

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Možná asociace polymorfismů v genu pro dopaminový
receptor D2 (*DRD2*) s lidským chováním**

Diplomová práce

Bc. Linda Jandová

Školitelka: Mgr. Dagmar Reigert Bystřická, Ph.D., GENLABS s.r.o.

České Budějovice 2019

Jandová, L., 2019: Možná asociace polymorfismů v genu pro dopaminový receptor D2 (*DRD2*) s lidským chováním. [Potential association of *DRD2* gene polymorphisms with human behaviour. Mgr. Thesis, in Czech.] – 67 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study is focused on the dopamine D2 receptor and the linkage between TaqIA and -141C Ins/Del polymorphisms in *DRD2* gene and novelty seeking behaviour, as well as the linkage between Val158Met polymorphism in *COMT* gene and novelty seeking behaviour. Novelty seeking behaviour is characterized as a personality trait with a tendency to look for novel stimulation and extravagances at any cost of legal, physical and social risk to reward cues. *DRD2* and *COMT* genes are associated with the function of dopamine, which is essential for motoric function and reward-motivated behaviour. Therefore, the aim of this study is to ascertain the potential linkage among the three studied polymorphisms and novelty seeking behaviour.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 17. 4. 2019

.....
Bc. Linda Jandová

Poděkování

Tímto způsobem bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za vedení mé práce, cenné rady, ochotu, vstřícnost a trpělivost a za příjemné pracovní prostředí v laboratoři GENLABS s.r.o. Mé díky rovněž patří doc. Ing. Alexandru Popkovi, Ph.D. za to, že mě přivedl k této zajímavé tématice a za podnětné diskuze. Děkuji také Mgr. Martině Polgar, která mi ochotně podala pomocnou ruku. Děkuji rovněž doc. Mgr. Janu Reigertovi, Ph.D. za poskytnutou pomoc při statistické analýze dat. Chtěla bych také vyjádřit poděkování všem dobrovolníkům, kteří se ochotně zapojili do této studie. Největší poděkování náleží mojí rodině, která mi poskytla výborné zázemí pro studium, a vždy mě podporovala.

Obsah

1. Úvod	1
2. Dopamin (DA)	2
2.1 Syntéza a degradace dopaminu	2
2.2 Dopaminergní dráhy.....	5
2.3 Dopaminové receptory	6
2.3.1 D1 receptor.....	8
2.3.2 D2 receptor.....	8
2.3.3 D3 receptor.....	10
2.3.4 D4 receptor.....	10
2.3.5 D5 receptor.....	11
2.4 Jednonukleotidové polymorfismy v genu <i>DRD2</i>	11
2.4.1 TaqIA polymorfismus	11
2.4.2 -141C Ins/Del polymorfismus.....	13
2.5 Jednonukleotidový polymorfismus v genu <i>COMT</i>	14
2.5.1 Katechol-O-metyl transferáza (COMT).....	14
2.5.2 Val158Met polymorfismus	15
3. Neurologická onemocnění spojená s dopaminergním systémem	17
3.1 Alzheimerova choroba	17
3.2 Parkinsonova choroba	17
3.3 Schizofrenie.....	18
4. Novelty seeking behaviour	19
5. Faktory koreluující s lidským chováním	21
6. Cíle diplomové práce	23
7. Metody	24
7.1 Nábor dobrovolníků	24
7.2 Psychologický dotazník TCI-R	24
7.3 Odběr biologického materiálu	25
7.3.1 Informovaný souhlas	25
7.3.2 Schválení výzkumu etickou komisí.....	25
7.4 Izolace DNA.....	26
7.4.1 Izolace DNA pomocí izolačního kitu Isohelix DNA (DDK-3/DDK-50)	26

7.4.2	Izolace DNA pomocí izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini (SK168_GL_001_D).....	27
7.5	Fluorometrie	28
7.6	Genetická analýza.....	29
7.6.1	Analýza polymorfismu TaqIA pomocí PCR-RFLP	29
7.6.2	Analýza polymorfismu – 141C Ins/Del pomocí PCR-RFLP.....	31
7.6.3	Analýza polymorfismu Val158Met pomocí PCR-RFLP	33
7.6.4	Gelová elektroforéza	36
7.7	Analýza dat.....	37
8.	Výsledky	39
8.1	Interpretace novelty seeking.....	39
8.2	Společný výskyt typických genotypových kombinací	39
8.3	Stanovení indikativního faktoru	40
8.4	Porovnání skóre novelty seeking u sportovců a kontrolní skupiny.....	41
8.5	Korelace polymorfismu TaqIA s novelty seeking.....	42
8.6	Korelace polymorfismu –141C Ins/Del s novelty seeking.....	43
8.7	Korelace polymorfismu Val158Met s novelty seeking.....	44
8.8	Vliv pohlaví na novelty seeking.....	45
8.9	Výskyt mutovaných alel u polymorfismů TaqIA, Val158Met, -141C Ins/Del u jednotlivých skupin.....	46
9.	Diskuze	47
10.	Závěr	51
11.	Seznam použité literatury	52
	Příloha 1	66

Teoretická část

1. Úvod

Dopamin funguje v mozku jako neurotransmitter, který společně s dalšími hormony reguluje fyziologické a behaviorální funkce (Oswald a kol., 2015). Jedná se o látku zodpovědnou za motorické funkce, kognitivní funkce – zpracovávání informací, vytvoření úsudku, vznik dlouhodobé paměti – a rovněž má hlavní roli v tvorbě motivačního systému a touze po odměně (Zuckerman, 1979). Degenerace dopaminergního systému souvisí s různými závažnými neurologickými onemocněními (schizofrenie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc) a změnami chování (Schartzberg a Nemeroff, 2004; Trudell a Izenwasser, 2008).

Dědičná tendence směřující k časté průzkumné činnosti a intenzivnímu vzrušení v reakci na nové podněty se označuje jako chování typu novelty seeking (NS). Novelty seeking je zařazeno v inventáři povahových vlastností, tzv. Temperament and Character Inventory-Revised (TCI-R), a skládá se ze čtyř podskupin (průzkumné vrušení, impulzivnost, extravagance, neuspořádanost). Dotazník TCI-R je globálně používaný a uznávaný v psychologickém a neurobiologickém výzkumu. Jedinci, kteří mají vysoké skóre novelty seeking, jsou temeperamentní, průzkumní, zvědaví, impulzivní, roztržití a snadno podlehnou nudě. Rychle se zapojí do čehokoli, co je nové a neznámé – což může vést k potenciální odměně – ať už jsou to adrenalinové sporty či návykové látky. Vysoké skóre NS je spojováno s nedostatečnou aktivitou dopaminu (Cloninger, 1986).

Gen *DRD2*, kódující dopaminový receptor D2, je intenzivně studován v souvislosti s několika polymorfismy. Mezi ně se řadí i jednonukleotidové polymorfismy TaqIA a –141C Ins/Del. Polymorfismus TaqIA, respektive jeho recesivní alela A1, koreluje s o 30 % menší počtem exprimovaných D2 receptorů (Noble a kol., 1997); alela –141C Del polymorfismu -141C Ins/Del je spojována se sníženou expresí genu *DRD2* (Arinami a kol., 1997). Funkci dopaminu ovlivňuje i gen *COMT* (katechol-O-metyltransferáza) kódující stejnojmenný enzym. Jednonukleotidový polymorfismus Val158Met v genu pro enzym COMT, který zodpovídá za degradaci dopaminu, snižuje funkci tohoto enzymu až o 40 %, dopamin se tedy odbourává pomaleji, než by měl (Chen a kol., 2004).

Jelikož polymorfismy obou genů ovlivňují funkci dopaminu a/nebo expresi příslušných receptorů, korelují tak i s lidským chováním, a z tohoto důvodu je zkoumán vztah mezi noveltu seeking behavior a dopaminergním systémem.

2. Dopamin (DA)

Dopamin je látka fungující v mozku jako neurotransmiter, jež reguluje více fyziologických funkcí. Zodpovídá především za emoční a motivační chování – tak zvaný systém „potěšení a odměny“. Má významnou úlohu u motorických funkcí, u kognitivních funkcí, a to zejména ve zpracování informací, vytváření úsudku, tvorbě dlouhodobé paměti a přeměny abstraktní myšlenky v její vědomé vykonání. Neurosekrece dopaminu je podmíněna více faktory, mimo jiné i světelnou periodou, z čehož vyplývá, že dopamin rovněž přispívá k řízení biorytmů v organismu (Jones a kol., 1998; Greengrad, 2001; Torres, 2006; Gowrishankar a kol., 2014; Money a Stanwood, 2013).

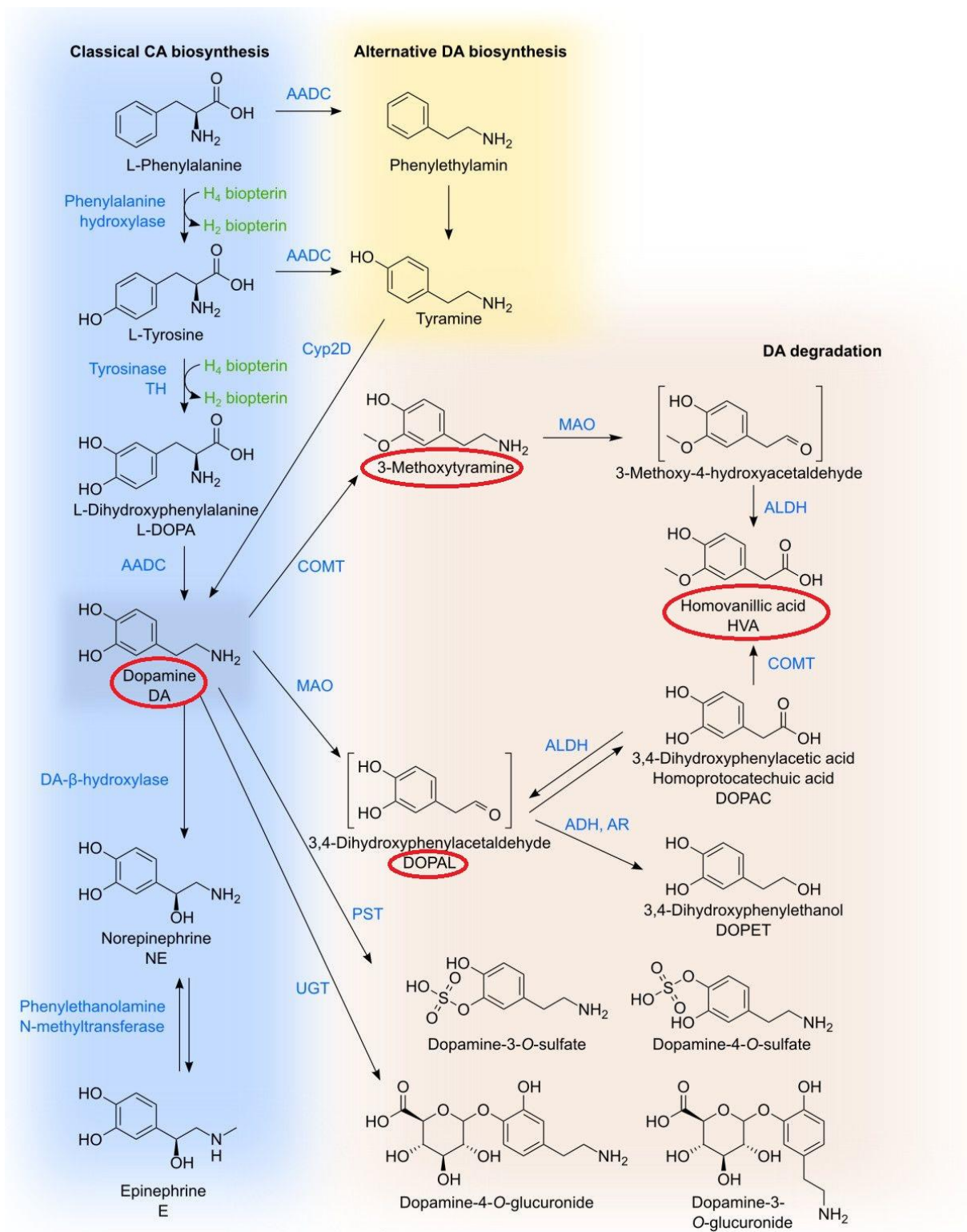
2.1 Syntéza a degradace dopaminu

Z chemického hlediska patří dopamin do skupiny látek zvaných katecholaminy, a tak podléhá specifické syntéze a degradaci (Obr. 1). Syntéza dopaminu začíná z aminokyseliny L-tyrosinu, která je transportována přes hematoencefalitickou bariéru do dopaminergních neuronů ve středním mozku. Působením enzymu tyrosin hydroxyláza (TH) je fenolový kruh L-tyrosinu hydroxylován a přeměněn na L-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), a poté působením DOPA dekarboxylázy vzniká dopamin. Na rozdíl od mnoha neurotransmiterů, které jsou ke vzdáleným místům působení transportovány axonem, dopamin je uvolňován nejen axonem, ale i somatodendriticky. Zodpovídá za to enzym TH, který je exprimován v tělech, axonech i dendritech dopaminergních neuronů (Witovski a kol, 2009; Meiser a kol., 2013).

Pro ukončení působení účinku je dopamin absorbován zpět do neuronů. Ve vezikulech dopaminergních neuronů je recyklován a připraven na další působení nebo se hromadí v cytosolu neuronů, kde je degradován monoaminoxidázou (MAO) a katechol-O-metyltransferázou (COMT). Dopamin, hromadící se v cytosolu neuronů, je působením MAO oxidační deaminací degradován, a tím vzniká peroxid vodíku a 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd (DOPAL). DOPAL je následně oxidován enzymem aldehyd dehydrogenáza (ALDH) na kyselinu 3,4-dihydrofenyloctovou (DOPAC). V některých

případech může být DOPAL redukován na 3,4-dihydroxyfenyletanol (DOPET). Účinkem COMT dochází k metylaci hydroxylové skupiny na benzenovém jádru, a vzniká kyselina homovanilová (HVA), hlavní degradační produkt dopaminu (Meiser a kol., 2013).

Dopamin může být ze synaptické štěrbině transportován i do obklopujících gliových buněk, kde je jeho degradace zahájena metylací přes COMT za vzniku 3-metoxytyraminu (3-MT). Následující kroky degradace řídí MAO, stejnými typy reakcí jako při degradaci v dopaminergních neuronech (Schatzberg a Nemeroff, 2004).



Obrázek 1: Syntéza a degradace dopaminu. Červeně zvýrazněny hlavní produkty metabolických drah (převzato z Meiser a kol., 2013).

2.2 Dopaminergní dráhy

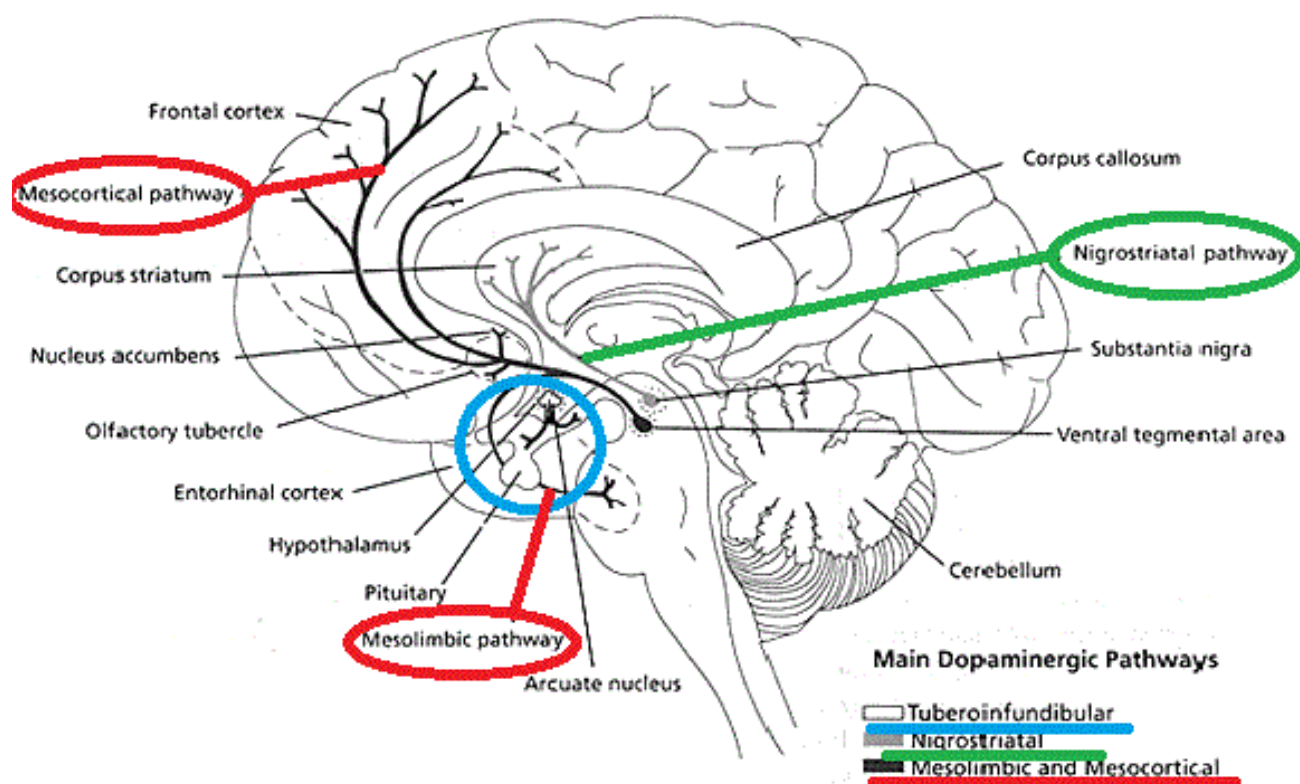
V mozku existuje více dopaminergních drah, zde jsou uvedeny čtyři hlavní, a to nigrostriatální, tuberoinfundibulární, mezolimbická a mezokortikální (Obr. 2).

Dopamin v CNS vzniká ve středním mozku, v oblasti *substantia nigra* (SNc) a ve ventrální tegmentální oblasti (VTA). Jedná se o struktury, které jsou součástí bazálních ganglií. U *substantia nigra* je důležitý oddíl *pars compacta* sloužící jako vstup do bazálních ganglií, skrz které dopamin putuje do dorsálního striata, *corpus striatum*, centra pro ovládání pohybů. Jedná se o tzv. nigrostriatální dopaminovou cestu. Poškozením nigrostriatální dráhy vznikají neurodegenerativní onemocnění jako je Parkinsonova choroba a chorea; nigrostriatální dráha bývá postižena i u drogově závislých (Ludwig a kol, 2016; Money a Stanwood, 2016; Ikemoto, 2010; Malenka a kol., 2009).

VTA dopaminergní neurony vedou přes dvě dopaminové dráhy do center zodpovědných za kognitivní schopnosti, motivaci, systém „potěšení a odměny“. Mezolimbická dráha vede k ventrálnímu striatu, *nucleus accumbens* (NAc); mezokortikální cesta směřuje k prefrontální kůře, hipokampu a amygdale. Poškození těchto drah může vést k schizofrenii, ADHD a závislostem (Ludwig a kol, 2016; Money a Stanwood, 2016; Ikemoto, 2010; Malenka a kol., 2009).

Tuberoinfundibulární dráha probíhá v hypotalamu, z oblasti *arcuate nucleus* do hypofýzy. Uvolňovaný dopamin se dostává do krevního oběhu přes hypofýzový portální systém. Prostřednictvím této dráhy je regulována sekrece prolaktinu z hypofýzy, dopamin zde působí inhibičně. Poruchou tuberoinfundibulární dráhy dochází k v zvýšení hladiny prolaktinu v krvi, hyperprolaktinémii (Malenka a kol., 2009).

Hyperprolaktinémie se projevuje u obou pohlaví, častěji však u žen. Hlavní dopad má na reprodukční systém, kdy u žen dochází k poruchám v menstruačním cyklu, k tvorbě mléka i mimo těhotenství/kojení (galaktorea), dysplazii prsu s rizikem vzniku rakoviny a u mužů k poruchám erekce, bolestivé ejakulaci a impotenci. U obou pohlaví je navíc zvýšené riziko vzniku osteoporózy a poruchy chování (rozvoj úzkosti, depresí, psychóz, ztráta paměti) (Kinon a kol., 2003b).



Obrázek 2: Dopaminergní dráhy v mozku (převzato z Ferrazzoli a kol., 2016).

2.3 Dopaminové receptory

Existuje 5 typů dopaminových receptorů, které jsou označeny D1 až D5 (Obr. 3). Dopaminové receptory, exprimované s různou hustotou v různých oblastech mozku, jsou dále rozděleny do dvou skupin: D1-like receptory a D2-like receptory (Neve a Neve, 1997).

Všechny typy zmíněných receptorů patří mezi tzv. receptory spřažené s G proteiny, jejichž signalizace je zprostředkována interakcí a aktivací heterotrimerických GTP vazebných proteinů (Neve a Neve, 1997).

Do skupiny D1-like receptorů patří D1 a D5 receptory; receptory D2, D3 a D4 se řadí do skupiny D2-like receptorů (Neve a Neve, 1997). K tomuto rozdělení přispěla schopnost dopaminu modulovat aktivitu adenylátcyklázy, kdy D1-like receptory jsou pozitivně spojeny s modulací adenylátcyklázy, tedy enzymem, jenž katalyzuje syntézu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který reguluje množství biochemických procesů, včetně tvoření paměti (Spano a kol., 1978).

Receptory obou skupin jsou vysoce homologní v jejich transmembránových doménách, avšak mají odlišné farmakologické vlastnosti. Receptory D1 a D5 (D1-like receptory) aktivují $G\alpha_{s/olf}$ rodinu G proteinů, čímž dochází k stimulaci produkce cAMP. Tyto receptory se také nachází výhradně na postsynaptické membráně dopaminergních neuronů, jako jsou GABA-ergní MSNs (*medium spiny neurons*) ve *striatu*. Receptory D2, D3 a D4 přes $G\alpha_{i/o}$ rodinu G proteinů naopak inhibují adenylátcyklázu a tím i cAMP. Receptory D2 a D3 jsou exprimovány postsynapticky i presynapticky (Sokoloff a kol., 2006; Rankin a kol., 2010; Rondou a kol., 2010).

D1-like receptory a D2-like receptory se odlišují i v genové struktuře. Geny pro receptory D1 a D5 neobsahují introny, zatímco u genů pro zbylé typy receptorů se jich nachází několik – šest v genu pro D2 receptor, 5 v genu pro D3 receptor a tři v genu pro D4 receptor (Gingrich a Caron, 1993).

Dopamine Receptor Subtype	D1	D2	D3	D4	D5
Gene symbol	<i>DRD1</i>	<i>DRD2</i>	<i>DRD3</i>	<i>DRD4</i>	<i>DRD5</i>
Chromosomal gene map locus	5q35.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5	4p16.1
Number of introns in the coding region	None	6	5	3	None
Pseudogenes	None	None	None	None	<i>DRD5P1, DRD5P2</i>
Presence of splice variants	None	Yes D2S, D2L	Yes	Yes	None
Number of amino acids	446	D2S, 414; D2L, 443	400	387	477
Molecular weight	49,300	D2S, 47,347; D2L, 50,619	44,225	41,487	52,951
G protein coupling	$G\alpha_s, G\alpha_{olf}$	$G\alpha_i, G\alpha_o$	$G\alpha_i, G\alpha_o$	$G\alpha_i, G\alpha_o$	$G\alpha_s, G\alpha_q$
Selective agonists	Fenoldopam, SKF-38393, SKF-81297	Bromocriptine, pergolide, cabergoline, ropinirole	7-OH-DPAT, pramipexole, rotigotine, (+)-PD-128907	A-412997, ABT-670, PD-168,077	None
Selective antagonists	SCH-23390, SCH-39166, SKF-83566	Haloperidol, spiperone, raclopride, sulpiride, risperidone	Nafadotride, GR 103,691, GR 218,231, SB-277011A	A-381393, FAUC 213, L-745,870, L-750,667	None

Obrázek 3: Dopaminové receptory (převzato z Beaulieu a Gainetdinov, 2011).

2.3.1 D1 receptor

Gen pro dopaminový receptor D1 (*DRD1*), lokalizován na 5. chromozomu v pozici 5q35.1, obsahuje 2 exony a 1 intron. Jak se již uvedeno výše, původně byl gen *DRD1* považován za prostý intronů. Později byl pomocí S1 nuclease mapování a RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) ovšem detekován sekvenčně krátký intron o velikosti 116 bp. *DRD1* má celkem dva promotory. Jeden se nachází upstream od exonu 1 a druhý je mezi oběma exony. Alternativním splicingem mohou vznikat dvě formy. Kratší transkript D1 je stabilnější než transkript obsahující exon 1, který je poměrně rychle degradován. Oba transkripty vznikají v nervových buňkách, ovšem kratší transkript, generován promotorem mezi dvěma exony, vzniká i v ledvinách (Neve, 2010).

2.3.2 D2 receptor

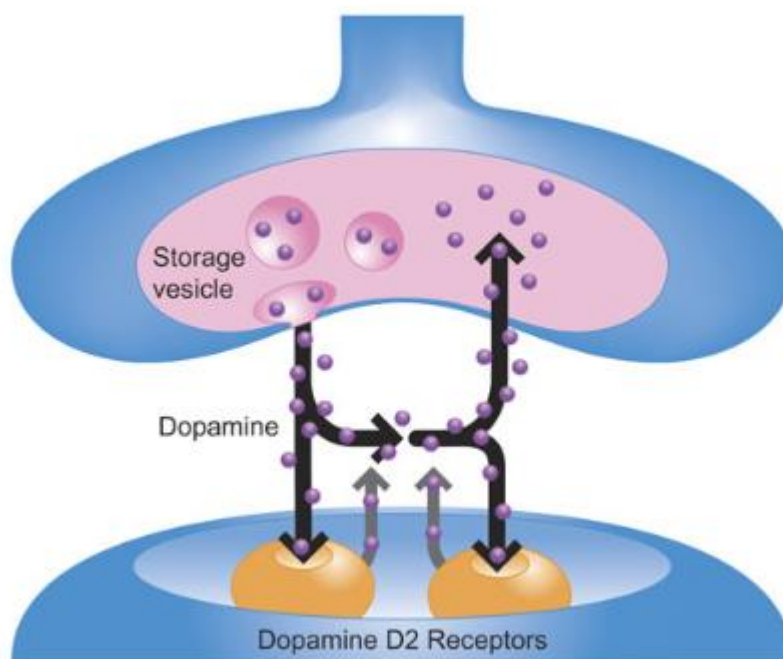
Gen pro D2 receptor (*DRD2*) se nachází na 11. chromozomu v oblasti 11q22 – 23. (Grandy a kol., 1989). Genetická struktura D2 receptoru je organizována do 7 exonů a 6 intronů, a umožňuje vznik několika splicingových variant. Příkladem může být splicing exonu 6 o délce 87 bází mezi introny 4 a 5, který vede k tvorbě dvou hlavních variant D2 receptoru. Tyto izoformy se označují D2S (D2-short) a D2L (D2-long); D2L má o 29 aminokyselin více v třetí intracelulární smyčce, pravděpodobně kvůli tomu varianta D2L aktivuje jinou signální dráhu. Forma D2S bývá exprimována převážně presynapticky a podílí se hlavně na autoreceptorových funkcích, oproti tomu je D2L převážně postsynaptická varianta D2 receptoru, jedná se především o heteroreceptor, ovšem předpokládá se i jeho autoreceptorová funkce (Giros a kol., 1989; Neve a kol., 2013; Jang a kol., 2011; Monsma a kol., 1989; Usiello a kol., 2000; De Mei a kol., 2009).

D2S forma bývá exprimována převážně presynapticky ve středním mozku ve ventrální tegmentální oblasti (VTA) a oblasti *substantia nigra* (SNc), a v hypotalamu, tedy v oblastech vzniku dopaminu, kde má funkci autoreceptorů s vyšší afinitou pro dopamin a silnějším inhibičním účinkem na adenylátcyklázu (Castro a Strange, 1993; Malmberg a kol., 1993; Montmayeur a Borrelli, 1991; Khan a kol., 1998; Schatzberg a Nemeroff, 2004; Grandy a kol., 1989; Missale a kol., 1998). Oproti tomu pro D2L formu je nejvyšší exprese postsynaptická ve striatu a mozkové kůře (Schatzberg a Nemeroff, 2004).

Obecně nejvyšší výskyt D2 receptorů je popisován v bazálních gangliích koncového mozku, v oblastech *nucleus accumbens*, *striatum*, *substantia nigra*, ventrální tegmentální

oblasti, hypotalamu, septu, amygdale a hipokampu, tedy oblastech pro motorické funkce a motivaci (Seeman, 2006).

Jelikož mají D2 receptory inhibiční funkci, spočívá jejich nejzásadnější význam v regulaci uvolňování dopaminu z vezikulů, snižování jeho syntézy a také v regulaci re-absorpce dopaminu (Obr. 4) (Phillips a kol., 2002; Wolf a Roth, 1990; Truong a kol., 2004).



Obrázek 4: Jednoduché schéma uvolnění, příjmu a recyklace dopaminu (převzato z Dawes a Fowler, 2009).

Po uvolnění dopamin působí na D2 autoreceptory, a tím se snižuje pravděpodobnost jeho dalšího uvolňování. Délka této inhibice se pohybuje od několika milisekund až po několik sekund. Mechanismus zabraňující uvolňování dopaminu spočívá v inhibici napětím řízených vápenatých kanálů přes podjednotku $\beta\gamma$ spřaženého G-proteinu. Autoreceptory mohou ovšem inhibovat uvolňování dopaminu i nezávisle na vápenatých iontech, a sice hyperpolarizací draselných kanálů. Jedná se o tzv. přímou modulaci aktivity dopaminu, zatímco u re-absorpce a snižování syntézy DA mluvíme o tzv. nepřímé modulaci aktivity dopaminu (Herlitze a kol., 1996; Fulton a kol., 2011; Ford, 2014).

Re-absorpce dopaminu ze synaptické štěrbině je zprostředkována přes dopaminový transportér (DAT). Jedná se o membránový protein, který transportem DA do cytosolu

ukončuje působení tohoto neurotransmiteru. Pro správný průběh je nutná sekvenční vazba a ko-transport dvou sodíkových iontů a jednoho chloridového iontu. Ionty sodíku musí být vázány na extracelulární doménu DAT, poté dochází k navázání dopaminu. Výsledkem je konformační změna DAT, která umožňuje přechod a uvolnění sodíku a dopaminu na vnitřní straně membrány. Hnací silou pro tento přenos je koncentrační gradient iontů generovaný sodno-draselnou pumpou. (Torres a kol., 2003; Sonders a kol., 1997)

D2 receptory rovněž snižují syntézu dopaminu inhibicí tyrosin hydroxylázy (TH), čím se prodlužuje doba jednotlivých pulzů vyplavování dopaminu. Dochází k tomu snížením cAMP-PKA zprostředkované fosforylace v regulační doméně TH, což vede k nižšímu hromadění dopaminu v presynaptických vezikulech současně se změnou exprese a distribuce vezikulárního monoaminového transportéru (VMAT) (Anzalone a kol., 2012; Truong a kol., 2004).

2.3.3 D3 receptor

Gen pro dopaminový receptor D3 (*DRD3*), obsahující 6 exonů a 5 intronů, je lokalizován na 3. chromozomu v oblasti 3q13.3 a je ze 75 % homologní s genem *DRD2*. Receptory D3 jsou lokalizovány především v limbickém systému. Alternativním splicingem genu *DRD3* mohou vznikat dvě kratší izoformy. Přestože jejich funkce není plně objasněná, předpokládá se, že úloha spočívá v kontrole počtu aktivních D3 receptorů. Chyby v alternativním splicingu mohou vést k vytvoření nefunkčních D3 receptorů, a tedy k rozvoji psychiatrických poruch (Neve, 2010; Schatzberg a Nemereoff, 2004).

2.3.4 D4 receptor

Gen pro dopaminový receptor D4 (*DRD4*) je tvořen 4 exony a 3 introny. Nachází se na 11. chromozomu v pozici 11p15.5. Receptory D4 se nejhojněji vyskytují v hypotalamu, frontální kůře, hippocampu a amygdale. U genu *DRD4* byl zjištěn výskyt značného množství jendonukletidových polymorfismů, z nichž některé se v poslední době studují v souvislosti s noveltou seeking a poruchou pozornosti spojenou s hyperaktivitou (ADHD) (Neve, 2010; Schatzberg a Nemereoff, 2004).

2.3.5 D5 receptor

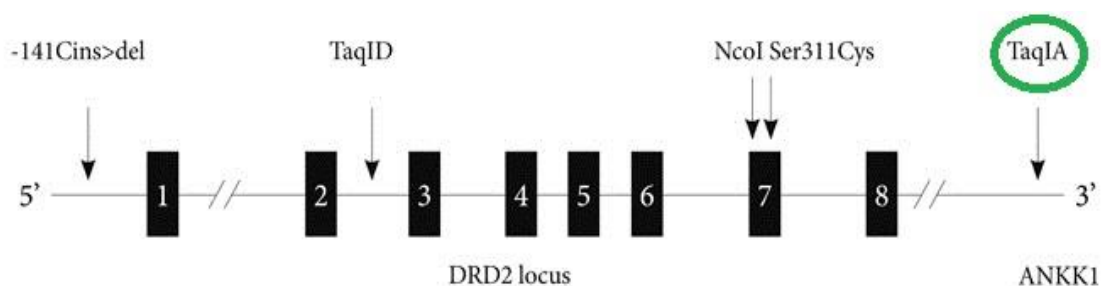
Gen pro dopaminový receptor D5 (*DRD5*) se nalézá na chromozomu 4 v oblasti 4p16.1. Obdobně jako u genu *DRD1* se i tento gen považoval za prostý intronů, skládá se však z 2 exonů, mezi kterými je malý intron. Obecně geny všech dopaminových receptorů nemají v oblasti 5' UTR CCAAT a TATA boxy, ale regulační oblast u genu *DRD5* není ani GC bohatá (Neve, 2010). Receptory D5 vykazují obecně vyšší afinitu pro dopamin (Grandy a kol., 1991).

2.4 Jednonukleotidové polymorfismy v genu *DRD2*

Jednonukleotidové polymorfismy -141C Ins/Del a TaqIA patří mezi nejčastěji studované polymorfismy genu *DRD2*, které se dávají do souvislostí s různými formami lidského chování. Z tohoto důvodu byly vybrány i pro tuto studii.

2.4.1 TaqIA polymorfismus

Jednonukleotidový polymorfismus TaqIA je součástí genu *ANKK1* (Ankyrin repeat and kinase domain containing I), který je lokalizován 10 kb downstream od genu *DRD2* (Obr. 5). Gen *ANKK1* se podílí na signální transdukcii a buněčné odpovědi na vnější stimuly a pravděpodobně má důležitou roli v expresi genu *DRD2* (Neville a kol., 2004).

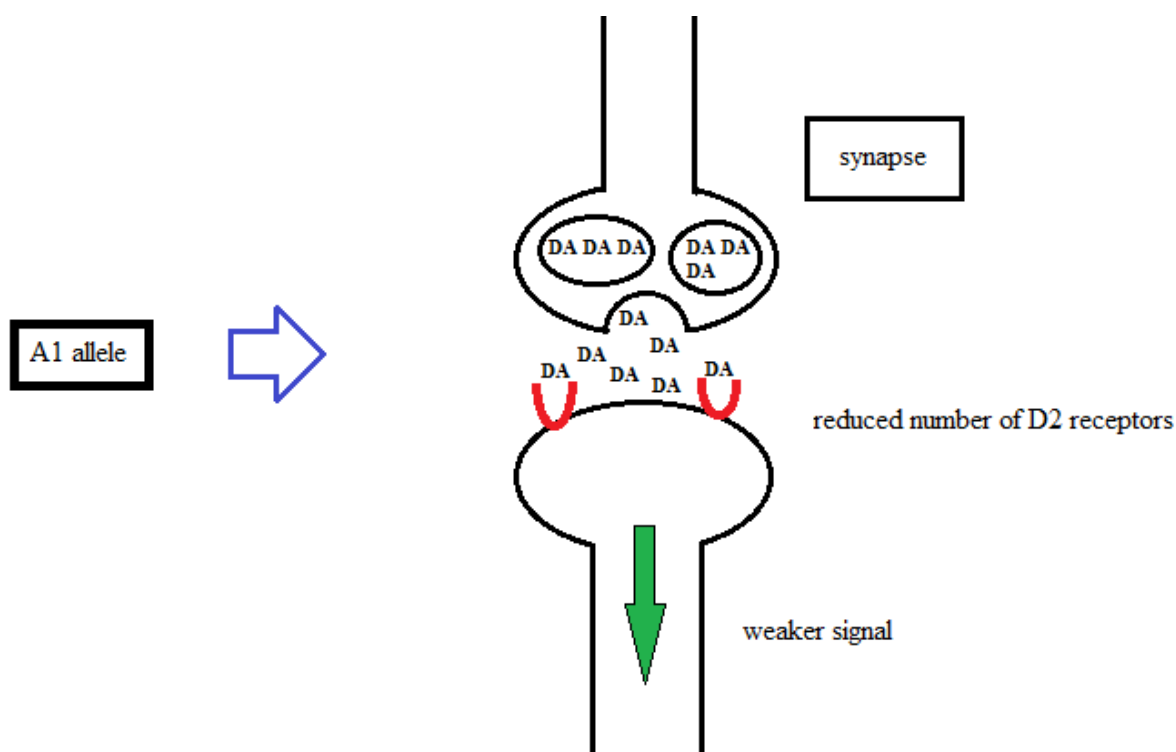


Obrázek 5: Gen *DRD2/ANKK1* s vyznačeným TaqIA polymorfismem (převzato z Park a kol., 2011).

V případě polymorfismu TaqIA (rs1800497) se jedná o substituční tranzici, kde mutace (C>T) přemění kyselinu glutamovou na lyzin v pozici 713 (Glu713Lys) v 11. opakování ankyrinu, proteinu kódovaného genem *ANKK1*. Polymorfismus TaqIA je pak reprezentován dvěma alelami, recesivní alelou A1 (Lys713) a dominantní alelou A2

(Glu713). Meta analýza z roku 2016 prokázala, že polymorfismus TaqIA má významný vliv na dostupnost D2 receptorů. Vazebný receptorový potenciál je prokazatelně nižší v přítomnosti A1 alely (Gluskin a Mickey, 2016). Výskyt A1 alely (heterozygoti a homozygoti pro alelickou variantu TaqIA1) souvisí s přibližně o 30 % menším počtem D2 receptorů (Obr. 6) (Noble a kol., 1997). Výskyt alely A1 je spojován s problémy se závislostí, vznikem depresí a úzkostí; psychiatrické poruchy a závislosti korelují s nižším vazebným potenciálem D2 receptoru. (Savitz a kol., 2013).

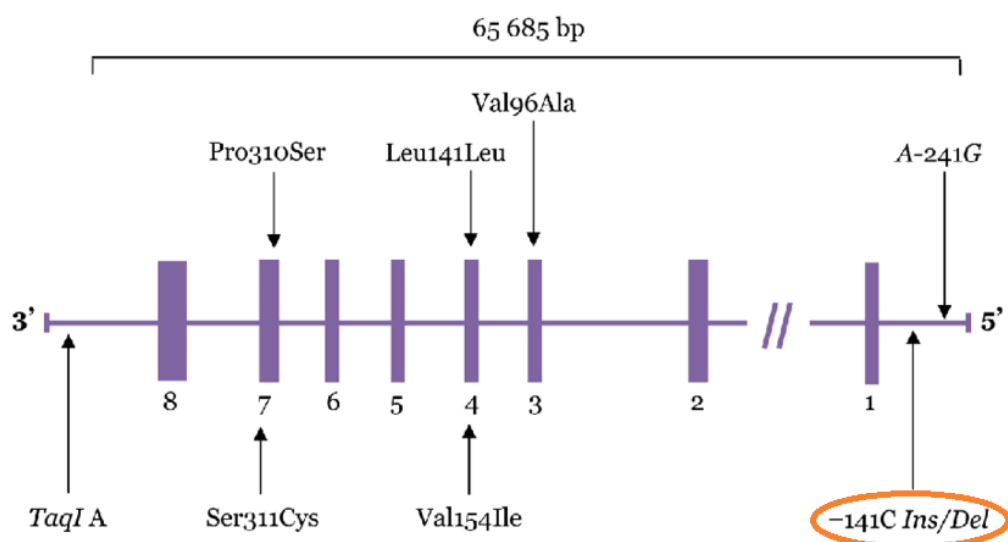
Hypotézám o změně chování může odpovídat i vysoký vazebný potenciál D2 autoreceptorů dopaminu ve středním mozku, který koreluje s nízkým skóre novelty seeking (NS), zatímco vysoké skóre NS je naopak spojováno se sníženou možností vzniku vazby dopamin-receptor; spojitost mezi NS a obsazeností receptorů byla rovněž potvrzena pomocí vyšetření pozitronové emisní tomografie (PET) (Huang a kol., 2010; Linnet a kol., 2011; Zald a kol., 2008).



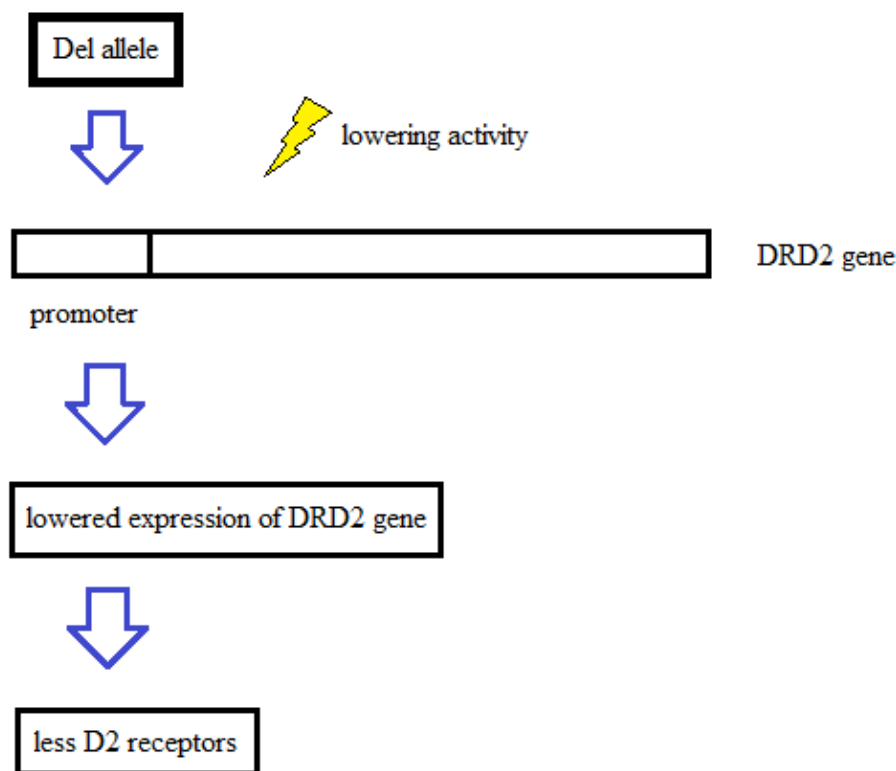
Obrázek 6: Alela A1 snižuje počet D2 receptorů (axon – presynaptická část – obsahuje vezikuly s dopaminem (DA). Neuromediátor je vychytáván dendrity – postsynaptická část – pomocí *červeně* znázorněných D2 receptorů. V důsledku jejich nižšího počtu, a tedy snížené možnosti navázání dopaminu (DA) je výsledný výchozí signál značně zeslabený).

2.4.2 -141C Ins/Del polymorfismus

V oblasti promotoru genu *DRD2* se nachází jednonukleotidový polymorfismus označovaný -141C Ins/Del. V pozici -141 dochází k inserci/deleci cytosinu (rs1799732) (Obr. 7). Delece cytosinu (-141C Del) má za následek snížení aktivity promotoru, a tím snížení exprese genu *DRD2*. Důsledkem je nižší počet exprimovaných D2 receptorů, a tak i nižší možnost navázání dopaminu po jeho uvolnění (Obr. 8). Z tohoto důvodu je alela -141C Del rovněž zkoumána ve spojitosti s novoty seeking. Alela -141C Del je v populaci obecně vzácná. S nižší frekvencí se vyskytuje u schizofreniků, což bylo prokázáno v asijské a švédské populaci (Arinami a kol, 1997; Jönsson a kol., 1999).



Obrázek 7: Gen *DRD2* s vyznačeným -141C Ins/Del polymorfismem (převzato z Zahari a kol., 2011).



Obrázek 8: Schéma vlivu alely – 141C Del vedoucí k nižšímu počtu exprimovaných D2 receptorů.

2.5 Jednonukleotidový polymorfismus v genu *COMT*

V genu *COMT* je z hlediska vztahu k lidskému chování významný jednonukleotidový polymorfismus Val158Met. Jelikož se podílí na modulaci dopaminu, byl rovněž zahrnut do této studie.

2.5.1 Katechol-O-metyl transferáza (COMT)

Funkce enzymu katechol-O-metyl transferáza, jenž je kódován stejnojmenným genem lokalizovaném na 22. chromozomu v oblasti 22q11, spočívá v degradaci katecholaminů, mezi které se řadí i dopamin (Lachman a kol., 1996).

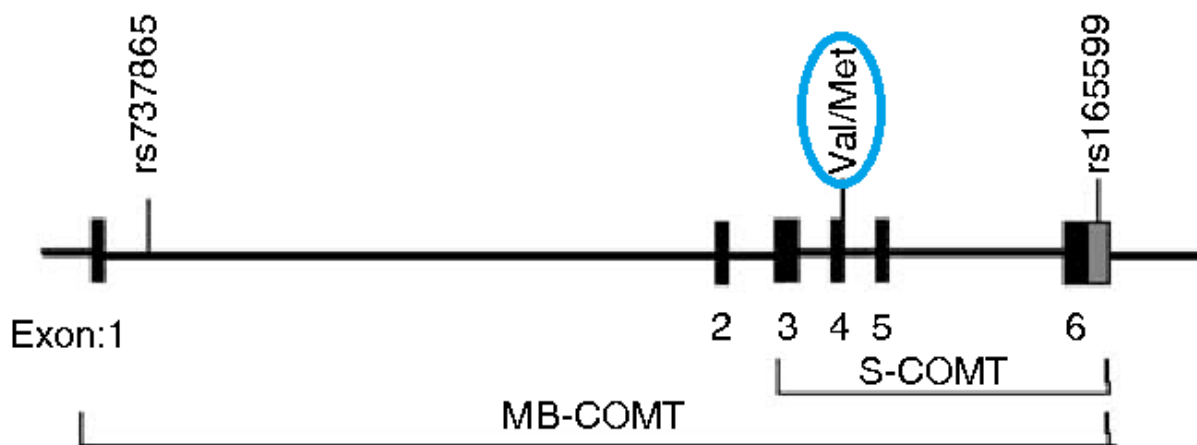
Enzym má dvě hlavní izoformy. Rozpustná cytoplasmatická izoforma S-COMT dominuje ve většině tkání kromě mozku, kde převládá na membránu se vázající izoforma MB-COMT. Obecně je dopamin vychytáván dopaminovým transportérem (DAT) a degradován monoaminoxidázou (MAO), ovšem v prefrontální kůře je exprese DAT nižší,

a tím pádem vlastní význam COMT vyšší (Jeffery a Roth, 1984; Tenhunen a kol., 1994; Huotari a kol., 2002; Tunbridge a kol., 2004).

2.5.2 Val158Met polymorfismus

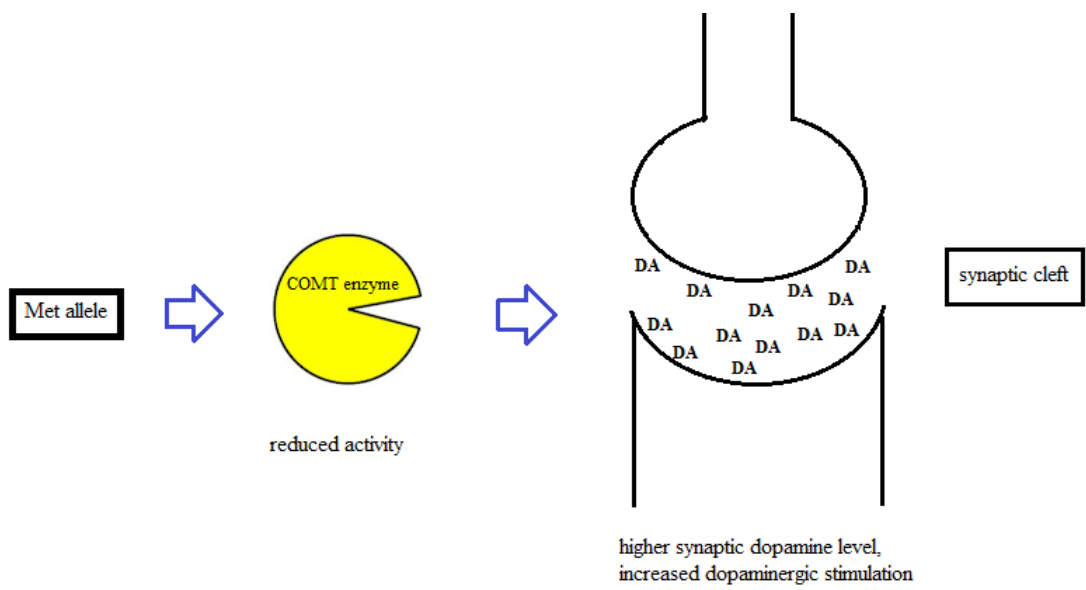
V genu COMT se může vyskytovat jednonukleotidová substituce, kdy je místo guaninu zařazen adenin. Důsledkem této substituce je přeměna valinu na methionin v pozici 158 (rs4680) (Schacht, 2016). Mluvíme o polymorfismu Val158Met (Obr. 9). Dominantní alela Val kóduje protein, který je termostabilnější, a zároveň má o 40% vyšší aktivitu než mutovaná alela Met. Důsledkem snížené aktivity u mutované alely tedy dochází k degradaci dopaminu pomaleji. Alela Met je tak spojována s vyšší hladinou dopaminu v synaptické štěrbině v prefrontální kůře (Obr. 10) (Chen a kol., 2004). To vede k poklesu dopaminergní neurotransmise v *nucleus accumbens*, a tím pádem i ke snížené potřebě ji stimulovat. Alela Met je tak spojována také s novelty seeking, jelikož delší působení dopaminu v synaptické štěrbině může mít za následek, že jedinci nesoucí alelu Met více vyhledávají riziko, zatímco jedinci s genotypem Val/Val mají tendenci být opatrnější a potenciální rizika nevyhledávají (Farrell a kol., 2012; Hosák a kol., 2006).

PET analýza prokázala pozitivní korelaci mezi nadměrnou aktivací D2 receptorů,



způsobenou vyšší hladinou dopaminu, a schizofrenií (Jones a Pilowski, 2002).

Obrázek 9: Gen COMT s vyznačeným Val158Met polymorfismem (převzato z Craddock a kol., 2006).



Obrázek 10: Vliv alely Met na vyšší hladinu dopaminu v synaptické štěrbině.

3. Neurologická onemocnění spojená s dopaminergním systémem

Vzhledem k významné funkci dopaminu a jeho složitým, jemně laděným dráhám, má porucha celého systému za následek významné změny ve struktuře a/či funkci mozku.

Pro většinu neurologických onemocnění je společným znakem degenerace dopaminergních neuronů v mezimozku, což ústí v nedostatečnou produkci dopaminu. Dospělý mozek zdravého člověka má v mezimozku mezi 400 – 600 tisíci dopaminergních neuronů, v případě neurodegenerativních onemocnění je jejich počet signifikantně nižší (Pakkenberg a kol., 1991; Schultz, 2007).

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba se vyznačuje specifickou degenerací neuronů a jejich synapsí v cerebrálním kortexu, následkem čehož dochází k atrofii příslušných struktur, včetně frontální kůry a oblasti zvané *cingulate gyrus*, jež je částí limbického systému. Nejtypičtějším projevem této nemoci je demence (Wenk, 2003). K rozvoji Alzheimerovy choroby přispívají patologické struktury amyloidních a tau proteinů v mozku (Hashimoto a kol., 2003).

Amyloidní prekurzorový protein (APP) je transmembránový protein nezbytný pro vývoj a přežívání neuronů. U lidí trpících Alzheimerovou chorobou je ale APP štěpen gama a beta sekretázami na fragmenty. Z těchto fragmentů je kritický fragment amyloid beta, který vytváří extracelulární shluky v šedé kůře mozku (Priller a kol., 2006; Hooper, 2005; Tiraboschi a kol., 2004).

Tau proteiny jsou za běžných podmínek fosforylovány a stabilizují mikrotubuly neuronů, které dodávají přes axony živiny a další molekuly. U Alzheimerovy choroby dochází k hyperfosforylaci tau proteinů, následkem čehož dochází k vytváření neurofibrálních spleť a rozpadu transportního systému neuronů (Hernández a Avila, 2007).

3.2 Parkinsonova choroba

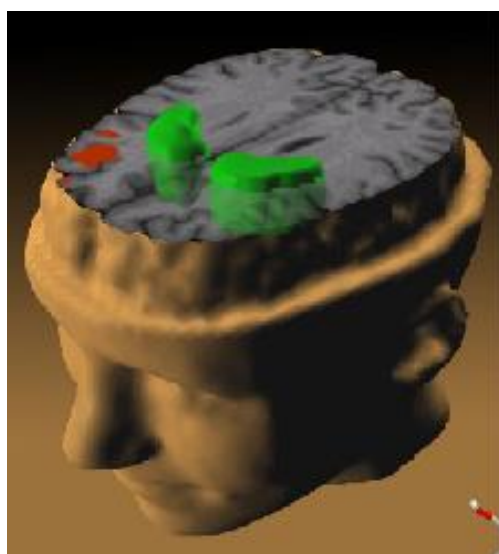
Jedná se o neurodegenerativní nemoc postihující motorické funkce, později se rozvíjí i demence. Parkinsonova choroba vzniká postupnou degenerací dopaminových buněk v oblasti *substantia nigra*. Mechanismus degenerace dopaminových buněk není dosud plně

objasněn, ale pravděpodobně to má souvislost se vznikem Lewyho tělísek, tedy agregátů proteinů, hromadících se v příslušných neuronech. Degenerace neuronů je postupná a trvá roky. Při projevení motorických problémů jsou popisovány ztráty dopaminových neuronů až o 30 – 70 % (Braak a kol., 2003; Jankovic, 2005).

3.3 Schizofrenie

Jedná se o psychopatologické onemocnění, pro které je typická porucha vnímání reality. Pro schizofrenii jsou charakteristické dvě třídy symptomů, pozitivní (nápadné) a negativní (nenápadné). Do pozitivních symptomů se řadí halucinace, zmatená řeč a myšlení, bludy. K negativním symptomům patří zejména sociální izolace, deprese a emoční oploštění (Pečeňák, 2014).

Schizofrenie je spojována s různými neuropatologickými poruchami, mezi něž patří i tak zvaná dopaminová hypotéza. Ta vychází ze zjištěné abnormální koncentrace dopaminu u schizofrenních pacientů, respektive z nadměrné aktivace D2 receptorů. Nadměrná aktivace D2 receptorů v limbickém systému, zejména v oblasti amygdaly a *nucleus accumbens*, zjevně může zapříčinit chybnou interpretaci vnějších stimulů a poruchy vnímání. Je tedy příčinou pozitivních symptomů schizofrenie. V oblasti frontální kůry je naopak přenos dopaminu snížen a oblast čelního laloku se zmenšuje (Obr. 8). To má za následek sníženou schopnost vyjadřování se a nízkou motivaci. Dopaminová hypotéza byla podpořena nejen použitím pozitronové emisní tomografie (PET), ale i faktem, že amfetaminy zhoršují symptomy schizofrenie. Fungují jako spouštěč pro uvolňování dopaminu (Laruelle a kol., 1996; Jones a Pilowski, 2002; Moore a kol., 1999).



Obr. 8: Zobrazení mozkových struktur schizofrenního pacienta. Červeně jsou zvýrazněny změny v čelním laloku, zeleně zvýšená hladina dopaminu ve *striatu* (limbická podkorová struktura)
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Schizofrenie>

4. Novelty seeking behaviour

Typem chování novelty seeking se označuje dědičná tendence k intenzivním prožitkům v reakci na nové neznámé podněty. To vede k častým průzkumným činnostem při hledání potencionálních odměn bez ohledu na možná rizika. Korelaci mezi novelty seeking a dopaminergním systémem naznačuje fakt, že nízká hladina dopaminu v basálních gangliích je motivační pro hledání „odměny“, což následně vede k většímu vyplavení dopaminu. Přijímané nové podněty aktivují v mozku právě ta centra, která jsou bohatá na dopaminergní vstupy. Tento mechanismus je založen na tzv. systému „potěšení a odměny“. (Costa a kol., 2014; Cloninger, 1987a). K údržbě celého systému přispívají noradrenergické dráhy, které podporují iniciaci těchto reakcí a zároveň ukončují předchozí spojení (Zuckerman 1995; Cloninger, 1986).

Jedinci, kteří mají vyšší skóre novelty seeking, jsou impulzivní, snadno podlehnou nudě a hledají nové, často riskantní aktivity, jež mohou vést k potencionální odměně. Tyto aktivity mohou mít podobu adrenalinových sportů, ale i gamblingu a užívání drog. Extrémní formou vysokého skóre novelty seeking může být sociopatie nebo maniodepresivní psychóza. Naopak u nízkého skóre novelty seeking se může vyskytovat druhá extrémní forma, jako je neurotizmus, chronická fobie či obsesivně kompulzivní porucha (Zuckerman, 1979).

Vysoké skóre novelty seeking vykazuje uvolnění dopaminu z vezikulů v *nucleus accumbens* a zároveň nízký počet D2 receptorů v *nucleus accumbens*, *substantia nigra* a ve *striatu*. Snížený počet D2 receptorů znamená snížený vznik vazby dopamin-receptor. Užívání drog či vyhledávání adrenalinových sportů přispívá k zvýšenému uvolňování dopaminu, jenž může následně výrazněji působit i v oblastech s redukováným počtem D2 receptorů. Jedná se o tzv. hyperdopaminergní aktivitu (Wingo a kol., 2016).

Novelty seeking behavior patří ke Cloningerovu modelu osobnosti. Cloninger, americký psychiatr a genetik, předpokládal, že základ povahy každého člověka má značný stupeň dědičnosti, a dodatečné povahové rysy jsou formovány okolním prostředím v průběhu dospívání. Původní Cloningerův model osobnosti zahrnoval tři oblasti osobnosti, již zmíněné novelty seeking, a dále harm avoidance a reward dependence. Harm avoidance je popisováno jako dědičná tendence vyhýbat se či silněji reagovat na averzní stimuly, které mohou mít za následek trest. Reward dependence je charakterizováno jako dědičná tendence k intenzivním reakcím na podněty odměny, a ochota zachovat si chování, které k těmto

podnětům vede. Cloningerovy předpoklady vycházely z genetických, neurologických, farmakologických a psychologických dat. Na základě těchto tří oblastí osobnosti byl sestaven Tridimensional Personality Questionnaire (TPQ) pro účely klinického hodnocení charakteru jedince. Později Cloninger dotazník rozšířil o další rozměry osobnosti a výsledná podoba dotazníku známá jako Temperament and Character Inventory (TCI) měří sedm dimenzí osobnosti (Tab. I.). Nejnovější verze se nazývá Temperament and Character Inventory – Revised (TCI-R). V oblastech neurobiologie a psychologie se jedná o široce využívaný dotazník shrnující subjektivní výpovědi o vlastní osobě (Cloninger, 1987a; Zuckerman a Cloninger, 1996).

Tabulka I: Jednotlivé části dotazníku Temperament and Character Inventory (převzato z Svrakic a Cloninger, 2010).

Scales and sub scales of Temperament and Character Inventory	
Novelty seeking (NS)	Exploratory and excitability (NS1), Impulsiveness (NS2), Extravagance (NS3), Disorderliness (NS4)
Harm avoidance (HA)	Anticipatory worry (HA1), Fear of uncertainty (HA2), Shyness (HA3), Fatigability (HA4)
Reward dependence (RD)	Sentimentality (RD1), Openness to warm communication (RD2), Attachment (RD3), Dependence (RD4)
Persistence (PS)	Eagerness of effort (PS1), Work hardened (PS2), Ambitious (PS3), Perfectionist (PS4)
Self-directedness (SD)	Responsibility (SD1), Purposeful (SD2), Resourcefulness (SD3), Self-acceptance (SD4), Enlightened second nature (SD5)
Cooperativeness (C)	Social acceptance (C1), Empathy (C2), Helpfulness (C3), Compassion (C4), Pure hearted Conscience (C5)
Self-transcendence (ST)	Self-forgetful (ST1), Transpersonal identification (ST2), Spiritual acceptance (ST3)

5. Faktory korelující s lidským chováním

Lidské chování je výsledkem interakce mnoha různých faktorů, nikoli působením pouze jediného faktoru.

Například genetická analýza genu *COMT* přinesla mnohé poznatky. Dle Enoch a kol. (2003) byla nalezená vysoká spjitost mezi nositeli genotypu Met/Met a chováním typu harm avoidance. Rujescu a kol. (2003) navíc zjistil, že zatímco nositelé Val/Val drží vztek v sobě a vypořádávají se s ním sami, nositelé genotypu Met/Met mají tendenci směřovat agresi ven.

Berman a kol. (2002) informovali o pozitivní korelaci mezi chováním typu harm avoidance i vyšším skóre novelty seeking u nositelů alely A1 v genu *ANKK1*. Další studie prokázala u drogově závislých spjitost mezi výskytem této alely a závislostí na kanabinoidech, zejména genotyp A1A1 byl nalezen s výrazně vyšším zastoupením u drogově závislých (Nacak a kol., 2012). Další fakt podporující tvrzení, že alela A1 je rizikovým faktorem pro vznik závislostí, je studie Comings a kol. (1996), která potvrdila vyšší frekvenci alely A1 u jedinců závislých na gamblingu. V případě polymorfismu -141C Ins/Del v genu *DRD2* je dle několika studií alela -141C Ins spojována s alkoholismem (Ishiguro a kol., 1998; Konishi a kol., 2004).

Jelikož studované polymorfismy snižují počet dopaminových receptorů (-141C Ins/Del a TaqIA v genu *DRD2*) a zpomalují odbourávání dopaminu (Val158Met v genu *COMT*), podporují Cloningerovův předpoklad, že nízká hladina dopaminu souvisí s vyšším skóre NS. (Cloninger, 1987).

Komplexní chování člověka však není nikdy ovlivněno samostatně jednonukleotidovým polymorfismem, a k jeho modulaci přispívají i další faktory. Mezi ně patří např. rodinné prostředí, v kterém člověk vyrůstá. Pokud měli jedinci dětství prožité v emocionální vzdálenosti od matky či byli poznamenáni přísnou disciplínou, měli podstatně vyšší riziko k rozvoji vyššího skóre novelty seeking, ve srovnání s jedinci, kteří měli spokojené dětství. Tyto rozdíly převažovaly bez ohledu na to, jaký měli jedinci genotyp. Výchova v dětství zřejmě dokáže značně modulovat genetické predispozice. Stejně jako špatně prožité dětství přispívá k vzniku chování novelty seeking, obdobně je tomu i u alkoholismu, drogových závislostí a poruch příjmu potravy (Keltikangas-Järvinen a kol., 2004).

Dalším důležitým faktorem, zřejmě ovlivňujícím NS, je pohlaví. Jedním z hlavních činitelů je pak pohlavní hormon testosteron. Nálezy u primátů naznačují, že hladina testosteronu koreluje s povahovými rysy na základě stresových podmínek. Obdobně labilní jedinci vykazují větší výkyvy v sekreci testosteronu oproti vyrovnaným jedincům (Sapolsky, 1993, Adler a kol., 1997). Kersbauch a kol. (2006) pomocí různých stresových podnětů prokázal u žen signifikantní korelaci mezi hladinou testosteronu a chováním. U mužů byla korelace méně znatelná. Hypotéza pohlaví uvádí, že muži mají tendenci odpovídat na stresový podnět stylem „flight or fight“, zatímco u žen se jedná o reakci „tend and befriend“. Obecně vzato jsou však dostupné studie zabývající se korelací testosteronu s novelty seeking stále spíše rozporuplné (Kersbauch a kol., 2006)

6. Cíle diplomové práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo prokázat korelaci vybraných polymorfismů s chováním typu novelty seeking. Tento cíl zahrnoval:

- získat dobrovolníky pro studii a rozdělit je do skupin
- otestovat u participantů pomocí psychologického dotazníku TCI-R skóre novelty seeking a porovnat je
- zjistit u participantů skutečnou frekvenci mutovaných alel (A1, Met, -141C Del) vybraných polymorfismů
- zjistit možnou asociaci mutovaných alel vybraných polymorfismů s novelty seeking
- zjistit možný vliv pohlaví na novelty seeking

Pro studii byli získáni dobrovolníci, kteří mohli být rozděleni do tří skupin (sportovci, schizofrenní pacienti, kontrolní skupina). V rámci našeho cíle byly stanoveny tři hlavní hypotézy.

Hypotéza 1: Jedinci, kteří se aktivně věnují adrenalinovým sportům, dosáhnou oproti kontrolní skupině podle dotazníku Temperament and Character Inventory-Revised vyššího skóre novelty seeking.

Hypotéza 2: Vybrané polymorfismy korelují s vyšším skóre novelty seeking.

Hypotéza 3: Mutované alely (A1, Met, - 141 C Del) vybraných polymorfismů se vyskytují spíše u sportovců a schizofrenních pacientů než u kontrolní skupiny, je zde tedy pozitivní korelace s novelty seeking.

Experimentální část

7. Metody

7.1 Nábor dobrovolníků

V rámci výzkumu bylo nutné oslovit a získat dobrovolníky pro vybrané skupiny (sportovci, schizofrenní pacienti, kontrolní skupina). Studie se celkem účastnilo 54 dobrovolníků. Skupina se sportovně založenými dobrovolníky sestávala z 22 participantů (10 žen, 12 mužů), 23 účastníků tvořilo kontrolní skupinu (účastníci s občasnými sportovními aktivitami či sport vůbec neprovozující; 21 žen, 2 muži) a 9 dobrovolníků tvořilo skupinu schizofrenních pacientů (5 žen, 4 muži).

Participantů zaměřených aktivně na sport byli oslovováni přes různé sportovní kluby, dále byli sportovci společně s účastníky tvořícími kontrolní skupinu oslovováni osobním kontaktem a prostřednictvím žádosti o účast v projektu na sociálních sítích. Do skupiny sportovců byli řazeni dobrovolníci, kteří uvedli, že se aktivně věnují sportům jako je horolezectví, parašuting, bojová umění apod. Schizofrenní pacienti se účastnili výzkumu díky navázané spolupráci s psychiatrickou MUDr. Kateřinou Duchoňovou.

Studie navazuje na magisterskou práci Mgr. Martiny Polgar zabývající se asociací – 141C polymorfismu s novelty seeking (Polgar, 2017). Z této práce byla použita některá získaná data týkající se uvedeného polymorfismu.

7.2 Psychologický dotazník TCI-R

Inventář povahových vlastností TCI-R (Temperament and Character Inventory – Revised) se skládá z 240 dotazů. Na 235 otázek se odpověď vybírá dle stupnice: 1 = rozhodně ne; 2 = pravděpodobně ne; 3 = ani pravda, ani lež; 4 = pravděpodobně ano; 5 = rozhodně ano. Zbylých 5 otázek je validačních. Otázky jsou formulovány následujícím způsobem, např.: „Často se pouštím do nových věcí bez hlubšího přemýšlení“. „To, co je správné, záleží na úhlu pohledu“. „Cítím spojení s lidmi a světem kolem sebe“. „Jdu si za svými cíli bez ohledu na ostatní“. „Nemám problém zachovat klid ve stresových situacích“.

Pro stanovení skóre byla k dispozici online slovenská verze dotazníku dostupná prostřednictvím Google survey. Pro zachování anonymity se každý účastník zapsal

specifickým identifikačním číslem, skládajícím se z alespoň 2 písmen a 4 číslic. Účastníci na začátku dotazníku uvedli svůj věk, pohlaví a typ sportu, kterému se věnují, pokud nějakému, v jakém regionu žijí, typ manželského statusu (ženatý/vdaná, svobodný/á, rozvedený/á...) a typ zaměstnání (student, pracující student, zaměstnan, nezaměstnan...). Informace byly dostupné pouze klinickému psychologovi doc. Mgr. Antonu Heretikovi, Ph.D. za účelem vyhodnocení TCI-R dotazníku. Dotazník vyplnili všichni participanti až na schizofrenní pacienty, kteří dotazník nevyplnili z důvodu jejich zdravotního stavu a obtížnější komunikace.

7.3 Odběr biologického materiálu

Primárním vzorkem, který sloužil pro izolaci DNA, byl bukální stěr. Odběrové soupravy pro bukální stěr (*Isohelix SK1 Buccal Swab*) byly zaslány poštou na adresu uvedenou participanty nebo předány osobně. Bukální stěr byl neprodleně zpracován tak, aby nedošlo k jeho znehodnocení. Po izolaci byly získané vzorky DNA řádně skladovány v mrazícím boxu při teplotě - 20°C.

7.3.1 Informovaný souhlas

Formulář s informovaným souhlasem byl přiložen ke každé odběrové bukální soupravě (Příloha 1). Všichni dobrovolníci byli patřičně seznámeni s obsahem a cíli studie, což stvrdili podepsáním tohoto informovaného souhlasu. Zároveň se prostřednictvím souhlasu měli možnost rozhodnout, zda si po skončení výzkumu přejí nadále skladovat svůj vzorek DNA či ne.

7.3.2 Schválení výzkumu etickou komisí

Výzkum byl schválen etickou komisí a probíhal anonymně, bez používání jmen či osobních údajů. Osobní informace všech participantů podléhaly ochraně osobních údajů v souladu s platnými právními předpisy a zákony České republiky (zákon o ochraně osobních údajů 101/ 2000 Sb). Podepsané formuláře s informovaným souhlasem jsou uloženy v papírově podobně v laboratoři a k dispozici je mají pouze pracovníci laboratoře. Laboratoř nesdílí osobní údaje účastníků s žádnou třetí stranou. Jako autorka studie jsem rovněž vázána mlčenlivostí a nemohu poskytovat osobní informace participantů třetím stranám.

7.4 Izolace DNA

Izolace DNA ze stěru bukální sliznice byla prováděna pomocí dvou různých izolačních kitů, izolačního kitu Isohelix DNA (DDK-3/DDK-50) a izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini (SK168_GL_001_D).

7.4.1 Izolace DNA pomocí izolačního kitu Isohelix DNA (DDK-3/DDK-50)

Reagenty izolačního kitu Isohelix DNA (DDK-3/DDK-50) jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II: Reagenty izolačního kitu Isohelix DNA (DDK-3/DDK-50) použité pro 1 izolační reakci.

Reagenty	Objem (μl)
Lysis buffer (LS)	500
Proteinasa K (PK)	20
Capture buffer (CT)	500
Re-hydratation buffer (TE)	30

Pro každý vzorek byly připraveny dvě 1,5 ml zkumavky. Všechny reagenty byly vytemperovány na pokojovou teplotu. Do každé zkumavky obsahující tampon s bukálním stěrem bylo přidáno 500 μl LS a 20 μl PK. Po následném zvortexování (*Microspin FV-2400*; *BioSan*) a centrifugaci (*Centrifuge 5415 R*; *Eppendorf*) byly vzorky jednu hodinu inkubovány při 60 °C v termostatu (*Dry Block Thermostat TDB-120*; *BioSan*). Po skončení inkubace byly vzorky opět zvortexovány a zcentrifugovány. Supernatant každého vzorku byl přenesen do nové 1,5 ml zkumavky, následně bylo přidáno 500 μl CT. Následoval vortex a centrifugace vzorků 7 min při 13 000 rpm. Po skončení centrifugace byl supernatant odstraněn, bez porušení vzniklé pelety, a vzorky byly krátce zcentrifugovány, pro odstranění zbytku supernatantu. Pro získání většího výtěžku DNA ze vzorků bylo přidáno pouze 30 μl TE a vzorky se následně nechaly 5 min inkubovat při pokojové teplotě (RT). Poté byly vzorky zvortexovány a centrifugovány 15 min při 13 000 rpm. Výsledný supernatant obsahující DNA byl přenesen do nové 1,5 ml zkumavky. Izolovaná a řádně označená DNA byla skladována v mrazicím boxu při – 20 °C.

7.4.2 Izolace DNA pomocí izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini (SK168_GL_001_D)

Reagenty izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini (SK168_GL_001_D) jsou uvedeny níže (Tab III).

Tabulka III: Reagenty izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini (SK168_GL_001_D) použité pro 1 izolační reakci.

Reagenty	Objem (μl)
BL buffer	400
Proteinasa K (PK)	40
BW buffer	600
TW buffer	700
AE buffer	50

Všechny reagenty byly vytemperovány na pokojovou teplotu. Do každé zkumavky obsahující tampon s buňkami bukalní sliznice bylo přidáno 400 μl BL pufru a 40 μl PK. Po následném zvortexování (*Microspin FV-2400; BioSan*) a centrifugaci (*Centrifuge 5415 R; Eppendorf*) byly vzorky 10 min inkubovány při 56 °C v termostatu (*Dry Block Thermostat TDB-120; BioSan*). Po skončení inkubace byly vzorky opět zvortexovány a zcentrifugovány. Ke každému vzorku bylo přidáno 400 μl 100% etanolu a směs se v pulzech vortexovala. Po krátké centrifugaci se směs přenesla na kolonku a 1 min byla centrifugována při otáčkách > 8 000 rpm. Původní sběrná zkumavka byla nahrazena novou a ke směsi bylo přidáno 600 μl BW pufru. Směs se znovu 1 min centrifugovala při otáčkách > 8 000 rpm a sběrná zkumavka se poté vyměnila za novou. Dále se přidalo 700 μl TW pufru a 1 min probíhala centrifugace při otáčkách > 8 000 rpm. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant ze sběrné zkumavky, do které se pak vrátila kolonka. Následně proběhla centrifugace 1 min při 13 000 rpm, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonka byla poté přenesena do nové 1,5 ml zkumavky s víčkem. Přímo na střed filtru kolonky bylo přidáno 50 μl AE pufru a následovala inkubace po dobu 5 min při pokojové teplotě (RT). Po inkubaci proběhla centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Poté byl krok s přidáním AE pufru, inkubací a centrifugací zopakován. Po zopakování byly u všech vzorků kolonky odstraněny a 1,5 ml zkumavky obsahující supernatant s DNA byly uskladněny. Izolovaná a řádně označená DNA byla skladována v mrazicím boxu při – 20 °C.

7.5 Fluorometrie

Koncentrace DNA byla měřena fluorometrem (*Qubit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific*) a řádně zaznamenána. Byl použit kit Qubit dsDNA Assay HS (Invitrogen). Reagenty kitu jsou uvedeny níže (Tab. IV).

Tabulka IV: Reagenty kitu Qubit dsDNA Assay HS (Invitrogen) použité pro 1 reakci.

Reagenty	Objem (μl)
Qubit dsDNA BR buffer	199
Qubit dsDNA BR reagent	1
Qubit dsDNA BR standard #1	10
Qubit dsDNA BR standard #2	10

Po vytemperování na pokojovou teplotu (RT) byl připraven zásobní roztok. Nejprve bylo smícháno 199 μl Qubit dsDNA BR pufru s 1 μl Qubit dsDNA BR reagentu. Pomocí stolní centrifugy (*Microspin FV-2400; Biosan*) byla směs vortexována a stočena. Pro měření standardu bylo smícháno ve dvou 0,5 ml mikrozkuškových 190 μl zásobního roztoku s 10 μl příslušných standardů. Pro měření vzorků bylo smícháno 198 μl zásobního roztoku a 2 μl DNA. Po krátkém vortexování a stočení následovala inkubace při RT po dobu 2 min. Pomocí roztoků obsahujících standardy byl fluorometr zkalibrován, a následně změřena koncentrace DNA ve vzorcích.

7.6 Genetická analýza

Vybrané polymorfismy v genu *DRD2* byly analyzovány pomocí metody PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism). Určitý počet vzorků byl však problematický (nízká koncentrace DNA, přítomnost inhibitorů) a metoda musela být v několika případech optimalizována. Pro optimalizaci jsme zvolili úpravy pracovních postupů spočívající ve změně vstupního množství DNA, modifikaci reakčního protokolu a ve změně použité polymerázy.

7.6.1 Analýza polymorfismu TaqIA pomocí PCR-RFLP

Pro detekci polymorfismu TaqIA byl použit amplifikační kit EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix (*Takara Bio Company*), a oligonukleotidové primery se sekvencí 5'-CCG TCG ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA-3' (forward primer) a 5'-CCG TGA ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA-3' (reverse primer). Primery a reakční profil byly převzaty z práce Magro a kol. (2006), syntéza primerů byla provedena firmou Elisabeth Pharmacon. Amplifikován byl 310 bp dlouhý produkt odpovídající TaqIA lokusu v genu *DRD2* (Magro a kol., 2006).

Samotná příprava PCR mixu byla prováděna v chladícím stojanu v PCR boxu. Výsledný objem reakce (Tab. V) byl 25 μ l a reakce obsahovala 12,5 μ l EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix, 5% DMSO, 0,2 μ M forward primer, 0,2 μ M reverse primer, 4,25 až 7,25 μ l H₂O a 2-5 μ l DNA izolátu. Větší objem DNA izolátu a menší objem H₂O byl používán u vzorků s nízkou koncentrací DNA.

Tabulka V: Složení a objem 1 reakce.

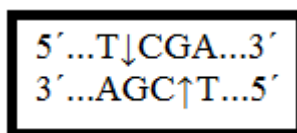
Reagenty	Objem (μ l) 1 reakce
EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix	12,5
DMSO	1,25
deionizovaná H ₂ O	4,25 – 7,25
forward primer	1
reverse primer	1
DNA	2 – 5
Výsledný objem 1 reakce	25

Průběh PCR reakce je uveden v tabulce VI. Pro amplifikaci byl použit gradientový PCR cycler (*MultiGene, Labnet*).

Tabulka VI: Průběh PCR reakce.

PCR reakce		
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	94	4
35 cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)
Denaturace	94	30
Annealing	60	30
Extenze	70	30
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Finální extenze	72	5

Výsledné PCR produkty o velikosti 310 bp byly štěpeny za použití restrikčního enzymu TaqI (10U) (*Thermo Scientific*) a 10x pufru TaqI (1x) (*Thermo Scientific*). Restrikční místo je zobrazeno na Obr. 9. Restrikční štěpení probíhalo při 65 °C 4 hod v teplotním cycleru *MultiGene Labnet*. Vzniklé fragmenty po restrikčním štěpení: dominantní homozygot (A2A2) 180 a 130 bp, heterozygot (A1A2) 310, 180 a 130 bp. U recesivních homozygotů (A1A1) není přítomno restrikční místo, výsledkem je tedy nerozštěpený 310 bp dlouhý fragment (Magro a kol., 2006). Vizualizace produktů byla prováděna pomocí gelové elektroforézy (viz. kapitola 7.6.4 *Gelová elektroforéza*).



Obrázek 9: Restrikční místo enzymu TaqI.

7.6.2 Analýza polymorfismu – 141C Ins/Del pomocí PCR-RFLP

Ke zjištění polymorfismu – 141C Ins/Del byl použit amplifikační kit EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix (*Takara Bio Company*), a specifické primery (syntetizovány firmou *ELISABETH PHARMACON*®) se sekvencí 5'-ACT GGC GAG CAG ACG GTG AGG ACC C-3' (forward primer) a 5'-TGC GCG CGT GAG GTC GCC GGT TCG G-3' (reverse primer). Primery a reakční profil PCR reakce byl převzat z práce Polgar (2017). PCR amplifikací byl získán produkt o velikosti 303 bp.

Každá PCR reakce, připravována v chladícím stojanu v PCR boxu, měla celkový objem 25 µl (Tab. VII) a obsahovala 12,5 µl EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix, 5 % µl DMSO, 0,2 µM forward primer, 0,2 µM reverse primer, 4,25 až 7,25 µl H₂O a 2-5 µl DNA. Větší objem DNA izolátu a menší objem H₂O byl používán u vzorků s nízkou koncentrací DNA.

Tabulka VII: Složení a objem 1 reakce.

Reagenty	Objem (µl) 1 reakce
EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix	12,5
DMSO	1,25
deionizovaná H ₂ O	4,25 – 7,25
forward primer	1
reverse primer	1
DNA	2 – 5
Výsledný objem 1 reakce	25

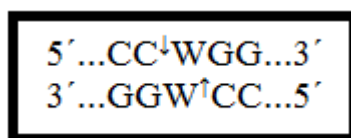
Reakční protokol je uveden v tabulce VIII, pro amplifikaci byl použit opět přístroj *MultiGene, Labnet*.

Tabulka VIII: Průběh PCR reakce.

PCR reakce		
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	95	2
35 cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)
Denaturace	95	30
Annealing	63	30
Extenze	72	30
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Finální extenze	72	5

Pro restriční štěpení PCR produktů byl použit restriční enzym Mval (BstNI) (10U) (*Thermo Scientific*) a 10x pufr R (1x) (*Thermo Scientific*). Restriční místo je znázorněno na Obr. 10. Restriční štěpení PCR produktů probíhalo v termostatu (*Dry Block Thermostat TDB-120: BioSan*) při 37 °C vždy nejméně 1 hodinu.

Inzerce – 141C vytváří nové restriční místo. Restriční fragmenty po štěpení odpovídají těmto velikostem: 160 bp a 140 bp pro homozygoty Ins/Ins, 303 bp, 160 bp a 140 bp pro heterozygoty Ins/Del. U homozygotů Del/Del není restriční místo, produktem byl tedy nerozštěpený fragment o velikosti 303 bp. Vizualizace produktů byla prováděna pomocí gelové elektroforézy (*viz. kapitola 7.6.4 Gelová elektroforéza*).



Obrázek 10: Restriční místo enzymu Mval (BstNI).

7.6.3 Analýza polymorfismu Val158Met pomocí PCR-RFLP

Analýza polymorfismu Val158Met v genu COMT byla nejproblematictější. Metoda musela být několikrát optimalizována a často opakována. K analýze Val158Met byl také použit amplifikační kit EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix (*Takara Bio Company*), značná část vzorků se však za použití tohoto kitu nedala analyzovat. Z toho důvodu byla amplifikace u problematických vzorků provedena pomocí jiných dvou kitů, a to 2x PCR BIO HS Taq Mix (*PCR Biosystems*) a nebo MyTaq™ DNA polymeráza (*Bioline*).

Pro PCR amplifikaci produktu o velikosti 217 bp byly použity specifické primery. Sekvence forward primeru byla 5'-TCG TGG ACG CCG TGA TTC AGG-3' a sekvence reverse primeru byla 5'-AGG TCT GAC AAC GGG TCA GGC-3'. Primery a reakční protokol byly převzaty z práce Tahara a kol. (2009). Primery byly syntetizovány firmou *ELISABETH PHARMACON*®.

a) *Příprava PCR reakční směsi s amplifikačním kitem EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix*

Každá PCR reakce, připravována na chladícím stojanu v PCR boxu, měla celkový objem 25 µl (Tab. IX) a obsahovala 12,5 µl EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix, 5% µl DMSO, 0,2 µM forward primer, 0,2 µM reverse primer, 4,25 až 7,25 µl H₂O a 2-5 µl DNA. Větší objem DNA a menší objem H₂O byl používán u vzorků s nízkou koncentrací DNA.

Tabulka IX: Složení a objem 1 reakce.

Reagenty	Objem (µl) 1 reakce
EmeraldAmp® Max HS PCR Master Mix	12,5
DMSO	1,25
deionizovaná H ₂ O	4,25 – 7,25
forward primer	1
reverse primer	1
DNA	2 – 5
Výsledný objem 1 reakce	25

b) **Příprava PCR reakční směsi s amplifikačním kitem 2x PCRBIO HS Taq Mix**

Každá PCR reakce, připravována v chladicím stojanu v PCR boxu, měla celkový objem 25 μl (Tab. X) a obsahovala 12,5 μl 2x PCRBIO HS Taq Mix, 5 % μl DMSO, 0,2 μM forward primer, 0,2 μM reverse primer, 4,25 μl H₂O a 5 μl DNA.

Tabulka X: Složení a objem 1 reakce.

Reagenty	Objem (μl) 1 reakce
2x PCRBIO HS Taq Mix	12,5
DMSO	1,25
deionizovaná H ₂ O	4,25
forward primer	1
reverse primer	1
DNA	5
Výsledný objem 1 reakce	25

c) **Příprava PCR reakční směsi s použitím MyTaq™ DNA polymeráza**

Samotná PCR reakce byla prováděna v chladicím stojanu v PCR boxu. Výsledný objem reakce (Tab. XI) byl 50 μl a reakce obsahovala 1U MyTaq™ DNA polymerázu, 10 μl MyTaq Red Reaction Buffer (*Bioline*), 5% DMSO, 0,2 μM forward primer, 0,2 μM reverse primer, 34,3 μl H₂O a 2 μl DNA izolátu.

Tabulka XI: Složení a objem 1 reakce.

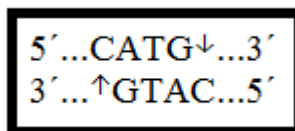
Reagenty	Objem (μl) 1 reakce
MyTaq™ DNA polymeráza	0,2
MyTaq Red Reaction Buffer	10
DMSO	2,5
deionizovaná H ₂ O	34,3
forward primer	0,5
reverse primer	0,5
DNA	2
Výsledný objem 1 reakce	50

Reakční protokol je uveden v tabulce XII, pro amplifikaci byl použit opět přístroj *MultiGene, Labnet*.

Tabulka XII: Průběh PCR reakce.

PCR reakce		
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	95	5
35 cyklů	Teplota (°C)	Čas (sek)
Denaturace	95	30
Annealing	55	30
Extenze	72	60
1 cyklus	Teplota (°C)	Čas (min)
Finální extenze	72	10

Pro restriční štěpení PCR produktů byl použit restriční enzym *NlaIII (5U) (Thermo Scientific)* a 10x pufr *G (1x) (Thermo Scientific)*. Restriční místo je znázorněno na Obr. 11. Restriční štěpení PCR produktů probíhalo v termostatu (*Dry Block Thermostat TDB-120: BioSan*) při 37 °C vždy nejméně 1 hodinu. Produkty restričního štěpení jsou: 136 bp a 81 bp u homozygota Val/Val, 136 bp, 96 bp, 81 bp a 40 bp u heterozygota (Val/Met), 96 bp, 81 bp a 40 bp u homozygota Met/Met. Vizualizace produktů byla prováděna pomocí gelové elektroforézy (viz. kapitola 7.6.4 *Gelová elektroforéza*).



Obrázek 11: Restriční místo enzymu *NlaIII*.

7.6.4 Gelová elektroforéza

Metodou gelové elektroforézy byla prováděna vizualizace PCR produktů a produktů restrikčního štěpení.

Agarózový gel

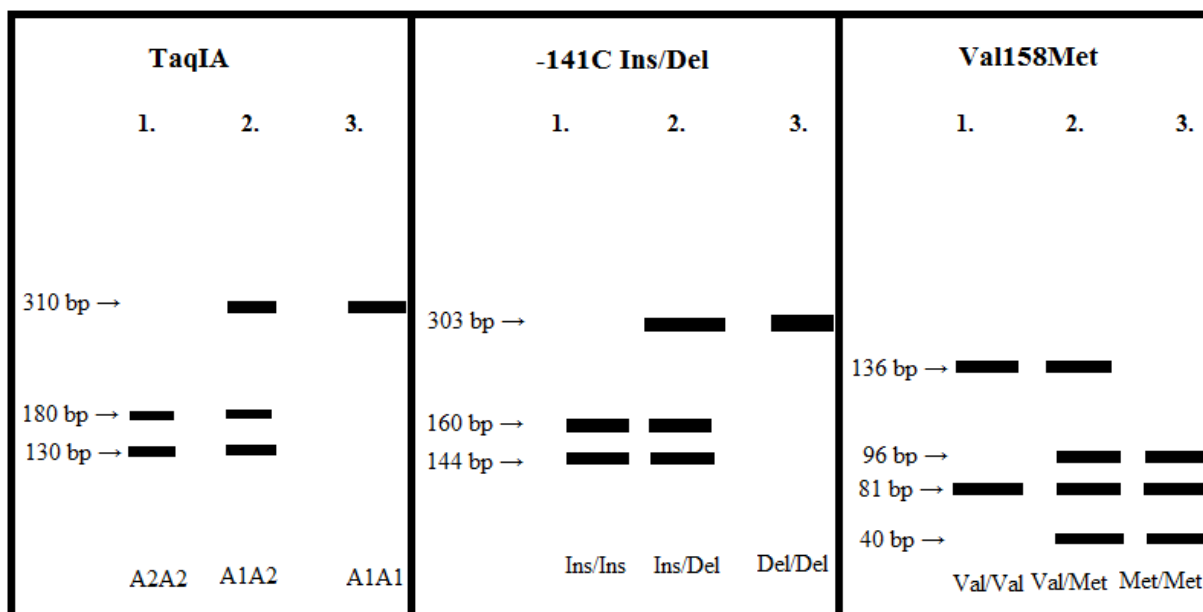
Pro přípravu agarózového gelu bylo nutné nejprve připravit roztok 1x TBE. Pro vytvoření toho roztoku se do láhve o objemu 0,5 l nalilo 50 ml 10x TBE roztoku (*InvitrogenTM*) a do celkového objemu (500 ml) se doplnilo 450 ml deionizované vody.

Pro přípravu 4% agarózového gelu byly použity 4 tablety obsahující 0,5 g agarózy (*Nippon Genetics*) a 50 ml 1x TBE roztoku. Po rozpuštění tablet byla směs ohřívána na plný výkon v mikrovlnné troubě, dokud se neutvořil tekutý gel bez bublin. Poté byl gel nalit do elektroforetické formy spolu s hřebeny a nechal se zatuhnout (cca 20 min). Po ztuhnutí gelu byly odstraněny hřebeny a gel byl přenesen do elektroforetické vany (*Mupid® One Electrophoresis System*) a zalit roztokem 1x TBE.

Pro vizualizaci PCR produktů bylo ke gelu před nalitím do elektroforetické vaničky přidáno 15 μ l barvičky Midori Green Advanced (*Nippon Genetics*); v případě vizualizace produktů restrikčního štěpení byl gel nebarvený a barvička Midori Green Direct (*Nippon Genetics*) byla přidávána přímo ke vzorkům.

Elektroforéza

Velikosti PCR produktů nebo restrikčních fragmentů (Obr. 11) byly odečteny pomocí markeru FastGene[®] 100 bp DNA Ladder H3 RTU (*Nippon Genetics*). Na gel bylo nanášeno 5 μ l tohoto markeru (v případě nebarveného gelu spolu s 1 μ l barvičky Midori Green Direct), do dalších jamek se nanášelo 5 μ l PCR produktu nebo 15 μ l produktu restrikčního štěpení (v případě nebarveného gelu spolu s 0,5 μ l Midori Green Direct). Elektroforéza probíhala 15 min při 135 V. Po skončení elektroforézy byl gel přenesen na gel-dokumentační systém (*FastGene® GelPic LED Box*), a následně byly odečteny výsledky a pořízena fotodokumentace gelu. Fotografie gelů byly přeneseny pomocí paměťové karty do PC.



Obrázek 11: Znázornění produktů restričního štěpení u jednotlivých polymorfismů.

7.7 Analýza dat

Sesbíraná data byla zpracována v programech Canoco 5¹, Statistica² 13 a Excel. Data v programu Canoco 5 byla analyzována pomocí metod Detrended Correspondence Analysis (nepřímá metody – DCA) a Detrended Canonical Correspondence Analysis (přímá metoda – DCCA). Faktory pro přímou analýzu byly vybírány metodou forward selection, hladina statistické významnosti byla zjištěna pomocí Monte-Carlo permutačního testu. V metodách DCA i DCCA byly tzv. response variables jednotlivé polymorfismy (vyjádřeno v procentech). Jelikož data nesplňovala podmínky pro použití parametrických testů (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0,05$), rozdíly mezi skupinami byly testovány v programu Statistica 13 pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu za účelem porovnání novelty seeking skóre mezi testovanými skupinami. Jako závislá proměnná byl stanoven faktor novelty seeking. Výsledky byly stanoveny jako signifikantní při $p < 0,05$. Pro grafickou vizualizaci byly zvoleny Box-ploty.

¹ Ter Braak C.J.F. & Šmilauer P. (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.

² Dell Inc. (2016). Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com.

Výsledky psychologického dotazníku TCI-R nám byly zaslány po jejich zpracování doc. Mgr. Antonem Heretikem, Ph.D. Jak je uvedeno výše, dotazník TCI-R zahrnuje v současné podobě sedm dimenzí osobnosti, naše studie je zaměřena pouze na jednu z nich – novelty seeking.

8. Výsledky

8.1 Interpretace novelty seeking

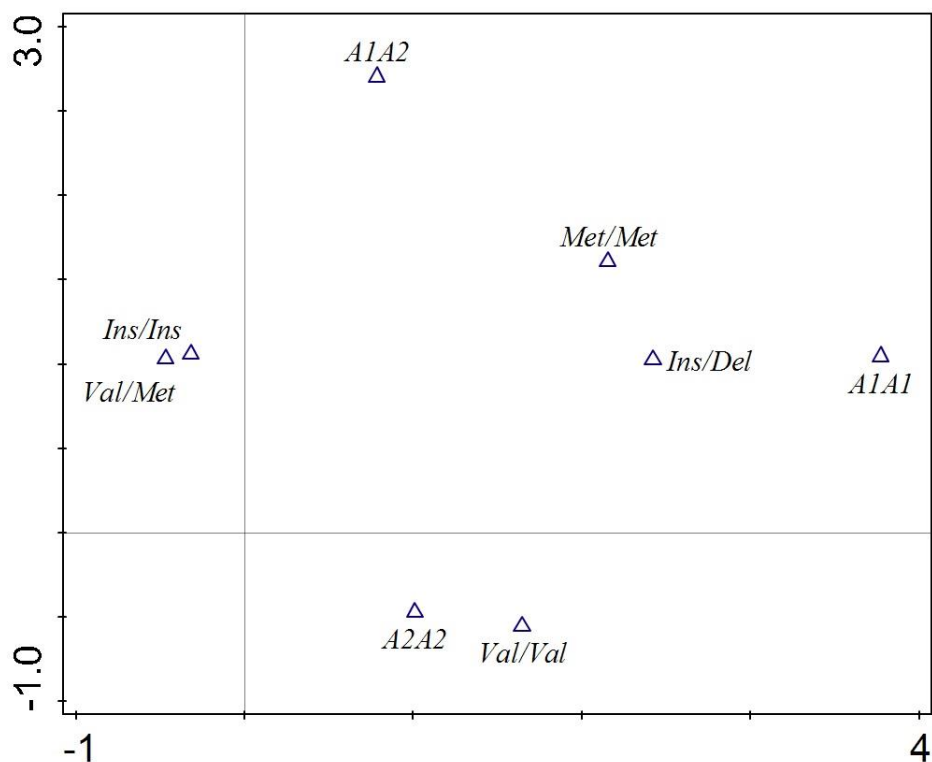
Z 54 dobrovolníků nevyplnilo dotazník 9 participantů. Jednalo se o schizofrenní pacienty. Skóre NS se tedy měřilo u skupiny sportovců (22) a u participantů tvořících kontrolní skupinu (23). Výsledné hodnoty novelty seeking jsme přiřadili k jednotlivým participantům na základě unikátního kódu, pod kterým se do dotazníku zapisovali. V tabulce (Tab. XIII) jsou uvedeny zaokrouhlené průměrné hodnoty skóre novelty seeking u sportovců a u kontrolní skupiny, pro statistickou analýzu byly použity všechny získané jednotlivé hodnoty skóre novelty seeking. Do naší analýzy nebyl zahrnut jako faktor věk, protože věkové rozmezí účastníků nebylo široké. Průměrný věk byl 24 let.

Tabulka XIII: Průměrné hodnoty skóre novelty seeking u jednotlivých skupin.

Skupina (n)	Průměrné skóre NS
Sportovci (22)	106
Kontrola (23)	92

8.2 Společný výskyt typických genotypových kombinací

DCA je metoda pro nepřímou gradientovou analýzu. Aplikací této metody a následným grafickým znázorněním (Obr. 12) jsme zjistili, že pro náš soubor tvořený 54 participanty ($n = 54$), existují typické kombinace genotypů vyskytujících se nejčastěji společně. Společně se vyskytují 3 kombinace genotypů: Ins/Ins a Val/Met; Ins/Del a Met/Met; A2A2 a Val/Val. Získaná hodnota *Explained variation (cumulative)* vyjadřuje okolo 27 % variability osy 1 a 46 % variability osy 2.



Obrázek 12: Ordinační diagram pro kombinační výskyt polymorfismů TaqIA, -141C Ins/Del, Val158Met. (DCA, první osa vysvětluje 27 % a druhá osa vysvětluje 46 %).

8.3 Stanovení indikativního faktoru

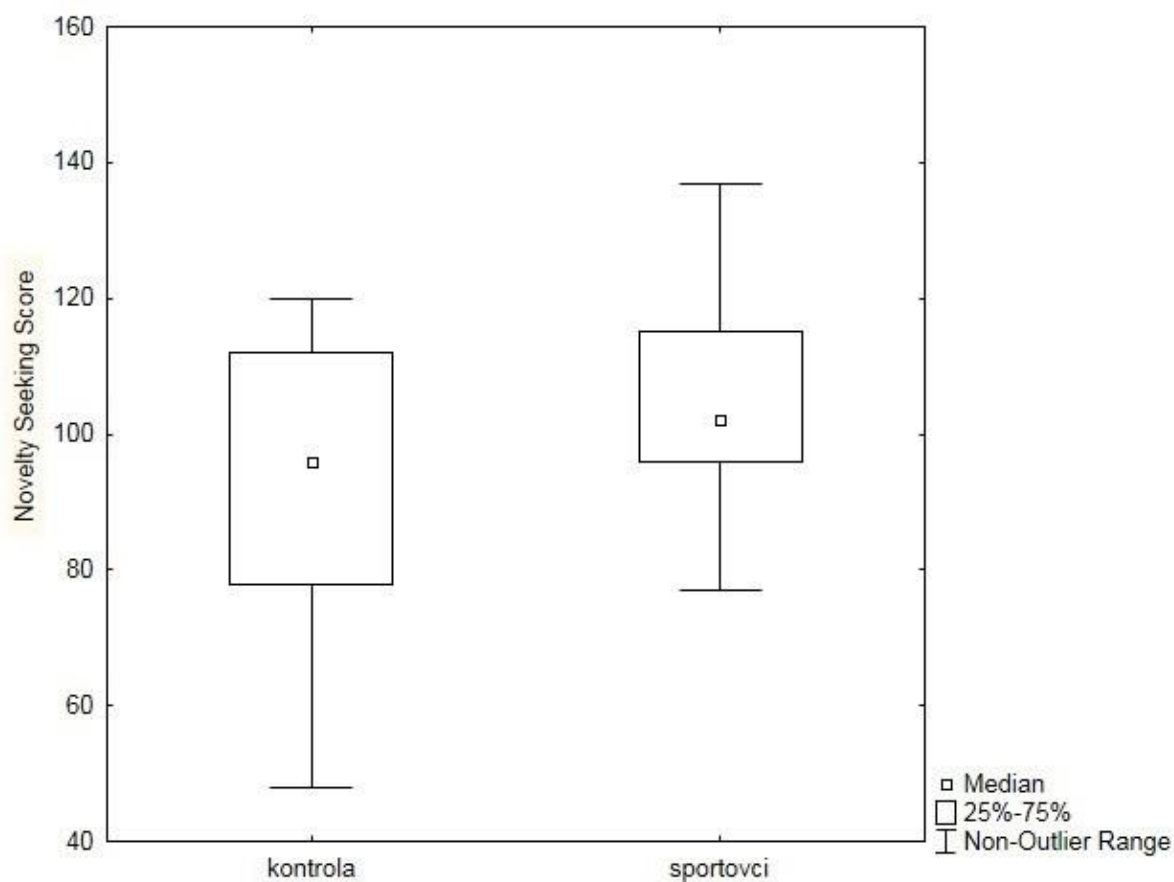
Metodou Detrended Canonical Correspondence Analysis jsme zjistili, že faktor novelty seeking byl jediný indikativní (metoda forward selection, Monte-Carlo permutační test, pseudo-F = 2.0, p = 0.07). Analyzovány byly jednotlivé polymorfismy (response variables) s použitím vysvětlujících proměnných (explanatory variables) (Tab. XIV). Faktor novelty seeking, jediný indikativní, byl následně vybrán pro další analýzy.

Tabulka XIV: Užití proměnné (DCCA).

Used response variables	Used explanatory variables
TaqIA	Sex
COMT	Novelty seeking
Ins/Del	Activity

8.4 Porovnání skóre novelty seeking u sportovců a kontrolní skupiny

Analyzované skupiny se liší ve svých středních hodnotách (mediánech, Obr. 13), rozdíl mezi skupinami byl pouze indikativní ($p < 0,052$). Z grafu je patrné, že se skupina sportovců i kontrolní skupina liší nejen mediánem, ale také rozsahem dosahovaného skóre NS. Celkově jsou hodnoty novelty seeking vyšší u skupiny sportovců. Zatímco rozsah kontrolní skupiny dosahuje v nejnižších hodnotách skóre novelty seeking okolo 50, rozsah skupiny sportovci v nejnižším bodu dosahuje novelty seeking pod hodnotu 80.

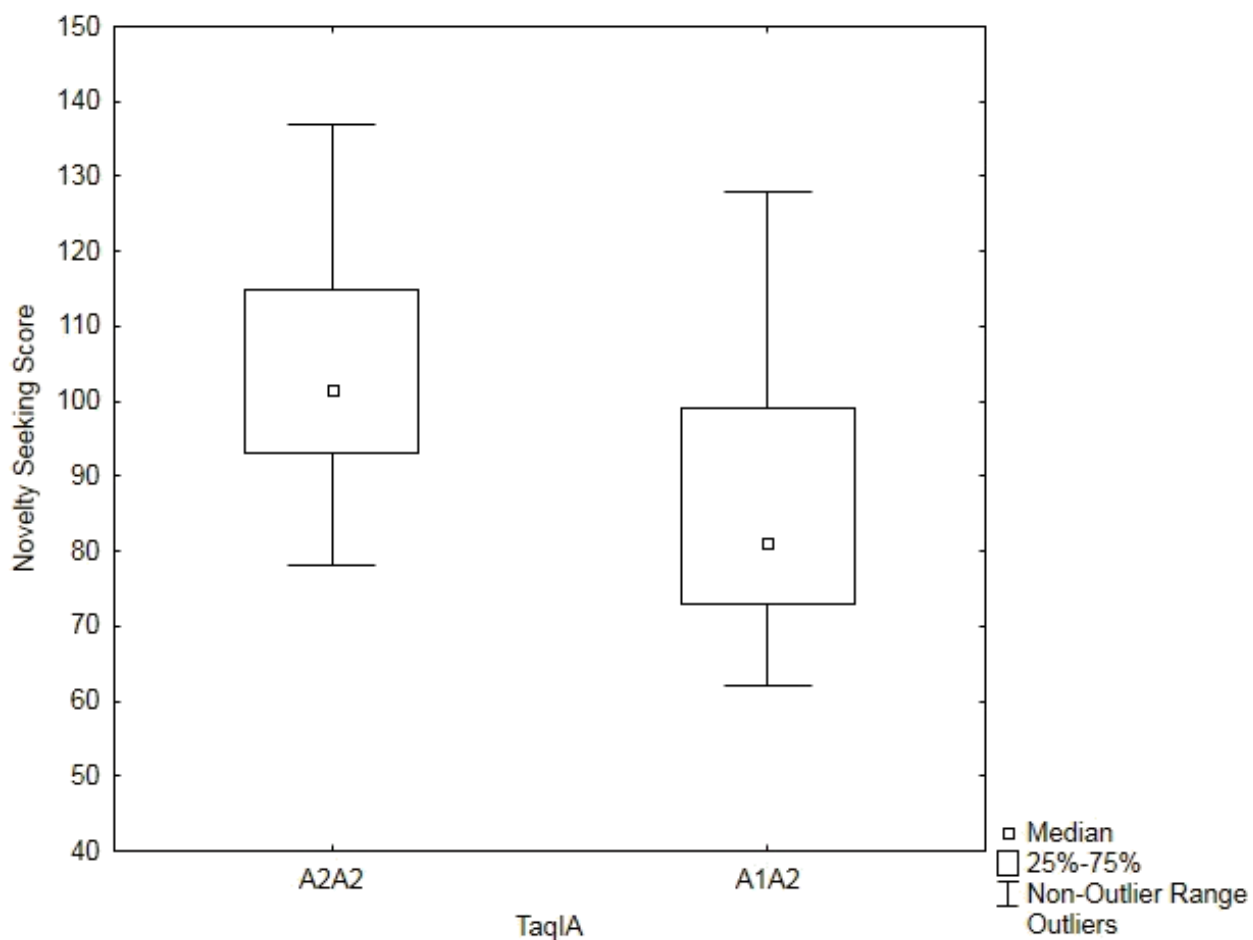


Obrázek 13: Porovnání dosaženého skóre NS u sportovců a kontrolní skupiny

(Mann-Whitney U test, $p < 0,05$).

8.5 Korelace polymorfismu TaqIA s novelty seeking

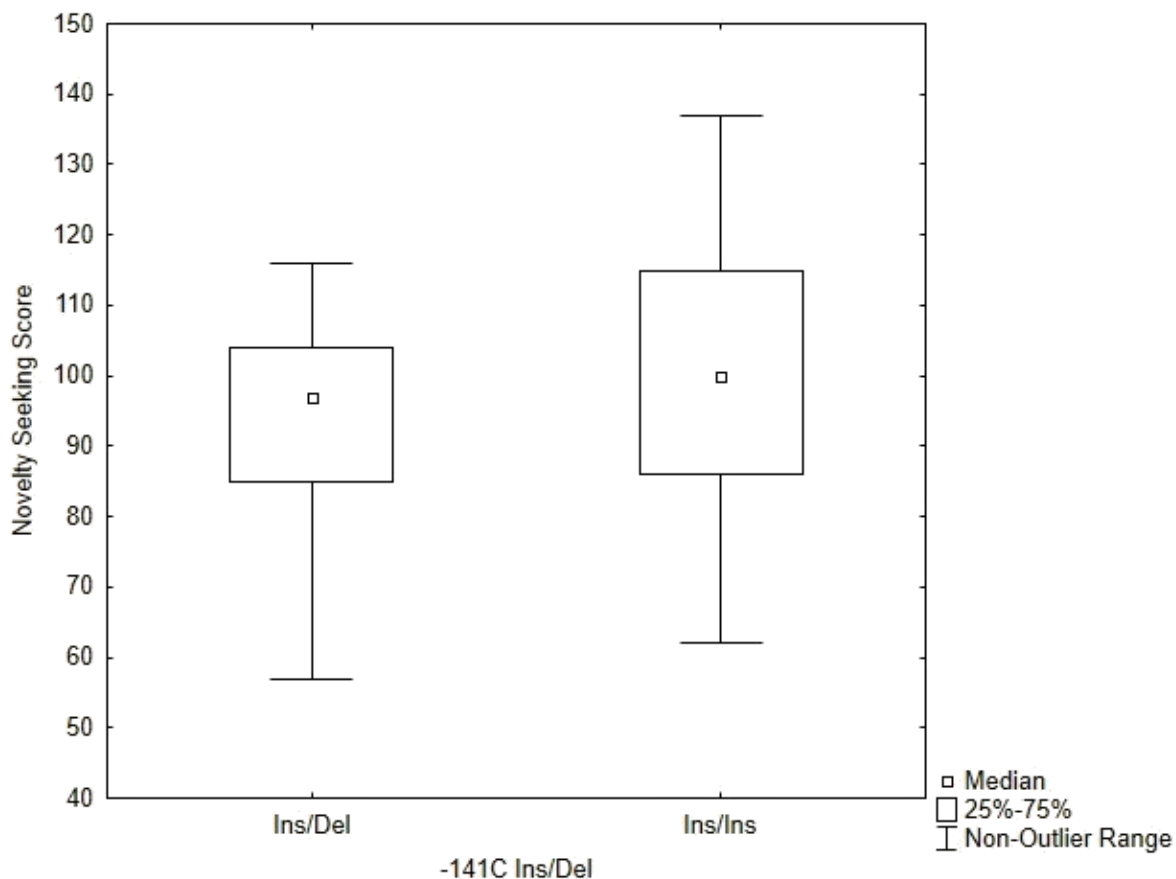
Testované skupiny (Obr. 14) se statisticky významně liší ve svých mediánech ($p < 0,027$). Zatímco jedinci s genotypem A1A2 dosahují v nejnižších hodnotách skóre novelty seeking nižší než 70, u nositelů alelické kombinace A2A2 jde o hodnoty skóre nižší než 80. Genotyp A2A2 zároveň dosahuje vyšších hodnot novelty seeking. Genotyp A1A1 nebyl do této analýzy zahrnut, neboť se v této skupině vyskytoval pouze jeden respondent.



Obrázek 14: Porovnání dosaženého skóre NS u genotypů A2A2 a A1A2 (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$).

8.6 Korelace polymorfismu –141C Ins/Del s novelty seeking

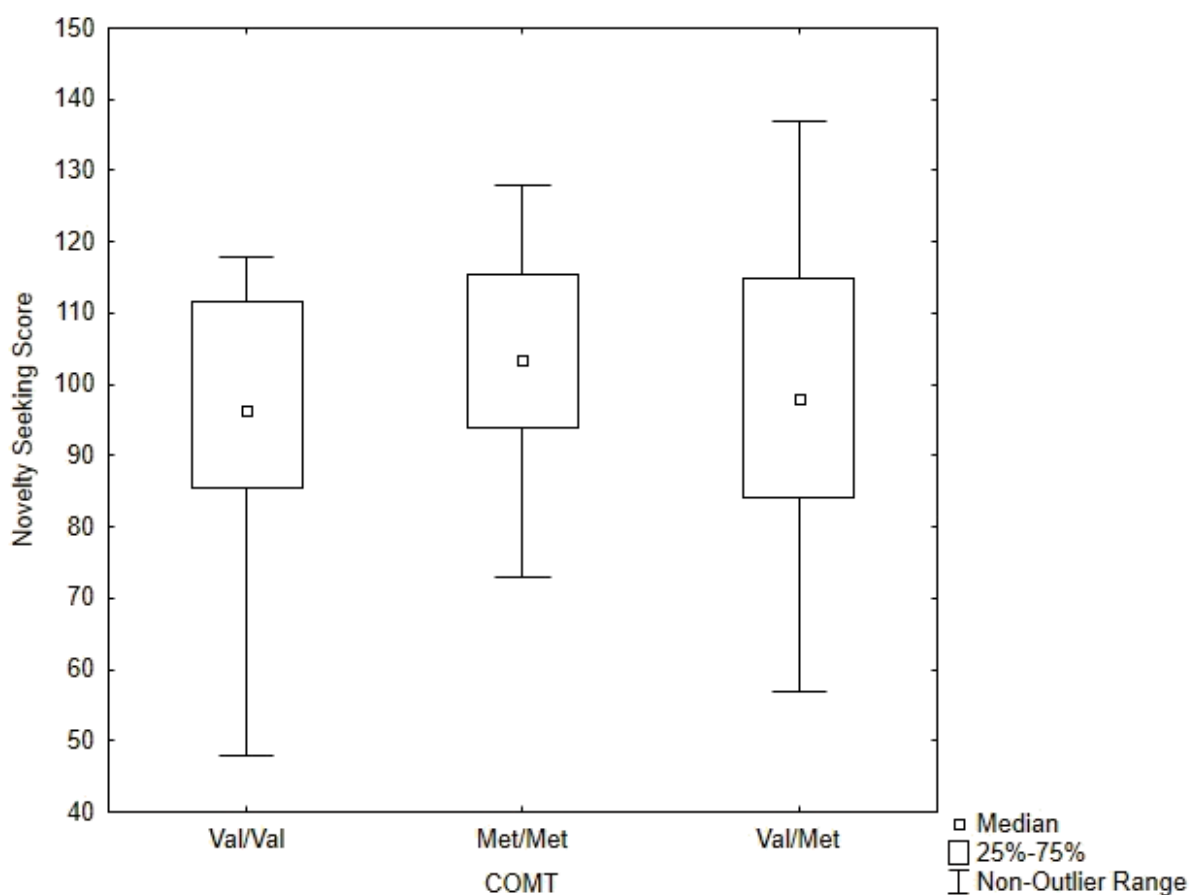
Mediány porovnávaných genotypů se téměř neliší (Obr. 15), statistická významnost nebyla zjištěna ($p < 0,427$). U genotypu Ins/Ins dosahuje skóre novelty seeking vyšších hodnot oproti genotypu Ins/Del. Genotyp Del/Del nebyl do této analýzy zahrnut, neboť se v této skupině objevil pouze jeden člověk.



Obrázek 15: Porovnání dosaženého skóre NS u genotypů Ins/Del a Ins/Ins (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$).

8.7 Korelace polymorfismu Val158Met s novelty seeking

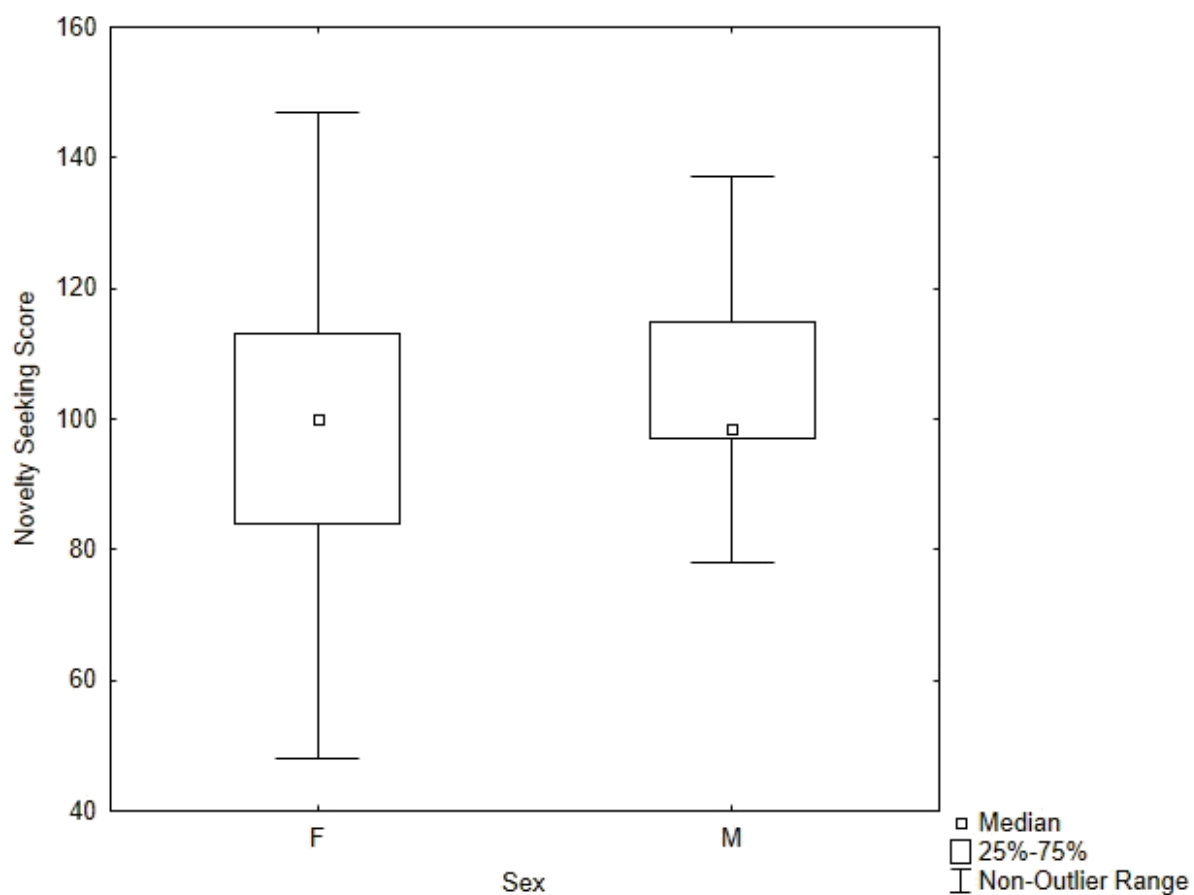
Rozdíl ve středních hodnotách testovaných genotypů je pouze mírný (Obr. 16), statistická významnost nebyla zjištěna ($p < 0,587$). Rozsah genotypu Val/Val v nízkých hodnotách skóre NS je patrný oproti ostatním dvěma genotypům. Největší rozmezí hodnot novelty seeking, vykazuje genotyp Val/Met. V porovnání s genotypy Val/Val a Val/Met dosahuje rozsah genotypu Met/Met vyšších minimálních hodnot novelty seeking.



Obrázek 16: Porovnání dosaženého skóre NS u genotypů Val/Val, Met/Met a Val/Met (Mann-Whitney test, $p < 0,05$).

8.8 Vliv pohlaví na novelty seeking

Hodnota mediánů obou skupin se téměř neliší (Obr. 17), statistická významnost nebyla zjištěna ($p < 0,615$). Ženy vykazují celkově širší rozsah v hodnotách novelty seeking oproti mužům. Nejvýraznější rozdíl je v rozsahu nižších hodnot NS. Zatímco ženy dosahují hodnot novelty seeking nižších než 50, u mužů jsou nejnižší hodnoty kolem 80.

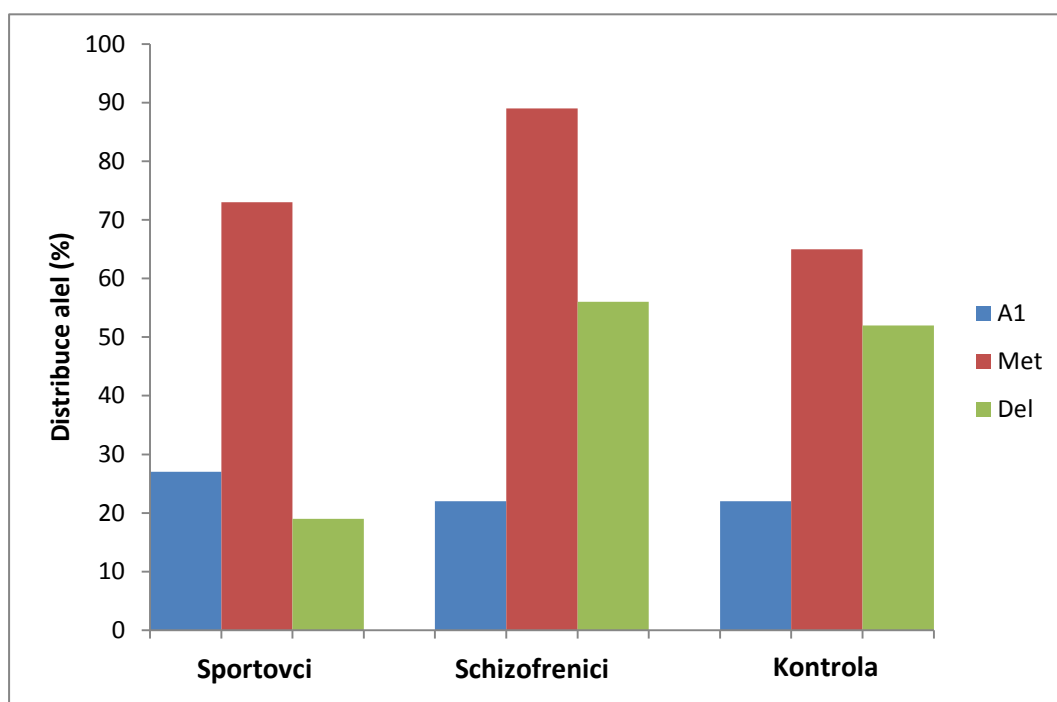


Obrázek 17: Vliv pohlaví na novelty seeking (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$).

8.9 Výskyt mutovaných alel u polymorfismů TaqIA, Val158Met, -141C Ins/Del u jednotlivých skupin

Procentuální zastoupení výskytu mutovaných alel (v heterozygotním i homozygotním stavu) u jednotlivých skupin je uvedeno v tabulce (Tab. XVII) a znázorněno v grafu (Obr. 18).

U skupin sportovci (22), schizofrenici (9) a kontrolní skupina (23) byla zjištěna následující distribuce alel. Ze všech tří studovaných polymorfismů se nejčastěji vyskytuje alela Met. U schizofreniků a kontrolní skupiny byla druhá nejfrekventovanější alela Del, zatímco u sportovců měla výskyt nejnižší. Celkově nejnižší zastoupení vykazuje alela A1 u všech tří skupin.



Obrázek 18: Frekvence mutovaných alel u jednotlivých skupin

Tabulka XVII: Četnost mutovaných alel (v heterozygotním i homozygotním stavu).

	Sportovci	Schizofrenici	Kontrola
A1	27 %	22 %	22 %
Met	73 %	89 %	65 %
Del	19 %	56 %	52 %

9. Diskuze

Cílem této studie bylo otestovat asociaci jednonukleotidových polymorfismů –141C Ins/Del a TaqIA v genu *DRD2* a jednonukleotidového polymorfismu Val158Met v genu *COMT* s lidským chováním. Jelikož vybrané geny přispívají k modulaci dopaminergního systému, který mimo jiné reguluje chování, byly pro studii vytvořeny tři skupiny dobrovolníků (sportovci, schizofrenní pacienti, kontrolní skupina).

Získat dobrovolníky ochotné účastnit se naší studie bylo velmi obtížné, a to zejména v případě participantů, kteří se aktivně věnují riskantním sportům, a také v případě schizofrenních pacientů. Další komplikace, které se vyskytly, spočívaly v nevyplnění dotazníku TCI-R či nedodržení podmínek nutných pro správný bukalní stěr. V několika případech velmi nízká koncentrace DNA vzorků či přítomnost nespécifických inhibitorů znemožnila analýzu vybraných polymorfismů. Tento problém se vyskytoval opakovaně i při nových odběrech a zejména u schizofrenních pacientů. V kombinaci s obtížným získáváním těchto participantů byl konečný počet v souboru schizofrenních pacientů velmi malý. Všichni dobrovolníci, kteří nevyplnili dotazník TCI-R nebo vzorky jejich bukalních stěrů byly nepoužitelné, byli ze studie vyloučeni.

Během analýzy genetického materiálu schizofrenních pacientů jsme narazili na zajímavý jev. Tyto vzorky měly velmi nízkou koncentraci DNA, což obecně komplikovalo jejich analýzu, ovšem po optimalizacích PCR metody z hlediska vstupní koncentrace DNA byly výsledky polymorfismů TaqIA a –141C Ins/Del dobře hodnotitelné. Výjimku představoval polymorfismus Val158Met. V případě tohoto polymorfismu neproběhla amplifikace vzorku vůbec anebo byl PCR produkt příliš slabý a nepoužitelný pro RFLP analýzu. Výsledky nemohly být odečteny ani po opakovaných pokusech. Toto byl další důvod, proč jsme museli některé schizofrenní pacienty ze studie vyloučit. Nakonec se podařilo analyzovat všechny uvedené polymorfismy u 9 schizofrenních pacientů. U těchto pacientů se sice analýza polymorfismu Val158Met podařila, ovšem vizualizované výsledky PCR-RFLP metody byly také slabé a obtížně interpretovatelné. Protože s analýzou a interpretací výsledků zbylých dvou polymorfismů takové problémy nebyly, zůstává otázkou, jestli analýza genu *COMT* u schizofrenních pacientů nemohla být ovlivňována např. typem léčby nebo výskytem jiné genové varianty v tomto genu nebo nevhodným výběrem analytické metody.

Jelikož jsme zkoumali tři nezávislé genové polymorfismy, mohli jsme sledovat tři typické kombinace genotypů vyskytující se společně (Obr. 12). Ze získaných výsledků je zřejmé, že pokud je jedinec wild-type v jednom genotypu, je často wild-type i v jiném genotypu. V naší studii se jedná o genotypy A2A2 a Val/Val. Naopak pokud je jedinec nositelem mutované alely v jednom genotypu, často má mutovanou alelu i v jiném genotypu (Ins/Del a Met/Met). Ovšem třetí kombinace genotypů se vyznačuje přítomností wild-type (Ins/Ins) společně s heterozygotním genotypem (Val/Met). Je zajímavé, že nalezené kombinace genotypů vždy tvoří jeden z polymorfismů genu *DRD2* (TaqIA, -141C Ins/Del) a polymorfismus Val158Met genu *COMT*. Vysvětlením může být podobný dopad přítomnosti obou polymorfismů v *DRD2* genu na vlastní regulaci dopaminu.

Kromě analýzy genotypů bylo nutné interpretovat výsledky dosaženého skóre novelty seeking u respondentů.

Dle stanovení naší první hypotézy měli participantů ve skupině sportovců dosáhnout vyššího skóre novelty seeking než participantů v kontrolní skupině. Mujica-Parodi a kol. (2014) uvádí, že jedinci věnující se sportům, u kterých hrozí značné riziko zranění, vykazují dysregulaci prefrontálního limbického systému, konkrétně méně vyváženou regulaci mezi excitačními a inhibičními komponenty. Naši sportovci měli průměrné skóre NS vyšší než kontrolní skupina (106 vs. 92), což odpovídá teorii R. Cloningera (Cloninger, 1986). Ačkoli dle Obr. 13 je zřejmý rozdíl v rozptylu hodnot pro NS, ve kterých skórují sportovci a ve kterých kontrolní skupina, statistická významnost prokázána nebyla, výsledek byl pouze indikativní ($p < 0,052$) a hypotéza nemohla být s úplností potvrzena.

V naší druhé hypotéze jsme předpokládali, že existuje asociace mezi námi vybranými polymorfismy a vyšším skóre novelty seeking.

U polymorfismu TaqIA jsme očekávali, že jedinci nesoucí alelu A1 budou dosahovat vyššího skóre NS, jelikož alela A1 je spojována s až o 30 % nižší expresí D2 receptorů (Noble a kol., 1997), kdy se může navázat omezené množství dopaminu. Právě nízká hladina dopaminu je spojována s vyšším skóre NS (Cloninger, 1987). V naší studii však dosahovali vyšších hodnot skóre NS jedinci s wild-type genotypem, tedy A2A2 (Obr. 14). Byla prokázána i statistická významnost ($p < 0,027$) mezi mediány genotypů A2A2 a A2A1. Tento výsledek mohl být ovlivněn podstatně nižším celkovým výskytem alely A1 u účastníků studie (Obr. 18). Naše hypotéza, že výskyt alely A1 koreluje s vyšším skóre novelty seeking, nebyla potvrzena.

Polymorfismus –141C Ins/Del, respektive alela Del, má ve svém výsledku stejný efekt jako alela A1 polymorfismu TaqIA. Z toho byl vyvozen předpoklad, že jedinci nesoucí alelu Del budou dosahovat vyššího skóre novelty seeking. Ačkoli Arinami a kol. (1997) uvádí, že frekvence alely Del je v populaci obecně nízká, v našem souboru se vyskytovala častěji než alela A1. Jedinci s genotypem Ins/Ins dosahovali vyšších hodnot skóre NS ve srovnání s jedinci s genotypem Ins/Del (Obr. 15). Hodnoty mediánů jsou ovšem téměř stejné, statistická významnost nebyla prokázána. Hypotéza o korelaci mezi alelou Del a vyšším skóre novelty seeking se nepotvrdila.

V případě polymorfismu Val158Met, kdy alela Met snižuje degradaci dopaminu (Chen a kol., 2004), který tak působí v synaptické štěrbině déle, než má, jsme předpokládali asociaci mezi alelou Met a vyšším skóre NS. Ačkoli mediány tří genotypů se prakticky neliší a statistická významnost tedy nebyla prokázána, rozsah hodnot novelty seeking se u jednotlivých genotypů různí (Obr. 16). Jedinci s wild-type genotypem Val/Val dosahují podstatně nižších hodnot NS, než jedinci s genotypy Val/Met a Met/Met. Genotyp Val/Met má ze všech tří genotypů nejširší rozsah v hodnotách novelty seeking, vykazuje nejvyšší hodnotu, ale zároveň zasahuje i do nízkých hodnot NS. Nositelé genotypu Met/Met mají značně užší rozsah - dosahují do hodnot vyššího skóre NS a rovněž nespádají do tak nízkých hodnot, jako nositelé genotypů Val/Val a Val/Met. Navzdory těmto indikacím statistická významnost nebyla signifikantní, nemůžeme proto s jistotou potvrdit naši hypotézu.

Mezi různé faktory, které ovlivňují chování, patří pohlaví jedince a svou úlohu v tom hraje i testosteron (Sapolsky, 1993). Z tohoto důvodu jsme také porovnávali, jakých hodnot novelty seeking dosáhnou muži a jakých ženy (Obr. 17). Medián obou skupin byl téměř stejný, statistická významnost nebyla zjištěna. Zajímavý je ovšem rozsah dosahovaných hodnot skóre NS. Ženy mají značně větší rozsah hodnot NS, pohybující se od vyšších až po nízké. Jako možné vysvětlení se nabízí právě vliv testosteronu. Zatímco u mužů je hladina testosteronu více konstantní, u žen se jeho hladina často velmi liší. Hladina testosteronu může být u žen značně zvýšena v důsledku hyperandrogenismu (nadměrné tvorby mužských hormonů) nebo syndromu polycystických ovarií (Handelsman a kol., 2018). Signifikantní korelaci mezi hladinou testosteronu a chováním u žen prokázal také Kersbauch a kol. (2006). Je tedy možné, že ženy, které dosahovaly vyšších hodnot skóre NS v naší studii, měli vyšší hladinu testosteronu. Odpovídal by tomu i fakt, že skupina mužů také vykazovala rozsah do vyšších hodnot novelty seeking, ale zdaleka nedosahovala tak nízkých hodnot NS, jako ženy.

V rámci stanovení třetí hypotézy jsme předpokládali, že výskyt mutovaných alel (A1, Met, Del) vybraných polymorfismů v homozygotním nebo i heterozygotním stavu bude spíše vyšší u sportovců a schizofrenních pacientů. Zastoupení těchto alel jsme hledali v homozygotním i heterozygotním stavu (Obr. 18). Již přítomnost jedné mutované alely má značný efekt. U všech tří studovaných skupin se s nejvyšší frekvencí vyskytovala alela Met. Největší zastoupení měla ve skupině schizofrenních pacientů, pro které je výskyt alely Met typický. Neuhaus a kol. (2009) ve své studii uvádí, že u celkového počtu 111 schizofrenních pacientů byla frekvence genotypů 15,3 % Val/Val, 63,1 % Val/Met, 21,6 % Met/Met, což zdaleka neodpovídá Hardy-Weinbergově rovnováze. U alely Del se uvádí, že má obecně nízkou frekvenci (Arinami a kol., 1997) a její výskyt u schizofrenních pacientů je také nižší. Ve studii Suzuki a kol. (2001) z celkového počtu 49 pacientů mělo 71% schizofrenních pacientů genotyp Ins/Ins a 29% pacientů mělo genotyp Ins/Del, a ve studii Matsumoto a kol. (2005) se v jednom souboru vyskytovalo 28% schizofrenních pacientů s genotypem Ins/Del a 3% pacientů s genotypem Del/Del (z celkového počtu 64 pacientů) a v druhém souboru 34% pacientů s genotypem Ins/Del a 6% pacientů s genotypem Del/Del (z celkového počtu 91 pacientů). V rozporu s těmito údaji je naše studie, kde alela Del byla zjištěna s větší než 50 % frekvencí u schizofreniků i kontrolní skupiny, zatímco u sportovců to nebylo ani 20 %. Překvapivé zjištění bylo, že alela A1 má u všech souborů nejnižší a téměř stejnou frekvenci (22 % u schizofreniků a kontrolní skupiny a 27 % u sportovců), přičemž Matsumoto a kol. (2005) uvádí výskyt alely A1 u schizofreniků značně vyšší.

Jak je uvedeno výše (kapitola 5), lidské chování je výsledkem interakce různých faktorů. Není ovlivňováno pouze geneticky, ale přispívají k tomu i další faktory (rodinná výchova, pohlaví atd.). Např. Melka a kol. (2013) předpokládá, že je nezanedbatelný a významný vliv prostřední, bylo by tedy příhodné do budoucích výzkumů zahrnout i epigenetickou analýzu. Neméně důležitým bodem je pro vypracování kvalitní studie rovněž dostatečný počet respondentů. Ačkoli náš soubor ($n = 54$) není příliš velký, získané výsledky ukazují na možné rozdíly v hodnotách novelty seeking mezi jedinci, věnující se adrenalinovým/rizikantním sportům a kontrolní skupinou tvořenou jedinci, kteří nesportují vůbec, či jen příležitostně. A i když jsme předpokládali, že frekvence mutovaných alel bude značně vyšší u sportovců a schizofrenních pacientů než u kontrolní skupiny, je možné, že nositelé mutovaných alel v kontrolní skupině mohou kompenzovat tento vliv jiným způsobem, než je adrenalinové sportovní vyžití či psychiatrická porucha.

10. Závěr

V naší studii jsme zkoumali frekvenci mutovaných alel A1, Met a Del u sportovců, schizofreniků a kontrolní skupiny i vztah polymorfismů v genech *DRD2* a *COMT* s lidským chováním typu novelty seeking. O souboru našich respondentů můžeme vyvodit následující:

- Existují tři společně se vyskytující kombinace genotypů (A2A2, Val/Val; Ins/Del a Met/Met; Ins/Ins a Val/Met).
- Je prokázán indikativní, byť ne signifikantně významný rozdíl ve středních hodnotách NS u sportovců a u kontrolní skupiny, značný je rovněž rozdíl rozsahu dosahovaných hodnot u obou skupin.
- Pozitivní korelace mezi genotypy s mutovanou alelou a vyšším skóre novelty seeking nebyla prokázána.
- Vliv pohlaví na novelty seeking není signifikantní, ale rozdíl v rozsahu dosahovaných hodnot NS u mužů a žen naznačuje vliv testosteronu.
- Frekvence výskytu mutovaných alel (A1, Met, Del) není u sportovců a schizofrenních pacientů vyšší než u kontrolní skupiny.

11. Seznam použité literatury

Adler, L., Wedekind, D., Pilz, J., Weniger, G., Huether, G. (1997). Endocrine correlates of personality traits: a comparison between emotionally stable and emotionally labile healthy young men. *Neuropsychobiology*. 35 (4): 205 – 210.

Anzalone, A., Lizardi-Ortiz, J. E., Ramos, M., De Mei, C., Hopf, F. W., Iaccarino, C., Halbout, B., Jacobsen, J., Kinoshita, C., Welter, M., Caron, M. G., Bonci, A., Sulzer, D., Borrelli, E. (2012). Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Journal of Neuroscience*. 32: 9023 – 9034.

Arinami, T., Gao, M., Hamaguchi, H., Toru, M. (1997). A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*. 6 (4): 577 – 582.

Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*. 63 (1): 182 – 217.

Berman, S., Ozkaragoz, T., Young, R. M., Noble, E. P. (2002). D2 dopamine receptor gene polymorphism discriminates two kinds of novelty seeking. *Personality and Individual Differences*. 33 (6): 867 – 882.

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 24 (2): 197 – 211.

Castro, S. W., Strange, P. G. (1993). Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D2 dopamine receptor. *Journal of Neurochemistry*. 60: 372 – 375.

Cloninger, C. R. (1987)a. A systematic method for clinical description and classification of personality variants: A proposal. *Arch Gene Psychiatry*. 44 (6): 573 – 588.

- Cloninger, C. R. (1986). Unified biosocial theory of personality and its role in the development of anxiety states. *Psychiatric Developments*. 4 (3): 167 – 226.
- Comings, D. E., Rosenthal, R. J., Lesieur, H. R., Rugle, L. J., Muhleman, D., Chiu, C., Dietz, G., Gade, R. (1996). A study of the dopamine D2 receptor gene in pathological gambling. *Pharmacogenetics*. 6 (3): 223 – 234.
- Costa, V. D., Tran, V. L., Turchi, J., Averbeck, B. B. (2014). Dopamine modulates novelty seeking behavior during decision making. *Behavioral Neuroscience*. 128 (5): 556 – 566.
- Craddock, N., Owen, M. J., O'Donovan, M. C. (2006). The catechol-*O*-methyl transferase (*COMT*) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Molecular Psychiatry*. 11 (5): 446 – 458.
- Dawes, T. Ch., Fowler, J. H. (2009). Partishanship, voting and dopamine D2 receptor gene. *The Journal of Politics*. 71 (3): 1157 – 1171.
- De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., Borrelli, E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology*. 9 (1): 53 – 58.
- Enoch, M. A., Xu, K., Ferro, E., Harris, C. R., Goldman, D. A. (2003). Genetic origins of anxiety in women: a role for a functional catechol-*o*-methyltransferase polymorphism. *Psychiatric Genetics*. 13 (1): 33 – 41.
- Farrell, S. M., Tunbridge, E. M., Braeutigam, S., Harrison, P. J. (2012). *COMT Val158Met Genotype Determines the Direction of Cognitive Effects Produced by Catechol-*O*-Methyltransferase Inhibition*. *Biological Psychiatry*. 71 (6): 538 – 544.
- Ferrazzoli, D., Carter, A., Ustun, F. S., Palamara, G., Ortelli, P., Maestri, R., Yucel, M., Frazzitta, G. (2016). Dopamine Replacement Therapy, Learning and Reward Prediction in Parkinson's Disease: Implications for Rehabilitation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 10: 121.

Ford, Ch. P. (2014). The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*. 282: 13 – 22.

Fulton, S., Thibault, D., Mendez, J. A., Lahaie, N., Tirota, E., Borrelli, E., Bouvier, M., Tempel, B. L., Trudeau, L. E. (2011). Contribution of Kv1.2 voltage-gated potassium channel to D2 autoreceptor regulation of axonal dopamine overflow. *The Journal of biological chemistry*. 286 (11): 9360 – 9372.

Gingrich, J. A., Caron, M. G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annual Review of Neuroscience*. 16: 299 – 321.

Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M. P., Riou, J. F., Emorine, L. J., Schwartz, J. C. (1989). Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature*. 342: 923 – 926.

Gluskin, B. S., Mickey, B. J. (2016). Genetic variation and dopamine D2 receptor availability: a systematic review and meta-analysis of human in vivo molecular imaging studies. *Translational Psychiatry*. 6 (3): e747.

Gowrishankar, R., Hahn, M. K., Blakely, R. D. (2014). Good riddance to dopamine: roles for dopamine transporter in synaptic function and dopamine-associated brain disorders. *Neurochemistry International*. 73: 42 – 48.

Grandy, D. K., Litt, M., Allen, L., Bunzow, J. R., Marchionni, M., Makam, H., Reed, L., Magenis, R. E., Civelli, O. (1989.) The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *The American Journal of Human Genetics*. 45 (5): 778 – 785.

Grandy, D. K., Zhang, Y. A., Bouvier, C., Zhou, Q. Y., Johnson, R. A., Allen, L., Buck, K., Bunzow, J. R., Salon, J., Civelli, O. (1991) Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88 (20): 9175 – 9179.

- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*. 294: 1024 – 1030.
- Handelsman, D. J., Hirschberg, A. L., Bermon, S. (2018). Circulating Testosterone as the Hormonal Basis of Sex Differences in Athletic Performance. *Endocrine Reviews*. 39 (5): 803 – 829.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L., Masliah, E. (2003). Role of Protein Aggregation in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Neuromolecular Medicine*. 4 (1–2): 21 – 36.
- Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., Catterall, W. A. (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 380: 258 – 262.
- Hernández, F., Avila, J. (2007). Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64 (17): 2219 – 2233.
- Hooper, N. M. (2005). Roles of Proteolysis and Lipid Rafts in the Processing of the Amyloid Precursor Protein and Prion Protein. *Biochemical Society Transactions*. 33 (2): 335 – 338.
- Hosák, L., Libiger, J., Čížek, J., Beránek, M., Čermáková, E. (2006). The COMT Val158Met polymorphism is associated with novelty seeking in Czech methamphetamine abusers: preliminary results. *Neuroendocrinology Letters*; 27 (6): 799 – 802.
- Huang, H. Y., Lee, I. H., Chen, K. C., Yeh, T. L., Chen, P. S., Yang, Y. K., Chiu, N. T., Yao, W. J., Chen, C. C. (2010). Association of novelty seeking scores and striatal dopamine D₂/D₃ receptor availability of healthy volunteers: single photon emission computed tomography with 123i-iodobenzamide. *Journal of the Formosan Medical Association*. 109 (10): 736 – 739.

Huotari, M., Santha, M., Lucas, L. R., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., Mannisto, P. T. (2002). Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyltransferase-disrupted mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 303 (3): 1309 – 1316.

Chen, J., Lipska, B. K., Halim, N., Ma, Q. D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B. S., Hyde, T. M., Herman, M. M., Apud, J., Egan, M. F., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R. (2004). Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *American Journal of Human Genetics*. 75 (5): 807 – 821.

Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neuroscience & Biobehavioral reviews*. 35 (2): 129 – 150.

Ishiguro, H., Arinami, T., Saito, T., Akazawa, S., Enomoto, M., Mitushio, H., Fujishiro, H., Tada, K., Akimoto, Y., Mifune, H., Shioduka, S., Hamaguchi, H., Toru, M., Shibuya, H. (1998). Association study between the -141C Ins/Del and TaqI A polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 22 (4): 845 – 848.

Jang, J. Y., Jang, M., Kim, S. H., Um, K. B., Kang, Y. K., Kim, H. J., Chung, S., Park, M. K. (2011). Regulation of dopaminergic neuron firing by heterogeneous dopamine autoreceptors in the substantia nigra pars compacta. *Journal of Neurochemistry*. 116 (6): 966 – 974.

Jankovic, J. (2005). Progression of Parkinson disease: Are we making progress in charting the course? *Archives of Neurology*. 62 (3): 351 – 352.

Jeffery, D. R., Roth, J. A. (1984). Characterization of membrane-bound and soluble catechol-O-methyltransferase from human frontal cortex. *Journal of Neurochemistry*. 42 (3): 826 – 832.

Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R. M., Caron, M. G. (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95 (7): 4029 – 4034.

- Jones, H. M., Pilowsky, L. S. (2002). Dopamine and antipsychotic drug action revisited. *British Journal of Psychiatry*. 181: 271 – 275.
- Jönsson, E. G., Nöthen, M. M., Neidt, H., Forslund, K., Rylander, G., Mattila-Evenden, M., Asberg, M., Propping, P., Sedvall, G. C. (1999). Association between a promoter polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 40 (1): 31 – 36.
- Keltikangas-Järvinen, L., Räikkönen, K., Ekelund, J., Peltonen, L. (2004). Nature and nurture in novelty seeking. *Molecular Psychiatry*. 9 (3): 308 – 311.
- Kerschbaum, H. H., Ruemer, M., Weisshuhn, S., Klimesch, W. (2006). Gender-dependent differences in sensation seeking and social interaction are correlated with saliva testosterone titre in adolescents. *Neuroendocrinology Letters*. 27 (3): 315 – 320.
- Khan, Z. U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., de la Calle, A., Goldman-Rakic, P. S. (1998). Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95 (13): 7731 – 7736.
- Kinon, B. J., Gilmore, J. A., Liu, H., Halbreich, U. M. (2003)b. Hyperprolactinemia in response to antipsychotic drugs: characterization across comparative clinical trials. *Psychoneuroendocrinology*. 28 (Suppl 2): 69 – 82.
- Konishi, T., Luo, H. R., Calvillo, M., Mayo, M. S., Lin, K. M., Wan, Y. J. (2004). ADH1B*1, ADH1C*2, DRD2 (-141C Ins), and 5-HTTLPR are associated with alcoholism in Mexican American men living in Los Angeles. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 28 (8): 1145 – 1152.
- 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.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C. H., Gil, R., D'Souza, C. D., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S. S., Baldwin, R. M., Seibyl, J. P., Krystal, J. H., Charney, D. S., Innis, R. B. (1996). Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (17): 9235 – 9240.

Linnet, J., Møller, A., Peterson, E., Gjedde, A., Doudet, D. (2011). Dopamine release in ventral striatum during Iowa Gambling Task performance is associated with increased excitement levels in pathological gambling. *Addiction*. 106 (2): 383 – 390.

Ludwig, M., Apps, D., Menzies, J., Patel, J. C., Rice, M. E. (2016). Dendritic release of neurotransmitters. *Comprehensive Physiology*. 7 (1): 235 – 252.

Magro, F., Cunha, E., Araujo, F., Meireles, E., Pereira, P., Dinis-Ribeiro, M., Tavarella, Veloso, F., Medeiros, R., Soares-da-Silva, P. (2006). Dopamine D2 Receptor Polymorphisms in Inflammatory Bowel Disease and the Refractory Response to Treatment. *Digestive Diseases and Sciences*. 51: 2039 – 2044.

Malenka, R. C., Nestler, E. J., Hyman, S. E. (2009). Chapter 6: Widely Projecting Systems: Monoamines, Acetylcholine, and Orexin. In Sydor A, Brown RY. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill Medical. pp. 147–148, 154–157. ISBN 9780071481274.

Malenka, R. C., Nestler, E. J., Hyman, S. E. (2009). Chapter 10: Neural and Neuroendocrine Control of the Internal Milieu. In Sydor A, Brown RY. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill Medical. p. 249. ISBN 9780071481274.

Malmberg, A., Jackson, D. M., Eriksson, A., Mohell, N. (1993). Unique binding characteristics of antipsychotic agents interacting with human dopamine D2A, D2B, and D3 receptors. *Molecular Pharmacology*. 43 (5): 749 – 754.

- Matsumoto, Ch., Shinkai, T., De Luca, V., Hwang, R., Hori, H., Lanktree, M., Ohmori, O., Kennedy, J. L., Nakamura, J. (2005). Association between three functional polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and polydipsia in schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 8: 245 – 253.
- Meiser, J., Weindl, D., Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*. 11 (1): 34.
- Melka, M. G., Castellani, C. A., Laufer, B. I., Rajakumar, R. N., O'Reilly, R., Singh, S. M. (2013). Olanzapine induced DNA methylation changes support the dopamine hypothesis of psychosis. *Journal of Molecular Psychiatry*. 1 (1): 19.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*. 78 (1): 189 – 225.
- Money, K. M., Stanwood, G. D. (2013). Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7: 260 – 277.
- Monsma, F. J. Jr., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., Mahan, L. C., Sibley, D. R. (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*. 342: 926 – 929.
- Montmayeur, J. P., Borrelli, E. (1991). Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D2 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (8): 3135 – 3139.
- Moore, H., West, A. R., Grace, A. A. (1999). The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 46 (1): 40 – 55.
- Mujica-Parodi, L. R., Carlson, J. M., Cha, J., Rubin, D. (2014). The fine line between 'brave' and 'reckless': amygdala reactivity and regulation predict recognition of risk. *NeuroImage*. 103: 1 – 9.

Nacak, M., Isir, A. B., Balci, S. O., Pehlivan, S., Benlier, N., Aynacioglu, S. (2012). Analysis of Dopamine D2 Receptor (DRD2) Gene Polymorphisms in Cannabinoid Addicts. *Journal of Forensics Sciences*. 57 (6): 1621 – 1624.

Neuhaus, A. H., Opgen-Rhein, C., Urbanek, C., Hahn, E., Ta, T. M., Seidelsohn, M., Strathmann, S., Kley, F., Wieseke, N., Sander, T., Dettling, M. (2009). COMT Val 158 Met polymorphism is associated with cognitive flexibility in a signal discrimination task in schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*. 42 (4): 141 – 144.

Neve, K. A., Neve, R. L. (1997). Molecular biology of dopamine receptors. In: Neve, K. A., Neve, R. L., eds. *The Dopamine Receptors*. Totawa, NJ: *Humana Press*: 27 – 76.

Neve, K. A. (2010). *The Dopamine Receptors* (ed.). 2nd ed. Portland, USA: *Humana Press*. ISBN 9781603273329.

Neve, K. A., Ford, C. P., Buck, D. C., Grandy, D. K., Neve, R. L., Phillips, T. J. (2013). Normalizing dopamine D2 receptor-mediated responses in D2 null mutant mice by virus-mediated receptor restoration: Comparing D2 and D2. *Neuroscience*. 248: 479 – 487.

Neville, M. J., Johnstone, E. C., Walton, R. T. (2004). Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Human Mutation*. 23 (6): 540–545.

Noble, E.P., Gottschalk, L.A., Fallon, J.H., Ritchie, T.L., Wu, J.C. (1997). D2 dopamine receptor polymorphism and brain regional glucose metabolism. *American Journal of Medical Genetics*. 74 (2): 162–166.

Oswald, L. M., Wand, G. S., Wong, D. F., Brown, C. H., Kuwabara, H., Brašić, J. R. (2015). Risky decision-making and ventral striatal dopamine responses to amphetamine: A positron emission tomography [11C] raclopride study in healthy adults. *Neuroimage*. 113: 26 – 36.

Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H. J., Mouritzen Dam, A., Pakkenberg, H. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 54 (1): 30 – 33.

Park, Y. M., Kang, S. G., Choi, J. E., Kim, J. K., Kim, S. H., Park, J. Y., Kim, L., Lee, H. J. (2011). No Evidence for an Association between Dopamine D2 Receptor Polymorphisms and Tardive Dyskinesia in Korean Schizophrenia Patients. *Psychiatry Investigation*. 8 (1): 49 – 54.

Pečeňák, J. (2014). Symptomatika schizofrénie: Schizofrénia – koncepty, symptómy, diagnostické kritériá. Bratislava: *Univerzita Komenského v Bratislave*.: pp. 20-23. ISBN 9788022335409.

Phillips, P. E., Hancock, P. J., Stamford, J. A. (2002). Time window of autoreceptor-mediated inhibition of limbic and striatal dopamine release. *Synapse*. 44 (1): 15 – 22.

Polgar, M. (2017). The impact of “dopamine genes” polymorphisms on novelty seeking behavior. *Diplomová práce*. Karlova univerzita v Praze. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. Ing. Alexander Popkov, Ph.D.

Priller, C. H., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., Herms, J. (2006). Synapse Formation and Function is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*. 26 (27): 7212 – 7221.

Rankin, M. L., Hazelwood, L. A., Free, R. B., Namkung, Y., Rex, E. B., Roof, R. A., Sibley, D. R. (2010). Molecular pharmacology of the dopamine receptors, in *Dopamine Handbook DOPAMINE RECEPTORS* 215 (Iversen, L. L., Dunnett, S.B. , Iversen, S.D., Bjorklund, A. ed) pp 63–87, *Oxford University*. Press, New York. e-ISBN: 9780199865543.

Rondou, P., Haegeman, G., Van Craenenbroeck, K. (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67 (12): 1971 – 1986.

Rujescu, D., Giegling, I., Gietl, A., Hartmann, A. M., Moller, M. J. (2003). A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biological Psychiatry*. 54 (1): 34 – 39.

Sapolsky, R. M. The physiology of dominance in stable versus un-stable social hierarchies. In: Mason, W.A. and Mendoza, S.P., editors. (1993). *Primate and Social Conflict*, State University of New York. Press, Albany, New York, pp. 171–204.

Savitz, J., Frank, M. B., Victor, T., Bebak, M., Marino, J. H., Bellgowan, P. S., McKinney, B. A., Bodurka, J., Kent Teague, T., Drevets, W. C. (2013). Inflammation and neurological disease-related genes are differentially expressed in depressed patients with mood disorders and correlate with morphometric and functional imaging abnormalities. *Brain, Behavior and Immunity*. 31: 161 – 171.

Seeman, P. (2006). Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 10 (4): 515 – 531.

Schacht, J. P. (2016). COMT val158met moderation of dopaminergic drug effects on cognitive function: A critical review. *Pharmacogenomics Journal*. 16 (5): 430 – 438.

Schatzberg, A. F., Nemeroff, C. B. (2004). *Textbook of Psychopharmacology*. 3rd edition (Eds). Washington, D.C.: *American Psychiatric Publishing*: 6 – 87. ISBN 1585620602.

Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience*. 30: 259 – 288.

Sokoloff, P., Diaz, J., Le Foll, B., Guillin, O., Leriche, L., Bezard, E., Gross, C. (2006). The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurological Disorders- Drug Targets*. 5 (1): 25 – 43.

Sonders, M. S., Zhu, S. J., Zahniser, N. R., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. (1997). Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *Journal of Neuroscience*. 17 (3): 960 – 974.

Spano, P. F., Govoni, S., Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*; 19: 155 – 165.

Svrakic, D. M., Cloninger, R. C. (2010). Epigenetic Perspective on Behavior Development, Personality, and Personality Disorders. *Psychiatria Danubina*. 22 (2): 153 – 166.

Suzuki, A., Kondo, T., Mihara, K., Yasui-Furukori, N., Ishida, M., Furukori, H., Kaneko, S., Inoue, Y., Otani, K.. (2001). The -141C Ins/Del polymorphism in the dopamine D2 receptor gene promoter region is associated with anxiolytic and antidepressive effects during treatment with dopamine antagonists in schizophrenic patients. *Pharmacogenetics*. 11 (6): 545 – 550.

Tahara, T., Shibata, T., Arisawa, T., Nakamura, M., Yamashita, H., Yoshioka, D., Okubo, M., Maruyama, N., Kamono, 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.

Tenhunen, J., Salminen, M., Lundstrom, 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.

Tiraboschi, T., Hansen, L. A., Thal, L. J., Corey-Bloom, J. (2004). The Importance of Neuritic Plaques and Tangles to the Development and Evolution of AD. *Neurology*. 62 (11): 1984 – 1989.

Torres, G. E. (2006). The dopamine transporter proteome. *Journal of Neurochemistry*. 97 (Suppl. 1): 3 – 10.

Torres, G. E., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature Reviews Neuroscience*. 4 (1): 13 – 25.

- Trudell, M. L., Izenwasser, S. (2008) Dopamine Transporters: Chemistry, Biology, and Pharmacology. New Jersey: *John Wiley & Sons*. 4 – 62. ISBN 9780470117903.
- Truong, J. G., Newman, A. H., Hanson, G. R., Fleckenstein, A. E. (2004). Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *European journal of pharmacology*. 504: 27 – 32.
- Tunbridge, E. M., Bannerman, D. M., Sharp, T., Harrison, P. J. (2004). Catechol-O-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. 24 (23): 5331 – 5335.
- Usiello, A., Baik, J. H., Rouge'-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P. V., Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 408: 199 – 203.
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic Changes in Alzheimer's Disease. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 64 (Suppl. 9): 7 – 10.
- Wingo, T., Nesil, T., Choi J. S., Li, M. D. (2016). Novelty seeking and drug addiction in humans and animals: from behavior to molecules. *Journal of NeuroImmune Pharmacology*. 11 (3): 456 – 470.
- Witkovsky, P., Patel, J. C., Lee, C. R., Rice, M.E. (2009). Immunocytochemical identification of proteins involved in dopamine release from the somatodendritic compartment of nigral dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 164 (2): 488 – 496.
- Wolf, M. E., Roth, R. H. (1990). Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Annals of the New York Academy of Science*. 604: 323 – 343.
- Zahari, Z., Salleh, M. R., Zahri-Johari M. K., Musa, N., Ismail, R. (2011). A Nested Allele-Specific Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of DRD2 Polymorphisms. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 18 (4): 44 – 57.

Zald, D. H., Cowan, R. L., Riccardi, P., Baldwin, R. M., Ansari, M. S., Li, R., Shelby, E. S., Smith, C. E., McHugo, M., Kessler, R. M. (2008). Midbrain dopamine receptor availability is inversely associated with novelty-seeking traits in humans. *Journal of Neuroscience*. 28 (53): 14372 – 14378.

Zuckerman, M. (1979). *Sensation Seeking: Beyond the optimal level of arousal*. Hillsdale, New Jersey: *Lawrence Erlbaum Associates*. ISBN 9781848724693.

Zuckerman, M. (1995). Good and bad humours: Biochemical bases of personality and its disorders. *Psychological Science*. 6 (6): 325 – 332.

Zuckerman, M, Cloninger, C. R. (1996). NOTES AND SHORTER COMMUNICATIONS. Relationships between Cloninger's, Zuckerman's, and Eysenck's dimensions of personality. *Personality and Individual Differences*. 21 (2): 283 – 285.

Příloha 1

Genlabs s.r.o.
Poliklinika Medipont
Matice školské 1786/17
370 07 České Budějovice



Souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením

Jméno a příjmení vyšetřované/ho:.....

Rodné číslo:.....

Jméno a příjmení zákonného zástupce:.....

Vztah k vyšetřované osobě:.....

A. Účel genetického laboratorního vyšetření

- Ověření/potvrzení diagnózy nemoci a/nebo vývojové vady:.....
- Zjištění predispozice pro nemoc a/nebo vývojovou vadu:.....
- Zjištění přenašečství pro nemoc a/nebo vývojovou vadu:.....
- K optimalizaci léčby:.....

Alternativy navrhovaného genetického vyšetření (jejich vhodnost, přínos a rizika):
.....

B. PROHLÁŠENÍ VYŠETŘOVANÉ OSOBY

B. 1. Za výše uvedeným účelem souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku z mého těla a s provedením těchto vyšetření:

Cytogenetická vyšetření:

- Karyotyp (analýza chromosomů)
- Jiné.....

Molekulárně genetická vyšetření:

- Vyšetření pro chorobu:.....
- Jiné.....

Jiná vyšetření:

-

Ze vzorku:

- žilní krev sliny tkáň: kůže, sval
- Jiné.....

B. 2. Souhlas vyšetřované osoby/zákonného zástupce:

Potvrzuji, že mi bylo poskytnuto poradenství ke genetickému laboratornímu vyšetření za účelem jak uvedeno shora a že jsem poskytnuté informace porozuměl/a. Lékařem mi bylo sděleno a vysvětleno následující:

- Účel, povaha, předpokládaný přínos genetického laboratorního vyšetření
- Možný dopad výsledků genetického vyšetření na mé zdraví, na zdraví mých potomků (budoucích generací) a zdraví geneticky příbuzných osob
- Rizika neočekávaných nálezů, což jsou nálezy, které nejsou účelem genetického laboratorního vyšetření, přesto je analýza genetické informace zjistí. Neočekávané nálezy lze rozdělit na skupinu nálezů, které mohou mít pro pacienta a osoby s ním geneticky příbuzné závažný dopad (např. zvýšená náchylnost k nádorovým onemocněním nebo nepotvrzení otcovství). Druhou skupinou jsou nálezy, které se odlišují nálezů běžných, ale jejich konkrétní dopad na současný a/nebo budoucí zdravotní stav pacienta a geneticky příbuzné osoby nelze na základě současných znalostí stanovit.

Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékařem zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

B. 3. Rozhodl/a jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

Souhlas se skladováním

Pokud to bude možné a/nebo účelné, bude můj vzorek skladován pro další vyšetření provedená k mému prospěchu a prospěchu mých příbuzných. Před genetickým vyšetřením, které by se provádělo za jinými účely než uvedeno v části A., budu řádně poučen/a a toto vyšetření bude vždy provedeno až s novým informovaným souhlasem. Vzorek bude skladován u poskytovatele zdravotních služeb uvedeného v záhlaví nebo v laboratoři spolupracujícího poskytovatele a to nejvýše po dobu 50 let.

- Jestliže bude vzorek mého biologického materiálu dále skladován, **souhlasím/nesouhlasím** s jeho využitím ke kontrole kvality DNA diagnostiky (vzorek je použit jako kontrola pro vyšetření jiného pacienta).
- **Souhlasím/nesouhlasím*** s anonymním využitím skladovaného biologického materiálu v lékařském výzkumu dědičných onemocnění.
- **Souhlasím/nesouhlasím*** s tím, že mohu být znovu kontaktován/a, na adrese uvedené ve zdravotnické dokumentaci, za účelem souhlasu s využitím mého skladovaného biologického materiálu v konkrétním výzkumném projektu.

Nesouhlas se skladováním

Můj vzorek bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a že zlikvidování vzorku může vést ke zhoršení dostupnosti diagnostiky u rodinných příslušníků. Dále jsem si vědom, že pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.

B. 4. Dále si přeji následující:

- Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření : **byl(a) / nebyl(a) seznámen(a)***
- Abych s výsledky neočekávaných nálezů **byl(a)/nebyl(a) seznámen(a) ***
- Aby o výsledcích vyšetření **a/nebo neočekávaných nálezech*** byly informovány následující osoby:
.....
- **Souhlasím/ nesouhlasím*** s využitím výsledků genetického laboratorního vyšetření a relevantních informací o mém zdravotním stavu, včetně fotodokumentace, k vědeckým a výukovým účelům za podmínky, že tyto údaje budou prezentovány a publikovány pouze v anonymní formě.

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami uvedenými výše. Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoliv písemně odvolat.

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce)

V Dne

Jméno lékaře:

Podpis: