavými hypotézami, proč jednou za projevy autismu stojí alela Val a podruhé alela Met. Vychází z teorie bojovníka versus přemýšlivce. Lidé s Val mají zvýšenou aktivitu COMT a nižší prefrontální extracelulární dopamin ve srovnání s těmi, kteří nesou alelu Met. Alela Val může být spojena s výhodou při zpracování averzivních podnětů (strategie bojovníka), zatímco alela Met je výhodná při řešení úkolů zaměřených na paměť a pozornost (strategie přemýšlení). Za předpokladu zvýšeného uvolňování dopaminu (např. při stresu) mohou mít jedinci Val/Val lepší dopaminergní přenos a výkon, zatímco jedinci s Met/Met mohou mít méně účinnou neurotransmisi a horší výkon (Stein et al., 2006).

6.3 Propojení vlivu polymorfismu genu COMT na ASD a ADHD

V této práci nebylo prokázáno jiné frekvenční zastoupení pro genotypy rs4860 a rs4818 mezi pacienty s ADHD a ani mezi pacienty s ASD ve srovnání s kontrolní skupinou bez neurobiologického onemocnění. V literatuře se uvádí, že společné rysy ASD a ADHD se mohou překrývat. V jiné studii vyvodili významný fenotypový, ale i genotypový přesah mezi ADHD a autismem. Odhaduje se, že 22–83 % autistických dětí splňuje kritéria pro ADHD a přibližně 30 – 60% dětí s ADHD má výrazné autistické rysy (Sokolova et al., 2017). Obě poruchy zahrnují potíže s pozorností, komunikací s vrstevníky, impulzivitu a různé stupně neklidu či hyperaktivity a také podle všeho, mají i společný genetický základ (Rommelse et al., 2010). Z tohoto důvodu pravděpodobně nebyly shodně nalezeny rozdíly mezi frekvenčním zastoupením genotypů u pacientů a kontrolní skupinou.

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které se nacházejí každých 250–350 bp v lidském genomu, jsou zodpovědné za většinu genetické variability v lidské populaci (Beaudet et al., 2001; Cargill et al., 1999). V posledních letech SNPs získaly velkou popularitu díky jejich četnosti a užitečnosti při mapování genů zodpovídajících za komplexní choroby a také při identifikaci genetických variant ovlivňujících lékovou odpověď (Niu et al., 2002). Avšak různá metabolická, kardiovaskulární, onkologická a psychiatrická onemocnění, která jsou v centru pozornosti dnešní medicíny, vykazují většinou komplexní charakter. Proto je výhodnější se nezaměřovat pouze na jeden vybraný SNP, ale na interakci více genetických faktorů. Tento vztah je možné hodnotit pomocí složených genotypů tzv. haplotypů. Nackley et al. (2006) prokázal, že haplotypy COMT mají silnější účinky na celkovou enzymatickou aktivitu než samotný polymorfismus Val/Met. Také Handoko et al. (2005) potvrdil, že polymorfismus je třeba studovat v kontextu haplotypů a ne samostatně. Proto i my jsme předpokládali, že analýza haplotypů pro rs4860 a rs4818 v genu COMT by mohla odhalit více informací o jejich asociaci s onemocněním ASD a ADHD.

U testovaných jedinců jsme sledovali 9 možných haplotypů a jejich frekvenční zastoupení nejen v společné skupině pacientů s ASD a ADHD, ale také v kontrolní skupině. Ve skupině pacientů byly nejvíce zastoupeny haplotypy GA/CG (45%) a AA/CC (31,3%). Podobné zastoupení bylo i v kontrolní skupině, kde kromě nejčastějšího haplotypu GA/CG (38%) a AA/CC (20%) byl významně zastoupen také haplotyp GA/CC (17%). Neurovývojová porucha je často spojována se správnou rovnováhou dopaminu, která je životně důležitá pro psychickou i fyzickou pohodu. Nejvyšší zastoupení haplotypu GA/CG zjištěné jak ve skupině pacientů, tak i v kontrolní skupině, je pravděpodobně spojeno s optimální hladinou dopaminu v mozku. Druhý nejvíce zastoupení haplotyp AA/CC ve skupině pacientů zodpovídá za nejnižší enzymatickou aktivitu COMT a tedy vysokou hladinu dopaminu. Vzhledem ke zjištění, že hladina dopaminu v prefrontálním kortexu souvisí se symptomy ADHD, hlavně s hyperaktivitou (Sagvolden et al., 2005), mohla by námi zjištěná experimentální data prezentovat haplotyp AA/CC jako pomocný diagnostický marker pro onemocnění ADHD nebo ASD. Na druhou stranu dopaminový efekt působí jako na houpačce. Velké převýšení na obě strany může mít za následek patologické změny, které vedou k různým změnám charakterizující fenotypové projevy onemocnění (Diamond et al., 2004). V naší skupině pacientů bylo zjištěno 18% zastoupení haplotypu GG/GG. U tohoto haplotypu se můžeme domnívat, že hladina

dopaminu bude spíše nízká. Nedostatek dopaminu se může projevit depresemi (Dunlop et al., 2007) antisociálními chováním, špatným spánkem, nedostatečnou koncentrací a zhoršenou pamětí (Parbo et al., 2007).

Některé haplotypy se nevyskytovali ani v jedné testované skupině. Jednalo se o haplotypy GA/GG, AA/GG a AA/CG, což bylo velmi zajímavé. Tyto haplotypy zřejmě ovlivňují aktivitu COMT tak významně, že jsou selektivně znevýhodněny. Jiným vysvětlením může být genová vazba (cis/trans), kdy je alela Met (A) s alelou C a alela Val (G) s alelou G ve vazbě. Jedná se o zcela originální výsledky, které nebyly pro českou populaci dosud publikovány.

Pro přesnější analýzu výskytu konkrétního haplotypu a jeho správnou interpretaci v souvislosti se zvýšenou predispozicí k nemoci je zapotřebí daleko většího množství dat, než poskytuje tato práce. Tím se zde otevírá velká výzva pro pokračující výzkum s cílem zvětšit základní soubor testovaných osob a snažit se rozluštit vztah haplotypu ke zkoumanému onemocnění.

7 Závěr

V současné době představuje studium poruch autistického spektra a poruch hyperaktivity velmi složité a široké téma. Podílejí se na něm vědci z oboru neurologie, psychologie, psychiatrie i genetiky. Všichni se snaží najít a pochopit základní příčinu zodpovědnou za vznik těchto onemocnění. ASD a ADHD mohou být asociovány s genovou variabilitou, a proto jsme i my zkoumali v naší práci frekvenční zastoupení genových variant zodpovědných za nízkou nebo vysokou hladinu dopaminu u jedinců s diagnózou i bez diagnózy. Genetickou analýzu jsme prováděli u dvou polymorfismů v genu COMT, konkrétně rs4680 a rs4818. Na základě našich výsledků jsme nepotvrdili hypotézu, že výše uvedené polymorfismy v genu COMT by mohly být průkazným rizikovým faktorem pro vznik ASD a ADHD.

Pochopení příčiny patogeneze těchto onemocnění na molekulárně-genetické úrovni je velice komplikované, neboť každá osoba je jedinečná a její neurologický vývoj a možné potíže ovlivňuje celá řada dalších epigenetických i environmentálních faktorů. Hlavním problémem zde byl malý počet zúčastněných jedinců, což ovlivnilo statistické zhodnocení výsledků. Zajímavé a originální bylo zjištění výskytu kombinace haplotypu pro rs4860 a rs4818 u testovaných jedinců. Podobná data nebyla dosud pro českou populaci publikována.

Výsledky práce mohou pomoci k zlepšení identifikace geneticky podmíněného onemocnění, objasnit konkrétní model poruch autistického spektra a přispět další kapkou vědomostí na cestu k adekvátní léčbě. Tímto malým krokem lze v praxi bezprostředně ovlivnit i běžný život pacienta s takovou poruchou a zkvalitnit jeho složitý život. Přímá léčba není možná, ale pokud budeme schopni správně určit diagnózu, bude možné zahájit kvalitní behaviorální léčbu, a zvážit také speciální pedagogické a psychologické vedení. Tato opatření následně mohou zlepšit péči o pacienta

8 Seznam použité literatury

1. ANDERSEN, S., a SKORPEN, F., 2009. Variation in the COMT gene: implications for pain perception and pain treatment. *Pharmacogenomics*. 10(4), 669-84. doi: 10.2217/pgs.09.13.
2. ATKINSON, Rita L., 2003. *Psychologie*. 2. vydání. Praha: Portál. 752 s. ISBN 80-7178-640-3.
3. BANASCHEWSKI, T., BECKER, K., SCHERAG, S., FRANKE, B., COGHILL, D., 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *European child & adolescent psychiatry*. 19(3), 237-257. doi: 10.1007/s00787-010-0090-z.
4. BARR, Cathy L., WIGG, K., MALONE, M., SCHACHAR, R., ROBERTS, W., KENNEDY, J.L., 1999. Linkage study of catechol-O-methyltransferase and attention-deficit hyperactivity disorder. *American journal of medical genetics*. 88(6), 710–713. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19991215)88:6<710::aid-ajmg23>3.0.co;2-q.
5. BEAUDET, L., BEDART, J., BRETON, B., MERCURI, R., J., a BUDARF, M., L., 2001. Homogeneous assays for single-nucleotide polymorphism typing using AlphaScreen. *Genome Research*. 11(4), 600-608. doi: 10.1101/gr.172501.
6. BELLGROVE, M., A., DOMSCHKE, K., HAWI, Z., KIRLEY, A., MULLINS, C., ROBERTSON, I., H., GILL, M., 2005. The methionine allele of the COMT polymorphism impairs prefrontal cognition in children and adolescents with ADHD. *Experimental Brain Research*. 163(3), 352-360. doi: 10.1007/s00221-004-2180-y.
7. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum Press, 194 s. ISBN: 978-80-246-3224-7.
8. BLASI, G., MATTAY, V., S., BERTOLINO, A., ELVEVAG, B., CALLICOTT, J., H., DAS, S., KOLACHANA, B., S., EGAN, M., F., GOLDBERG, T., E., WEINBERGER, D., R., 2005. Effect of catechol-O-methyltransferase val158met

- genotype on attentional control. *Journal of Neuroscience*. 25(20), 5038-5045. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0476-05.2005.
9. BONIFÁCIO, M., J., PALMA, P., N., ALMEIDA, L., SOARES-DA-SILVA, P., 2007. Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease. *CNS Drug Reviews*. 13(3), 352-379. doi: 10.1111/j.1527-3458.2007.00020.x.
 10. BYMASTER, F., P., KATNER J., S., NELSON D., L., HEMRICK-LUECKE, S., K., THRELKELD, P., G., HEILIGENSTEIN, J., H., MORIN S., M., GEHLERT, D., R., PERRY, K., W., 2002. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*, 27(5), 699-711. doi: 10.1016/S0893-133X(02)00346-9.
 11. CARGILL, M., ALTSHULER, D., IRELAND, J., SKLAR, P., ARDLIE, K., PATIL, N., SHAW, N., LANE, C., R., LIM, E., P., KALYANARAMAN, N., NEMESH, J., ZIAUGRA, L., FRIEDLAND, L., ROLFE, A., WARRINGTON, J., LIPSHUTZ, R., DALEY, G., Q., LANDER, E., S., 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*. 22(3), 231-238. doi: 10.1038/10290.
 12. CASPI, A., LANGLEY, K., MILNE, B., MOFFITT, T., E., ODO NOVAN, M., OWEN, M., J., TOMAS, M., P., POULTON, R., RUTTER, M., TAYLOR, A., WILLIAMS, B., THAPAR, A., 2008. A replicated molecular genetic basis for subtyping antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Archives of general psychiatry*. 65(2), 203-210. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2007.24.
 13. CATALÁ-LÓPEZ, F., HUTTON, B., NUNEZ-BELTRAN, A., PAGE, M., J., RIDAO, M., SAINT-GERONS, D., M., CATALA, M., A., TABARES-SEISDEDOS, R., MOHER, D., 2017. The pharmacological and non-pharmacological treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: a systematic review with network meta-analyses of randomised trials. *PloS one*. 12(7), 1-31. doi: 10.1371/journal.pone.0180355.

14. CORTESE, S., 2020. Pharmacologic treatment of attention deficit–hyperactivity disorder. *New England Journal of Medicine*. 383(11), 1050-1056. doi: 10.1056/NEJMra1917069.
15. DA SILVA, B., GREVET, E., H., SILVA, L., C., F., RAMOS, J., K., N., ROVARIS, D., L., BAU, C., H., D., 2023. An overview on neurobiology and therapeutics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Discover Mental Health*. 3(1), 1-21. doi: 10.1007/s44192-022-00030-1.
16. DEAN, B., PARKIN G., a GIBBONS, A., S., 2020. Associations between catechol-O-methyltransferase (COMT) genotypes at rs4818 and rs4680 and gene expression in human dorsolateral prefrontal cortex. *Experimental brain research*. 238(2), 477-486. doi:10.1007/s00221-020-05730-0.
17. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 2013. [online]. American Psychiatric association [cit. 2023-12-10]. Dostupné z: [https://repository.poltekkes-kaltim.ac.id/657/1/Diagnostic%20and%20statistical%20manual%20of%20mental%20disorders%20_%20DSM-5%20\(%20PDFDrive.com%20\).pdf](https://repository.poltekkes-kaltim.ac.id/657/1/Diagnostic%20and%20statistical%20manual%20of%20mental%20disorders%20_%20DSM-5%20(%20PDFDrive.com%20).pdf)
18. DIAMOND, A., BRIAND, L., FOSSELLA, J., GEHLBACH, L., 2004. Genetic and neurochemical modulation of prefrontal cognitive functions in children. *American Journal of Psychiatry*. 161(1), 125-132. doi: 10.1176/appi.ajp.161.1.125.
19. DIATCHENKO, L., SLADE, G., D., NACKLEY, A., G., BHALANG, K., SIGURDSSON, A., BELFER, I., GOLDMAN, D., XU, K., SHABALINA, S., A., SHAGIN, D., MAX, M., B., MAKAROV, S., S., MAIXNER, W., 2005. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Human molecular genetics*. 14(1), 135-143. doi: 10.1093/hmg/ddi013.
20. DUDOVÁ, I., MOHAPLOVÁ, M., 2016. Poruchy autistického spektra-1. díl. *Pediatric pro praxi*. 17(3), 151-153. doi: 10.36290/ped.2016.034
21. DUDOVÁ, I., MOHAPLOVÁ, M., 2016. Poruchy autistického spektra-2. díl. *Pediatric pro praxi*, 17(4), 204-207. doi: 10.36290/ped.2016.047.

22. DUNLOP, B., W a NEMEROFF, CH., B., 2007. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of general psychiatry*. 64(3), 327-337. doi: 10.1001/archpsyc.64.3.327.
23. EGAN, M., F., GOLDBERG, T., E., KOLACHANA, B., S., CALLICOTT, J., H., MAZZANTI, C., M., STRAUB, R., E., GOLDMAN, D., WEINBERGER, D., R., 2001. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(12), 6917-6922. doi: 10.1073/pnas.111134598.
24. EISENBERG, J., MEI-TAL, G., TARTAKOVSKY, E., ZOHAR, A., GRITSENKO, I., NEMANOV, L., EBSTEIN, R., P., 1999. 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. *American journal of medical genetics*.88(5), 497-502. doi: org/10.1002/(SICI)1096-8628(19991015)88:5<497::AID-AJMG12>3.0.CO;2-F
25. EISENHOFER, G., KOPIN I., GOLDSTEIN, D., S., 2004. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*. 56(3), 331-349. doi: 10.1124/pr.56.3.1.
26. *Ensemble Genome Browser*, otevřený přístup integrovaného genomu [online]. [cit.2024-2-15] Dostupné z: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=22:19963184-19964184;v=rs4818;vdb=variation;vf=1093709674
27. ESMAIEL, N., N., ASHAAT, E., A., MOSAAD, R., FAYEZ, A., IBRAHIM, M., ABDALLAH, Z., Y., ISSA, M., Y., SALEM, S., RAMADAN, A., WAKEEL, M., A., E., ASHAAT, N., A., ZAKI, M., S., ISMAIL, S., 2020. The potential impact of COMT gene variants on dopamine regulation and phenotypic traits of ASD patients. *Behavioural Brain Research*. 378. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112272.
28. FERNSTROM, J., D., a FERNSTROM, M., H., 2007. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of Nutrition*. 137(6 Suppl1), 1539-1547. doi: 10.1093/jn/137.6.1539S.

29. FINBERG, J., P., M., 2019. Inhibitors of MAO-B and COMT: their effects on brain dopamine levels and uses in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 126(4), 433-448. doi: 10.1007/s00702-018-1952-7.
30. GASMI, A., NASREEN, A., MENZEL, A., BENAHMED, A., G., PIVINA, L., NOOR, S., PEANA, M., CHIRUMBOLO, S., BJORKLUND, G., 2022. Neurotransmitters Regulation and Food Intake: The Role of Dietary Sources in Neurotransmission. *Molecules*. 28(1), 2-21. doi: 10.3390/molecules28010210.
31. GARRIS, P., A., COLLINS, L., B., JONES, S., R., a WIGHTMAN, R., M., 1993. Evoked extracellular dopamine in vivo in the medial prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*. 61(2), 637-647. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb02168.x.
32. GUILLOT, T., S., a MILLER, G., W., 2009. Protective Actions of the Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) in Monoaminergic Neurons. *Molecular Neurobiology*. 39(2), 149-170. doi: 10.1007/s12035-009-8059-y.
33. GUO, T., WANG, W., LIU, B., CHEN, H., YANG, CH., 2013. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and risk of autism spectrum disorders. *Journal of international medical research*. 41(3), 725-734. doi: 10.1177/0300060513479871.
34. HANDOKO, H. Y., NYHOLT, D., R., HAYWARD, N., K., NERTNEY, D., A., HANNAH, D., E., WINDUS, L., C., McCORMACK, C., M., SMITH, H., J., FILIPPICH, C., JAMES, M., R., MOWRY, B., J., 2005. Separate and interacting effects within the catechol-O-methyltransferase (COMT) are associated with schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 10(6), 589-597. doi: 10.1038/sj.mp.4001606.
35. HANKOVÁ, B., 2013. Cesty k léčbě autismu. *Psychologon*. [online] [cit. 2024-03-15]. ISSN: 1805-7160. Dostupné z: <https://www.psychologon.cz/component/content/article/141-cesty-k-lecbe-autismu>.
36. HAWI, Z., MILLAR, N., DALY, G., FITZGERALD, M., GILL, M., 2000. No association between catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample. *American journal of medical genetics*. 96(3), 282-284. doi: 10.1002/1096-8628(20000612)96:3<282::aid-ajmg9>3.0.co;2-r.

37. HONG, J., SHU-LEONG, H., TAO, X., a LAP-PING, Y., 1998. Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *NeuroReport*. 9(12), 2861-2864. doi: 10.1097/00001756-199808240-00033.
38. CHANG, Z., GHIRARDI, L., QUINN, P., D., ASHERSON, P., DONOFRIO, B., M., LARSSON, H., 2019. Risks and benefits of attention-deficit/hyperactivity disorder medication on behavioral and neuropsychiatric outcomes: a qualitative review of pharmacoepidemiology studies using linked prescription databases. *Biological psychiatry*. 86(5), 335-343. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.04.009.
39. CHANNER, B., MATT, S., M., NICKOLOFF-BYBEL, E., A., PAPPA, V., AGARWAL, Y., WICKMAN, J., a GASKIL, P., J., 2023. Dopamine, Immunity, and Disease. *Pharmacological Reviews*. 75(1), 62-158. doi: 10.1124/pharmrev.122.000618.
40. CHEN, J., LIPSKA, B., K., HALIM, N., MA, Q., D., MATSUMOTO, M., MELHEM, S., KOLACHANA, B., S., HYDE, T., M., HERMAN, M., M., AQUUD, J., EGAN, M., KLENMAN, J., E., WEINBERGER, D., 2004. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *The American Journal of Human Genetics*. 75(5), 807-821. doi: 10.1086/425589.
41. CHEN, J., SONG, J., YUAN, P., TIAN, Q., JI, Y., REN-PATTERSON, R., LIU, G., SEI, Y., WEINBERGER, D., R., 2011. Orientation and cellular distribution of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in cortical neurons: implications for drug development. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(40), 34752-34760. doi: 10.1074/jbc.M111.262790.
42. CHEUK, D., K., L., a WONG, V., 2006. Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Behavior genetics*. 36(5), 651-659. doi: 10.1007/s10519-006-9076-5.
43. IOANNIDIS, K., REDDEN, S., A., VALLE, S., CHAMBERLAIN, S., R., GRANT, J., E., Problematic internet use: an exploration of associations between

cognition and COMT rs4818, rs4680 haplotypes. *CNS spectrums*. 25(3), 409-418.
doi: 10.1017/S1092852919001019

44. JIANG, W., SHANG, S., a SU, Y., 2015. Genetic influences on insight problem solving: the role of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms. *Frontiers in psychology*. 6, 1-8. doi: 10.3389/fpsyg.2015.01569.
45. KARAM, R., A., REZK, N., A., ABDELRAHMAN, H., M., HASSAN, T., H., MOHAMMAD, D., HASHIM, H., M., ABEL FATTAH, N., R., A., 2013. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and hyperactivity symptoms in Egyptian children with autism spectrum disorder. *Research in developmental disabilities*. 34(7), 2092-2097. doi: 10.1016/j.ridd.2013.04.002.
46. KERESZTURI, E., TARNOK, Z., BOGNAR, E., LAKATOS, K., FARKAS, L., GADOROS, J., SASVARI_SZEKELY, M., NEMODA, Z., 2008. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147B(8), 1431-1435. 0.1002/ajmg.b.30704.
47. KLEIN, M., BATTAGELLO, D., S., CARDOSO, A., R., HAUSER, D., N., BITTENCOURT, J., C., a CORREA, R., 2019. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 39(1), 31-59. doi: 10.1007/s10571-018-0632-3.
48. KOPEČKOVÁ, I., PACLT, I., PETRÁŠEK, J., PACLTOVÁ, D., MALÍKOVÁ, M., a ZAGATOVÁ, V., 2008. Some ADHD polymorphisms (in genes DAT1, DRD2, DRD3, DBH, 5-HTT) in case-control study of 100 subjects 6–10 age. *Neuroendocrinology Letters*. 29(2), 246-251. ISSN: 0172-780X
49. KUŽELOVÁ, H., MACEK, M., RABOCH, J., PTÁČEK, R., 2014. Genetická variabilita u poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD). *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 77/110(4), 423-427. ISSN: 1210-7859
50. LACHMAN, H., M., PAPOLOS, D., F., SAITO, T., YU, Y., M., SZUMLANSKI, C., L., WEINSHILBOUM, R., M., 1996. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential

application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* . 6(3), 243-250. doi: 10.1097/00008571-199606000-00007.

51. LEPŠ, J., ŠMILAUER, P., 2016. *Biostatistika*. České Budějovice: Episteme, Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 440 s. ISBN 9788073945879.
52. LERNER, M., D., WHITE, S., W., McPARTLAND, J. C., 2012. Mechanisms of change in psychosocial interventions for autism spectrum disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(3), 307-318. doi: 10.31887/DCNS.2012.14.3/mlerner.
53. LIANG, C-L., NELSON, O., YAZDANI, U., PASBAKHS, P., GERMAN, D., C., 2004. Inverse relationship between the contents of neuromelanin pigment and the vesicular monoamine transporter-2: human midbrain dopamine neurons. *Journal of Comparative Neurology*. 473(1), 97-106 doi: 10.1002/cne.20098.
54. LIMPRASERT, P., MAISRIKHAW, W., SPIRO, T., WIROJANAN, J., HANSAKUNACHAI, T., ROONGPRAIWAIN, R., SOMBUNTHAM, T., RUANGDARAGANON, N., XIUQING, G., 2014. No association of Val158Met variant in the COMT gene with autism spectrum disorder in Thai children. *Psychiatric Genetics*. 24(5), 230-231. doi: 10.1097/YPG.0000000000000046.
55. LOTTA, T., VIDGREN, J., TILGMAN, C., ULMANEN, I., MELÉN, K., JULKUNEN, I., TASKINEN, J., 1995. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*. 34(13), 4202-4210. doi: 10.1021/bi00013a008.
56. LUNDSTRÖM, K., TENHUNEN, J., TILGMANN, C., KARHUNEN, T., PANULA, P., ULMANEN, I., 1995. Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1251(1), 1-10. doi: 10.1016/0167-4838(95)00071-2.

57. MAROTTA, R., RISOLEO, M., C., MESSINA, G., PARISI, L., CAROTENUTO, M., VETRI, L., ROCELLA, M., 2020. The Neurochemistry of Autism. *Brain sciences*. 10(3), 1-18. doi: 10.3390/brainsci10030163.
58. MATSUMOTO, M., WEICKERT, C., S., AKIL, M., LIPSKA, B., K., HYDE, T.M., HERMAN, M., M., KLEINMAN, J., E., WEINBERGER, D., R., 2003. Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience*, 116(1), 127-137. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00556-0.
59. MOORE, L., D., LE, T., FAN, G., 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 38(1), 23-28. doi: 10.1038/npp.2012.112.
60. MRAVEC, B., 2007. *Neurotransmitery* [online]. Bratislava: 1. SAP – Slovak Academic Press [cit. 2023-10-28]. ISBN ISBN 80–8095–005–9. Dostupné z: https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektrotonicke_knihy_LF_UK/Neurotransmitery.pdf
61. NACKLEY, A., A., SHABALINA, S., A., TCHIVILEVA, I., E., SATTERFIELD, K., KORCHYNSKYI, O., MAKAROV, S., S., MAIXNER, W., DIATCHENKO, L., 2006. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 314(5807), 1930-1933. doi: 10.1126/science.1131262.
62. NEUMANNOVÁ, M., DRTÍLKOVÁ, I., ŠERÝ, O., FILOVÁ, A., BARTOŇOVÁ, P., ČASTULÍK, L., 2010. Vztah poly-morfismů genů pro DRD2, DAT1, COMT, MAOB, BDNF, IL 2 a IL 6 a charakteristik kognitivního výkonu u adolescentních chlapců s ADHD. *Česká a slovenská psychiatrie*. 106(6), 343-350. ISSN 1212-0383.
63. NIU, T., QIN, Z., S., XU, X., LIU, J., S., 2002. Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*. 70(1), 157-169. doi: 10.1086/338446.
64. NOVÁK, J., 2014. *Poruchy autistického spektra a nové přístupy v jejich léčbě*. Praha. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Karlova.

65. PACLT, Ivo, 2016. ADHD v dětství, dospívání a dospělosti. *Praktické lékařství*. 12(1), 16-17. ISSN 1803-5329.
66. PARBO, C., A., EBERHART, CH., G., 2007. The neurobiology of autism. *Brain Pathology*. 17(4), 434-347. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00102.x.
67. PARKIN, G., M., UDAWELA, M., GIBBONS, a., SCAR, E., DEAN, B., 2018. Catechol-O-methyltransferase (COMT) genotypes are associated with varying soluble, but not membrane-bound COMT protein in the human prefrontal cortex. *Journal of human genetics*. 63(12), 1251-1258. doi: 10.1038/s10038-018-0511-2.
68. PERKOVIC, M., N., SAGUD, M., ZIVKOVIC, M., UZUN, S., ERJAVEC, G., N., KOZUMPLIK, O., STRAC, D.S., MIMICA, N., PELES, A., M., PIVAC, N., 2020. Catechol-O-methyltransferase rs4680 and rs4818 haplotype association with treatment response to olanzapine in patients with schizophrenia. *Scientific reports*. 10(1), 1-11. doi: 10.1038/s41598-020-67351-5.
69. PROKOPOVÁ, I, 2010. Noradrenaline and behavior. *Československá fyziologie*. 59(2), 51-58. ISSN 2570-9178.
70. PŘÍHODOVÁ, Iva, 2011. Porucha pozornosti s hyperaktivitou (attention deficit/hyperactivity disorder – ADHD). *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 74/107(4), 408-418. ISSN 1802-4041.
71. QIAN, Q., LIU, J., WANG, Y., YANG, L., GAUN, L., FARAONE, S. V., 2009 Attention Deficit Hyperactivity Disorder comorbid oppositional defiant disorder and its predominately inattentive type: evidence for an association with COMT but not MAOA in a Chinese sample. *Behavioral and Brain Functions*. 5(8), 1-7. doi: 10.1186/1744-9081-5-8.
72. ROMMELSE, N., J., FRANKE, B., GEURTS, H., M., HARTMAN, C., BUITELAAR, J., K., 2010. Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *European child & adolescent psychiatry*. 19(3), 281-295. doi: 10.1007/s00787-010-0092-x.
73. ROUSSOS, P., GIAKOUMAKI, S., G., PAVLAKIS, S., BITSIOS, P., 2008. Planning, decision-making and the COMT rs4818 polymorphism in healthy

males. *Neuropsychologia*. 46(2), 757-763. doi:
10.1016/j.neuropsychologia.2007.10.009.

74. SAGUD, M., TUDOR, L., ERJAVEC, G., PERKOVIC, M., N., UZUN, S., MIMICA, N., MADZARAC, Z., ZIVKOVIC, M., KOZUMPLIK, O., KONJEVOD, M., STRAC, D., S., PIVAC, N., 2023 Genotypic and Haplotypic Association of Catechol-O-Methyltransferase rs4680 and rs4818 Gene Polymorphisms with Particular Clinical Symptoms in Schizophrenia. *Genes*. 14(7), 1-19. doi: 10.3390/genes14071358.
75. SAGVOLDEN, T., JOHANSEN, B., E., AASE, H., RUSSEL, V., A., 2005. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behavioral and Brain Sciences*, 28(3), 397-419. doi: 10.1017/S0140525X05000075.
76. SAVILL, N., C., BUITELAAR, J., K., ANAND, E., DAY, K., A., TREUER, T., UPADHYAZY, H., P., COGHILL, D., 2015. The efficacy of atomoxetine for the treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: a comprehensive review of over a decade of clinical research. *CNS drugs*. 29(2), 131-151. doi: 10.1007/s40263-014-0224-9.
77. SEEMAN, P. a KAPUR, S., 2000. Schizophrenia: More dopamine, more D2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(14), 7673-7675. doi: 10.1073/pnas.97.14.7673.
78. Sekvence genu COMT. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2024-12-2] Dostupné z : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?assm=GCF_000001405.40
79. SŁOMIŃSKI, A., T., ZMIJEWSKI, M, A., SKOBOWIAT, C., ZBYTEK, B., SŁOMIŃSKI, R., M., a STEKETEE, J., D., 2012. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin neuroendocrine system. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 212, 1-98. doi: 10.1007/978-3-642-19683-6_1.

80. SOKOLOVA, E., OERLEMANS, A., M., ROMMELSE, N., N., GROOT, P., HARTMAN, C., A., GLENNON, J., C., CLASSEN, T., HESKES, T., BUITELAAR, J., K., 2017. A causal and mediation analysis of the comorbidity between attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD). *Journal of autism and developmental disorders*. 47(6), 1595-1604. doi: 10.1007/s10803-017-3083-7.
81. STEIN, D., J., NEWMAN, T., K., SAVITZ, J., RAMESAR, R., 2006. Warriors versus worriers: the role of COMT gene variants. *CNS spectrums*. 11(10), 745-748. doi: 10.1017/s1092852900014863.
82. STOREBØ, O. J., RAMSTAD, E., KROG, H., B., NILAUSEN, T., D., SKOOG, M., HOLMSOV, M., ROSENDAL, S., GROTH, C., MAGNUSSEN, F., L., MOREIRA-MAIA, C., GILLIES, D., RASMUSSEN, K., B., GAUCI, D., ZWI, M., KIRUBAKARAN, R., FOSBOL, B., SIMONSEN, E., GLUUD, CH. 2015. Methylphenidate for children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, 1-693. doi: 10.1002/14651858.CD009885.pub2.
83. SUKHODOLSKY, D., BLOCH, M., H., PANZA, K., E., REICOW, B., 2013. Cognitive-behavioral therapy for anxiety in children with high-functioning autism: A meta-analysis. *Pediatrics*. 132(5), 1341-1350. doi: 10.1542/peds.2013-1193.
84. SUN, H., YUAN, F., SHEN, X., XIONG, G., WU, J., 2013. Role of COMT in ADHD: a systematic meta-analysis. *Molecular Neurobiology*. 49(1), 251-261. doi: 10.1007/s12035-013-8516-5.
85. TAHARA, T., SHIBATA, T., ARISAVA, T., NAKAMURA, M., YAMASHITA, H., YOSHIKA, D., OKUBO, M., MARUYAMA, N., KAMANO, T., KAMIYA, Y., FUJITA, H., NAGASAKA, M., IWATA, M., TAKAHAMA, K., WATANABE, M., HIRATA, I., 2009. Impact of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism on promoter methylation status in gastric mucosa. *Anticancer Research*. 29(7), 2857-2861. ISSN 1791-7530
86. TAHIR, E., CURRAN, S., YAZGAN, Y., OZBAY, F., CIRAKOGLU, B., ASHERSON, P., J., 2000. No association between low-and high-activity

- catecholamine-methyl-transferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *American journal of medical genetics*. 96(3), 285-288. doi: 10.1002/1096-8628(20000612)96:3<285::aid-ajmg10>3.0.co;2-d.
87. TENHUNEN, J., SALMINEN, M., LUNDSTRÖM, K., KIVILUOTO, T., SAVOLAINEN, R., ULMANEN, I., 1994. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *European Journal of Biochemistry*. 223(3), 1049-1059. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb19083.x.
88. THEINER, P., 2012. ADHD od dětství do dospělosti. *Psychiatrie pro praxi*. 13(4), 148-150. ISSN 1803-5272.
89. THOROVÁ, K., 2021. Časté dotazy: intervence, terapie, léčba [online] [cit.: 2024-5-4]. Dostupné z <https://autismport.cz/caste-dotazy/intervence-terapie-a-lecba>
90. UNAL, D., UNAL, M., F., ALIKASIFOGLU, M., CETINKAYA, A., 2016. Genetic variations in attention deficit hyperactivity disorder subtypes and treatment resistant cases. *Psychiatry Investigation*. 13(4), 427-433. doi: 10.4306/pi.2016.13.4.427.
91. VERKUIJL, N., PERKINS, M., FAZEL, M., 2015. Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder. *Bmj*. 350(h2168), 1-14. doi: 10.1136/bmj.h2168.
92. VIDGREN, J., SVENSSON, L., A., LILJAS, A., 1994. Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature*. 368(6469), 354-358. doi: 10.1038/368354a0.
93. WITTE, A. V., FLÖEL, A., 2012. Effects of COMT polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain research bulletin*. 88(5), 418-428. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.11.012.
94. YATSUGA, Ch., TOYOHISA, D., FUJISAWA, T., X., NISHITANI, S., SHINOHARA, K., MATSUURA, N., IKEDA, S., MURAMATSU, M., HAMADA, A., TOMODA, A., 2014. No association between catechol-O-methyltransferase (COMT) genotype and attention deficit hyperactivity disorder

(ADHD) in Japanese children. *Brain and Development*. 36(7), 620-625. doi: 10.1016/j.braindev.2013.08.006.

95. YOO, H., J., CHO, I., H., PARK, M., YANG, S., Y., KIM, S.,A., 2013 Association of the catechol-o-methyltransferase gene polymorphisms with Korean autism spectrum disorders. *Journal of Korean Medical Science*. 28(9), 1403-1406. doi: 10.3346/jkms.2013.28.9.1403.
96. ZIMMER, L., 2017. Contribution of clinical neuroimaging to the understanding of the pharmacology of methylphenidate. *Trends in pharmacological sciences*. 38(7), 608-620. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.001.
97. ŽAMCHOVÁ, Z., ČADILOVÁ, V., 2015. *Katalog podpůrných opatření dílčí část pro žáky s potřebou podpory ve vzdělávání z důvodu poruchy autistického spektra nebo vybraných psychických onemocnění* [online]. 2015. Univerzita Palackého v Olomouci [cit. 2023-10-26]. ISBN 978-80-244-4689-9. Dostupné z: <http://katalogpo.upol.cz/wp-content/uploads/katalog-pas.pdf>

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Syntéza dopaminu a jeho uvolnění do synaptické štěrbině.

Obrázek 2: Katabolismus katecholaminů.

Obrázek 3.: Funkce *COMT* enzymu.

Obrázek 4: Struktura lidského genu *COMT*.

Obrázek 5: Část sekvence genu *COMT* s vyznačenými polymorfismy rs4818 a rs4680.

Obrázek 6: Vliv funkčního jednonukleotidového polymorfismu *COMT* Val158Met.

Obrázek 7: Projevy jedinců s ADHD.

Obrázek 8.: Příklad vizualizace PCR produktu o velikosti 217bp pomocí gelové elektroforézy.

Obrázek 9 Příklad sekvence genu *COMT*. Výsledkem je v případě SNP rs4818 genotyp CC a v případě rs4680 genotyp Val/Met.

Obrázek 10: Příklad sekvence genu *COMT*. Výsledkem je v případě SNP rs4818 genotyp CG a v případě rs4680 genotyp Val/Met.

Obrázek 11: Příklad sekvence genu *COMT*. Výsledkem je v případě SNP rs4818 genotyp CC a v případě rs4680 genotyp Met/Met.

Obrázek 12: Porovnání frekvencí genotypů mezi pacienty s ADHD a kontrolní skupinou.

Obrázek 13: Srovnání frekvence alel Val a Met u pacientů s ADHD.

Obrázek 14: Porovnání frekvence alely Met ve skupině pacientů s ADHD (30 testovaných jedinců) a v kontrolní skupině (34 testovaných jedinců).

Obrázek 15: Porovnání frekvencí genotypů rs4818 mezi pacienty s ADHD (15 testovaných jedinců) a kontrolní skupinou (34 testovaných jedinců).

Obrázek 16: Porovnání frekvencí genotypů rs4860 mezi pacienty s ASD (testováno 45 jedinců) a kontrolní skupinou (testováno 34 jedinců).

Obrázek 17: Srovnání frekvence alel Val a Met u 45 testovaných pacientů s ASD.

Obr. 18: Porovnání frekvence alely Met ve skupině pacientů s ASD.

Obr. 19: Porovnání frekvencí genotypů pro rs4818 mezi pacienty s ASD.

Obrázek 20: Frekvenční zastoupení haplotypů ve skupině pacientů a v kontrolní skupině.

Obrázek 21.: Srovnání haplotypů podle zvyšující se hladiny dopaminu.

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Směs reakčního mixu pro PCR

Tabulka 2: Sekvence primeru pro PCR amplifikaci

Tabulka 3: PCR profil

Tabulka 4: Výsledné sekvence polymorfismu

Tabulka 5: Zastoupení genotypů SNP rs4680 u pacientů s diagnózou ADHD

Tabulka 6: Zastoupení genotypů SNP rs4680 v kontrolní skupině bez diagnózy ADHD

Tabulka 7: Zastoupení genotypů SNP rs4818 u pacientů s diagnózou ADHD

Tabulka 8: Zastoupení genotypů SNP rs4818 v kontrolní skupině bez diagnózy ADHD

Tabulka 9: Zastoupení genotypů SNP rs4680 u pacientů s diagnózou ASD

Tabulka 10: Zastoupení genotypů SNP rs4680 v kontrolní skupině

Tabulka 11: Zastoupení genotypů SNP rs4818 u pacientů s diagnózou ASD

Tabulka 12: Zastoupení genotypů SNP rs4818 v kontrolní skupině

Tabulka 13: Distribuce haplotypů pro rs4860 a rs4818 v genu *COMT* ve skupině pacientů a v kontrolní skupině.

11 Seznam zkratek

ADHD - porucha pozornosti s hyperaktivitou (Attention Deficit Hyperactivity Disorder)

ASD - poruchy autistického spektra (PAS), v anglické terminologii Autism Spectrum Disorders

bp – pár bází (base pair)

COMT - katechol-O-methyltransferázou

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

L-DOPA – L-dihydroxyfenilalanin

MAO - L-monoaminoxidázou

PAS – porucha autistického spektra

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

TBS – tris-buffered saline – pufr