

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Biologie  
Antropologie a genetika člověka



Bc. Anežka Tomášková

**Prenatální expozice metamfetaminu a její vliv na genovou expresi ve vybraných  
částech mozku pokusného potkana.**

Prenatal exposure to methamphetamine and its effect the gene expression in the selected  
parts of the brains of experimental rats.

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: RNDr. Hana Zoubková, Ph.D.

Konzultant práce: prof. MUDr. Marie Černá, CSc.

Praha, 2017

## **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Zoubkové, Ph. D. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady a připomínky. Rovněž děkuji prof. MUDr. Marii Černé, CSc. za veškerou pomoc a možnost vypracování diplomové práce na Ústavu lékařské genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a všem kolegům za přínosné konzultace. Práce vznikla za podpory z grantového projektu GA ČR: 14-03708S.

## **Prohlášení:**

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

V Praze, dne 5. 8. 2017

---

## **Abstrakt:**

**Úvod:** Metamfetamin je droga často zneužívaná těhotnými ženami závislými na drogách a je současně jednou z nejčastěji užívaných drog v České republice. Tato droga prochází snadno placentární bariérou do organismu plodu a může negativně ovlivňovat nejen matku, ale i prenatální vývoj plodu.

**Cíle:** V rámci grantového projektu GA ČR: 14-03708S byly zjišťovány dlouhodobé účinky prenatální expozice metamfetaminu. Bylo zkoumáno, zda prenatální expozice metamfetaminem ovlivňuje generaci potomků exponovaných samic na úrovni exprese genů ve specifických oblastech mozku, a to ve striatu, hipokampu a prefrontálním kortexu.

**Metody:** Potkanům byly odebírány vybrané části mozku a v těch byly metodou microarray hybridizace a real-time PCR stanoveny změny exprese vybraných genů.

**Výsledky:** V rámci statistického vyhodnocení microarray hybridizace nevyšla změněná exprese u žádného z testovaných genů signifikantně. Byly naměřeny pouze hraniční hodnoty pro 13 genů, které byly dále testovány metodou real-time PCR. Po statistickém vyhodnocení real-time PCR byla signifikantně změněná exprese nalezena u 2 genů vztaženým ku jedné ze dvou endogenních kontrol. Signifikantně zvýšená genová exprese u genu DRD3 a TACR3 byla nalezena ve striatu, v dalších částech mozku změna exprese nalezena nebyla. U genu FOXP2 byly naměřeny hraniční hodnoty pro sníženou genovou expresi pouze v prefrontálním kortexu. Usuzujeme, že prenatální expozice drogou bez stresové zátěže potomka nevede k významným změnám genové exprese ve specifických oblastech mozku dospělého potomstva. Tento projekt by mohl přispět k lepšímu pochopení vlivu metamfetaminu na vyvíjející se mozek plodu a lépe porozumět možným neuropsychologickým vlivům na dítě prenatálně vystavené metamfetaminu.

**Klíčová slova:** Metamfetamin, striatum, prefrontální kortex, hipokampus, prenatální expozice, mikroarrays, real-time PCR

## **Abstract:**

**Introduction:** Methamphetamine is a drug frequently abused by drug-addicted pregnant women and also one of the most commonly used drugs in the Czech Republic. This drug passes easily through a placental barrier into the fetus. Thus it can negatively affect not only the mother but also the prenatal development of her offspring.

**Objectives:** In the framework of the grant project GA CR: 14-03708S, the long-term effects of prenatal exposure to methamphetamine were detected. It was determined whether the prenatal methamphetamine exposure affects the generation of offspring of exposed females at the level of gene expression of genes in specific regions of the brain, striatum, hippocampus and prefrontal cortex.

**Methods:** In the selected parts of the brain, which were removed from the rat, the microarray hybridization and the real-time PCR to express changes in expression of selected genes were performed.

**Results:** Statistical analysis of microarray hybridization did not show the significantly altered gene expression in tested genes significantly. Only boundary values for 13 genes were measured, which were further tested by real-time PCR. After a statistic evaluation of real-time PCR, the significantly altered expression was found in 2 genes. The significantly changed expression of DRD3 and TACR3 genes was found only in the striatum, but not in other parts of the brain. For FOXP2 gene, the threshold value of reduced gene expression in the prefrontal cortex was measured. We summarize that prenatal exposure to drug without stress load of descendant does not lead to the significant changes of gene expression in specific regions of the brain of adult offspring. This project could contribute to better understanding of the effect of methamphetamine on the developing brain of the fetus and could better understand the possible neuropsychological effects on a child, prenatally exposed to methamphetamine.

**Key words:** Metamphetamine, striatum, prefrontal cortex, hippocampus, prenatal exposition, microarrays, real-time PCR

## Seznam zkratek

°C	-	stupeň Celsia
µg	-	mikrogram
µl	-	mikrolitr
atd.	-	a tak dále
ADHD	-	poruchy pozornosti spojené s hyperaktivitou (z anglického <i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i> )
ANOVA	-	analýza rozptylu (z anglického <i>Analysis of variance</i> )
cca	-	circa
cDNA	-	complementární DNA
CNS	-	centrální nervová soustava
COMT	-	katechol-O-metyltransferázou
C <sub>t</sub>	-	cyklus prahu (z anglického <i>threshold</i> )
ČR	-	Česká republika
DMT	-	dimethyltryptamin
DNA	-	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	-	kyselina ethylendiamintetraoctovou
et al.	-	a jiní
FN	-	fakultní nemocnice
GA	-	grantová agentura
Gpi	-	globulus pallidus internum
GPe	-	globulus pallidus externum
HT	-	hydroxytryptamin
hod	-	hodina
IUGR	-	intrauterinní růstová retardace
IQ	-	Intelligenční kvocient
LSD	-	diethylamid kyseliny lysergové
MA	-	metamfetamin
MAO	-	monoaminoxidáza
MDMA	-	Metylen-dioxy-metamfetamin (extáze)
ml	-	mililitr
mRNA	-	mediátorová ribonukleová kyselina
NA	-	noradrenalin
např.	-	například

Obr.	-	obrázek
PCR	-	polymerázová řetězová reakce (z anglického <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
resp.	-	respektive
RNA	-	ribonukleová kyselina
ROS	-	Reaktivní formy kyslíku (z anglického <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rRNA	-	ribosomální ribonukleová kyselina
SAL	-	kontrolní skupina potkanů
s.c.	-	podkožně (sub cutánně)
SNc	-	substantiae nigrae pars compacta
SNr	-	substantiae nigrae pars reticulata
STN	-	nukleus subthalamicus
Tab.	-	tabulka
THC	-	tetrahydrocanabidol
tj.	-	to je
tRNA	-	transferová ribonukleová kyselina
tzv.	-	takzvaně
ÚZIS	-	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	-	Světová zdravotnická organizace (z anglického <i>World health organization</i> )

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>3</b>
3.1	NÁVYKOVÉ LÁTKY .....	3
3.1.1	<i>Pohled na drogovou situaci v ČR.....</i>	3
3.1.2	<i>Drogy a drogová závislost .....</i>	5
3.1.2.1	Třídění podle účinků na uživatele.....	7
3.1.2.2	Podle Mezinárodní klasifikace nemocí.....	9
3.1.3	<i>Vznik závislosti .....</i>	12
3.1.4	<i>Fáze drogové závislosti .....</i>	13
3.1.4.1	Experimentální užívání.....	13
3.1.4.2	Sociální užívání.....	13
3.1.4.3	Každodenní užívání.....	14
3.1.4.4	Užívání k dosažení normálu.....	14
3.1.5	<i>Léčba drogové závislosti .....</i>	15
3.2	STIMULAČNÍ DROGY.....	16
3.2.1	<i>Charakteristika skupiny a obecný mechanismus účinku.....</i>	16
3.2.2	<i>Metamfetamin.....</i>	17
3.2.2.1	Metamfetamin: droga těhotných závislých žen.....	19
3.2.2.2	Metamfetamin: prenatálně ovlivněné děti.....	21
3.3	TESTOVANÉ ČÁSTI MOZKU .....	25
3.3.1	<i>Striatum .....</i>	29
3.3.2	<i>Prefrontální kortex .....</i>	31
3.3.3	<i>Hipokampus .....</i>	32
3.4	TESTOVANÉ GENY A ENDOGENNÍ KONTROLY .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIÁL .....</b>	<b>38</b>
4.1	ZVÍŘATA A CHOV.....	40
4.2	PODÁVÁNÍ DROGY A EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY.....	41
4.3	PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA, POMŮCKY A PROGRAMY .....	42
4.4	CHEMIKÁLIE, REAKTENTY A KITY.....	43
<b>5</b>	<b>METODIKA PRÁCE .....</b>	<b>44</b>
5.1	IZOLACE RNA.....	44
5.1.2	<i>Vlastní postup .....</i>	44
5.2	ÚPRAVA VZORKU PRO METODU DNA MICROARRAY HYBRIDIZACE A REAL-TIME PCR.....	46
5.2.1	<i>Postup čištění vzorku vysrážením .....</i>	46
5.2.2	<i>Přečištění vzorku DNázou.....</i>	47
5.2.3	<i>Reverzní transkripce .....</i>	48
5.3	GENOTYPIZACE VZORKU METODOU MICRO-ARRAY HYBRIDIZACE.....	49
5.3.1	<i>Analýza rozptylu.....</i>	49
5.4	MĚŘENÍ GENOVÉ EXPRESE METODOU REAL-TIME PCR.....	50



5.4.1	Postup real-time PCR amplifikace.....	51
5.4.2	Kvantifikace genové exprese.....	52
5.4.3	Statistické vyhodnocení metody real-time PCR.....	52
5.4.3.1	Metoda kvantifikace s kalkulací efektivity PCR.....	53
5.4.3.2	Mann-Whitneyův U test.....	54
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY S DOKUMENTACÍ.....</b>	<b>55</b>
6.1	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ GENU <i>DRD3</i> .....	56
6.2	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ GENU <i>TACR3</i> .....	62
6.3	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ GENU <i>FOXP2</i> .....	68
<b>7</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>77</b>

# 1 Úvod

Metamfetamin (MA) se jako psychostimulující droga stala v posledních letech vážným problémem (Lindsay et al., 2013; Griffiths et al., 2008; Hanson et al., 2004). Je jednou z nejrozšířenějších zneužívaných psychostimulancií po celém světě (Běláčková et al., 2012; Vavříková et al., 2001b; Marwick, 2000). Nejčastější užitou nekonopnou drogou u nás byla v roce 2008 extáze, následovaly halucinogenní houby, LSD, pervitin, kokain a nakonec heroin. Prevalence užití všech návykových látek byly nejvyšší ve věkové kategorii 15–34 let (Běláčková et al., 2012). Přibližně 66 % drogově závislých v České republice (ČR) (z registrovaných mužů a žen) užívá MA jako drogu první volby. V 85 % případů jsou ženy závislé na MA nezaměstnané (Vavříková et al., 2001a). Kromě toho, téměř polovina závislých žen přešla z jiné drogy na užívání MA v průběhu těhotenství (Marwick, 2000). Důvodem bývá jednak jeho nižší cena oproti např. heroinu či kokainu a také jeho budivý a anorektický efekt (Carvalho, 2012). Psychostimulancia, typu amfetamin (AM) a jeho syntetický derivát MA, vyvolávají v malých dávkách u lidí pocit pohody a štěstí, potlačují negativní afektivní stavy, jako je úzkost a deprese (Macůchová et al., 2014; Nesse et al., 1997). Při dlouhodobém užívání MA napodobuje mnoho příznaků mánie a může vést až k rozvoji psychózy (Shilling et al., 2006). MA je také často užíván pro svůj anorektický efekt, jednoduchou přípravu a v porovnání s heroinem nebo kokainem i nízkou cenu (Carvalho, 2012). Mezi jednotlivci existují značné rozdíly v citlivosti uživatelů na stimulancia. Reakce na MA interindividuálně kolísá (Alessi et al., 2003). Molekulární mechanismy, související s různou odezvou jednotlivce v reakci na MA, mohou být vysvětlením vzniku vzrůstající závislosti, bipolární poruchy i psychózy. V současné době máme u člověka k dispozici pouze kusé informace z oblasti genetických mechanismů vzniku těchto poruch a z oblasti přenosu drogové závislosti. Proto jsou zvířecí modely drogové závislosti důležitým zdrojem informací a cenným přínosem ve výzkumu této problematiky (Shilling et al., 2006).

## 2 Cíle práce

V rámci projektu Grantové agentury České republiky (GA ČR): 14-03708S byly zjišťovány dlouhodobé účinky prenatální expozice metamfetaminu. Bylo zkoumáno, zda prenatální expozice MA ovlivňuje generaci potomků exponovaných samic na úrovni exprese genů ve specifických oblastech mozku (ve striatu, hipokampu a prefrontálním kortexu). Tato práce si klade za cíl:

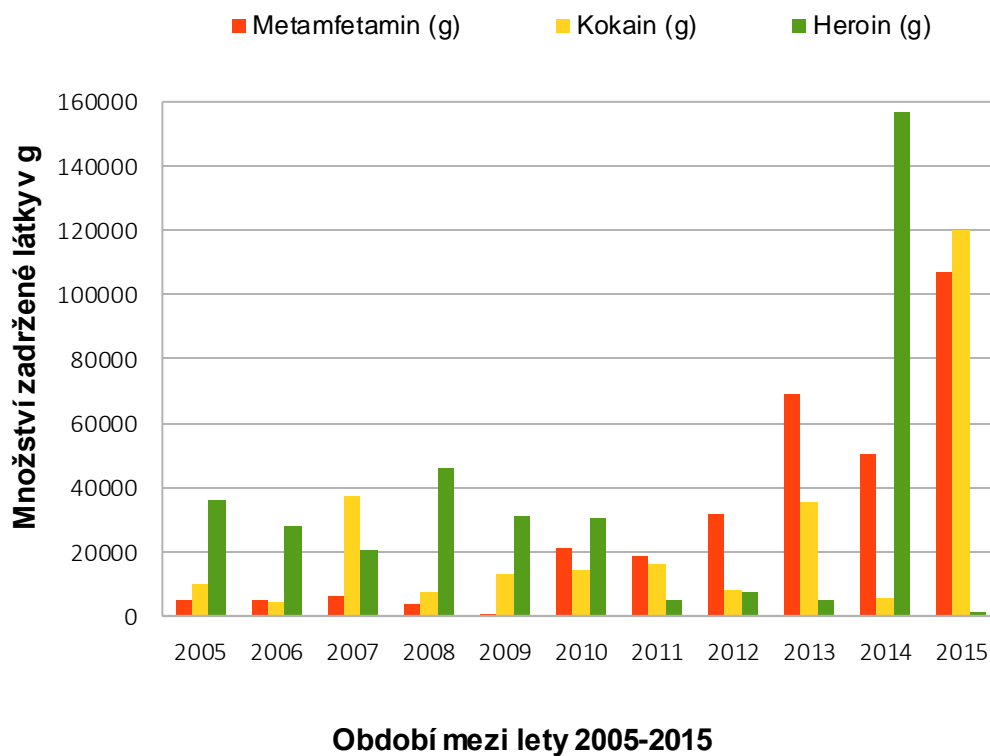
- I. Potvrdit předpokládané dlouhodobé účinky na potomstvo prenatálně vystavené metamfetaminu.
- II. Ověřit zda tato expozice metamfetaminem ovlivňuje generaci potomků exponovaných samic na úrovni exprese genů ve vybraných oblastech mozku.
- III. Vyhodnotit případné změny exprese jednotlivých genů.

## **3 Literární přehled**

### **3.1 Návykové látky**

#### **3.1.1 Pohled na drogovou situaci v ČR**

Větší zneužívání návykových látek se v západním světě objevilo kolem 60. - 70. let. Díky železné oponě byla střední a východní Evropa od tohoto vlivu odtržena a šíření návykových látek se objevilo ve velké míře až po roce 1990. Západní země se na rozdíl od střední a východní Evropy vypořádaly s těmito změnami lépe. Vysoká kontrola obyvatelstva v komunistických zemích přispěla ke kontrole šíření návykových látek, zároveň však zabránila vytvoření jakéhokoli ochranného mechanismu. Po roce 1990 byla domácí produkce hlavním zdrojem návykových látek. Neexistoval zatím nelegální „černý“ trh. Uživatelé omamných a návykových látek se sdružovali do uzavřených skupin, které nebyly nijak propojeny. V této době se mezi mladistvými rozšiřuje „čichání“ těkavých látek (ředidla, lepidla atd.) (Matoušek et al., 2005; Bečková et al., 1999). Léky byly hlavní náhražkou za tzv. „tvrdé drogy“. Šlo o snadno dostupné léky jako např. Fermetrazin, Dynil, Morfin aj. (Švestka et al., 1995). Při chemických úpravách účinnějších drog vznikaly výrobní postupy pro přípravu drogy nové. Příkladem je např. pervitin nebo „braun“ (Kalina et al., 2003; Bečková et al., 1999; Novotný et al., 1995). Kolem roku 1994 se snížila vnější kontrola, došlo k uvolnění poměrů a otevření hranic v rámci obchodování. Trh s drogami se tak změnil. Do ČR se dostává především heroin, a to ve vysoké kvalitě. Počet uživatelů heroinu a pervitinu prudce narůstá (Kalina et al., 2003). Po roce 2000 se ČR stává tranzitní zemí (graf 1). Drogy jsou dostupnější a věková hranice prvního užití se snižuje (Vavříková et al., 2001b). Po vstupu do Evropské unie (EU) v roce 2004 Česká republika (ČR) přebírá do našeho právního řádu evropské normy, které tuto problematiku řeší (Policie ČR, 2005). V posledních letech se situace opět mění, zásadním způsobem narůstá konzumace marihuany, LSD a extáze (tzv. „tanečních drog“). Zneužívání heroinu a pervitinu naopak již dále nestoupá a i kokain je zneužíván méně jak v předešlých letech (Kalina et al., 2003).



**Graf 1: Množství zadržených drog za posledních 10 let. Převzato a upraveno [cit. 2017-07-26]: Policie ČR, 2015; dostupné online**

### 3.1.2 Drogy a drogová závislost

Návykové látky neboli drogy, jsou návykové především díky vytvoření iluze, že potřeby člověka, lze uspokojit právě užíváním této látky (Kalina et al., 2003). Pod pojmem návyková látka si lze představit takovou substanci, která při užití:

- I. Má účinky, které mění prožívání, vnímání, chování nebo tělesné procesy.
- II. Má schopnost vyvolat návykové užívání nebo závislost.

(Matoušek et al., 2005; Kalina et al., 2003)

Třídění drog je poměrně složité. Dají se třídit hned podle několika norem.

- I. Na tvrdé a měkké drogy

(Dělení, vzniklé na právním podkladě. Co ještě je a co není společností tolerováno. Mezi tvrdé drogy běžně řadíme např. heroin či pervitin. Naopak do měkkých drog pak patří alkohol, tabák nebo káva.)

- II. Vyvolávající psychickou nebo fyzickou závislost

(Psychickou závislost způsobuje např. pervitin, fyzickou. např. heroin.)

- III. Podle účinků na uživatele

(Účinky mohou být stimulující, tlumící nebo halucinogenní.)

- IV. Podle Mezinárodní klasifikace nemocí

(Matoušek et al., 2005; Kalina et al., 2003)

*„Seznam omamných a psychotropních látek je upraven v zákoně č. 167/1998 Sb., o návykových látkách v platném znění. Seznam látek v tomto zákoně uvedených vychází z mezinárodních úmluv, jimiž je Česká republika vázána. Ustanovení § 283, 284 a ustanovení § 286 se týká také jedů. Seznam jedů je pro potřeby trestního zákoníku obsažen v nařízení vlády č. 467/2009 Sb., kterým se pro účely trestního zákoníku stanoví, co se považuje za jedy a jaké je množství větší než malé u omamných látek, psychotropních látek, přípravků je obsahujících a jedů.“ (tab. 1). (Sananim: drogová poradna [online]. Praha: Sananim, 2009 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://www.drogovaporadna.cz/trestni-zakonik.html>)*

**Tab. 1: Výňatek z nařízení vlády.** Pro účely trestního zákoníku se jím stanoví, co se považuje za jedy a jaké je množství menší než malé u omamných látek, psychotropních látek, přípravků je obsahujících a jedů. Převzato a upraveno podle [cit. 2017-07-26]: *Klinika adiktologie: 1. lékařská fakulta, dostupné online*

Typ látky	Mezinárodní nechráněný název v českém jazyce	Množství větší než malé	Učinná látka	Nejmenší množství účinné látky
<b>Pervitin</b>	Metamfetamin	> 1,5 g	(+) – 1 – fenyl – 2 – methylaminopropan	0,5 g
<b>Heroin</b>	Heroin	> 1,5 g	3,6 – diacetylmorfin	0,2 g
<b>Kokain</b>	Kokain	> 1 g	Metylester benzoylekgoninu	0,54 g
<b>Extáze</b> <b>MDMA</b>  <b>MDA</b>  <b>MDEA</b>	3,4-Metylen-dioxy-MA  Tenamfetamin  N – Etyl – 3,4 – metylen – dioxy – amfetamin	> 4 tablety nebo  > 0,4 g práškové či krystalické substance	1 - (3,4 – metylendioxyfenyl) – 2 – methylaminopropan	
<b>LSD</b> <b>LSD-25</b>	LSD	> 5 papírků atd. impregnovaných účinnou látkou	(+) – N,N – dietyllysergamid (dietylamid kyseliny lysergové)	0,134 mg
<b>Marihuana</b>	Konopí	> 10 g sušiny	δ-9-tetrahydrocannabinol	1 g
<b>Hašiš</b>	Pryskyřice z konopí	> 5 g	δ-9-tetrahydrocannabinol	1 g

Ráda bych se v této práci více zmínila o dvou běžně používaných děleních a to o třídění podle účinků na uživatele a o třídění podle Mezinárodní klasifikace nemocí.

### **3.1.2.1 Třídění podle účinků na uživatele**

Takto lze rozdělit drogy do tří kategorií a to na drogy stimulační (povzbuzující), drogy tlumivé (uklidňující, tišící) a na drogy halucinogenní (přetvářející vnímání reality) (Weiss et al., 2015). Tyto kategorie zahrnují různé typy návykových látek, a to bez ohledu na rizika spojená s jejich konzumací. Jednotlivé kategorie jsou odrazem účinků drogy na uživatele (Weiss et al., 2015; Lampert et al., 2015; Kalina et al., 2003).

#### **I. Drogy stimulační, povzbuzující**

Základním efektem látek této skupiny je celková stimulace – povzbuzení. Stimulační drogy dodávají člověku energii, zbavují jej únavy, nespělosti a zábran. Patří sem například káva, čaj, ale i amfetaminy či MA (pervitin, extáze) nebo kokain (Suchopár et al., 2009; Švestka et al., 1995). V České republice jsou amfetaminy velmi často zneužívané (Vavříková et al., 2001b). Nejčastěji jde o pervitin neboli MA. Jeho domácí výroba není nijak vzácná. Připravuje se běžně z látky zvané efedrin, kterou je možné získat z některých volně prodejných léků (Policie ČR, 2005; Vavříková et al., 2001b; Švestka et al., 1995). Mezi stimulační látky patří i taneční drogy typu extáze, která je v současnosti velmi oblíbenou na tanečních večírcích. Po požití extáze může uživateli hrozit dehydratace, protože nepocítuje únavu ani žízeň, touha tancovat je u něj natolik intenzivní, že často vydrží tancovat celou noc (Weiss et al., 2015; Kalina et al., 2003). Kokain, přírodní droga obsažená v listech jihoamerického keře *Erythroxylon coca*, se stal populárním po první světové válce a dodnes jde spíše o drogu středních a vyšších tříd (Weiss et al., 2015).

#### **II. Drogy tlumivé, uklidňující, tišící**

Tlumivé drogy jsou látky, které člověk vyhledává pro uklidnění, utišení bolesti a otupení smyslů. Drogy z této skupiny jsou odvozeny od látek, které jsou v mozku schopny navázat se na opioidní receptory (Weiss et al., 2015; Kalina et al., 2003; Švestka et al., 1995). Jde o látky získávané ze surového opia, tedy ze šťávy nezralých makovic. V opiu jsou obsaženy alkaloidy zodpovědné za psychotropní účinky, jako je morfin a kodein (Švestka et al., 1995; Riedl et al., 1971). Mezi účinné a velmi návykové tlumiče patří celá řada medikamentů zneužívaných širokou veřejností. Ať jsou to přípravky pro lepší spaní čili sedativa, nebo léky proti úzkosti, tedy preparáty



z řad benzodiazepanových anxiolytik jako je např. Neurole, Diazepam, Lexaurin či Rivotril (Lampert et al., 2015; Suchopár et al., 2009; Santarelli et al., 2003; Ševčík, 1968). Dalšími zástupci jsou opium, stejně jako syntetický opioid buprenorfin nebo heroin. Na látky této skupiny se rychle rozvíjí tolerance a dávky je zapotřebí neustále zvyšovat. Nebezpečí opiátů spočívá především v rychlém rozvoji fyzické závislosti a možném předávkování (Bernard, 2011; Matoušek et al., 2005; Kalina et al., 2003).

### **III. Drogy halucinogenní, přetvářející vnímání reality**

Halucinogenní drogy jsou substancí, která přetváří a deformuje to, co vidíme, cítíme, vnímáme a prožíváme (Kalina et al., 2003; Bečková et al., 1999). Jde jak o přírodní tak syntetické látky, na kterých nevzniká fyzická závislost. Patří sem např.: psylocibin (houby rodu *Psilocybe* (lysohlávky), *Panaeolus* (kropenatec), *Stropharia* (límcovka) nebo *Gymnopilus* (šupinovka)), atropin (rostliny z čeledi *Solanaceae* (lilkovité) – durmany (*Datura*), blín černý (*Hyoscyamus niger*) nebo rulík zlomocný (*Atropa bella-donna*), tetrahydrokanabinol (THC) (obsažen v konopí *Cannabis sativa* a *Cannabis indica*) nebo syntetický diamid kyseliny lysergové (LSD) (Weiss et al., 2015; Suchopár et al., 2009; Ševčík, 1968). Mnohé halucinogenní látky byly využívány různými kulturami při náboženských obřadech a jiných rituálech (Furst, 1996). Vznik psychické závislosti je v jejich případě sporný. U silnějších halucinogenů jakými jsou LSD či dimethyltryptamin (DMT) je efekt prožitku často pro uživatele tak silný, že opětovné užití v blízké době se mu zdá jako nepotřebné či dokonce život ohrožující (Furst et al., 1996). Slabší halucinogeny, třeba konopné produkty jako marihuana či hašiš, sice mohou vyvolat psychickou závislost, ale ta je slabého charakteru a většina uživatelů se s ní vyrovná a dokáže s ní zcela normálně žít (Švestka et al., 1995). Riziko této kategorie drog rozhodně spočívá v jejich neodhadnutelném vlivu na psychiku jedince. Změna prožívání navozená halucinogeny má totiž často za následek duševní zhroucení s rozvojem nejrůznějších psychotických poruch, od emocionální nevyrovnanosti až po schizofrenii či psychózu (Vondráček et al., 2012; Yang et al., 2006; Wenke et al., 1990).

### 3.1.2.2 Podle Mezinárodní klasifikace nemocí

Ústřední charakteristikou onemocnění je touha (často silná, přemáhající) užívat psychoaktivní látku (včetně alkoholu a tabáku). Touhu užívat drogy si jedinec uvědomuje, i když ji nemusí přiznávat a snaží se užívání kontrolovat nebo zastavit - často však neúspěšně. Tabelární části Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) vstoupila v platnost 1. 1. 2013 sdělením Českého statistického úřadu, obsahuje technické opravy s platností od 1. 4. 2014 a 1. 3. 2017 (ÚZIS, 2017). V Mezinárodní klasifikaci nemocí se závislost označuje statistickým kódem F10 – F19. Každé jednotce je pak přiřazena vlastní závislost (tab. 2) (ÚZIS, 2017). Pod kódem F10-F19 se nachází široké spektrum nemocí různé tíže a různých klinických forem. Spojuje je jen užívání psychoaktivních látek, přičemž sem nepatří substance, které nezpůsobují závislost (F55). Užívanou substanci ukazuje třetí znak, čtvrtý znakový kód pak specifikuje klinický stav (tab. 3) (ÚZIS, 2017).

**Tab. 2: Seznam statistických kódů F10 – F19 a poruch k nim přiřazených.** Převzato a upraveno podle [cit. 2017-07-22]: ÚZIS, dostupné online

Kód	Poruchy duševní a poruchy chování způsobené užíváním
F10	Alkohol
F11	Opioidy
F12	Kanabinoidy
F13	Sedativa nebo hypnotika
F14	Kokain
F15	Jiná stimulancia včetně kofeinu
F16	Halucinogeny
F17	Tabák
F18	Prchavá rozpouštědla
F19	Více drog a jiných psychoaktivních látek

**Tab. 3: Seznam statistických kódů na čtvrtém místě a stavů k nim přiřazených. Převzato a upraveno podle [cit. 2017-07-22]: ÚZIS, dostupné online**

Číslo	Stav	Nepatří sem
.0	<b>Akutní intoxikace</b> Stav po aplikaci psychoaktivní látky vedoucí k poruchám úrovně vědomí, poznávání vnímání, emotivity nebo chování, nebo jiných psychofyzilogických funkcí a reakcí.	Intoxikace ve smyslu otravy (T36–T50).
.1	<b>Škodlivé použití</b> Příklad užití psychoaktivní látky vedoucí k poruše zdraví. Poškození může být somatické (hepatitida při injekčním podání), nebo psychická (epizody sekundární deprese až těžký alkoholismus)	
.2	<b>Syndrom závislosti</b> Soubor behaviorálních, kognitivních a fyziologických stavů, který se vyvíjí po opakovaném užití substance a který typicky zahrnuje silné přání užít drogu, porušené ovládání při jejím užívání, přetrvávající užívání této drogy i přes škodlivé následky, priorita v užívání drogy před ostatními aktivitami a závazky, zvýšená tolerance pro drogu a někdy somatický odvykací stav	
.3	<b>Odvykací stav</b> Skupina příznaků různého seskupení a stupně závažnosti, vyskytující se při absolutním nebo relativním odvykání psychoaktivní látky po jejím dlouhotrvajícím užívání.	
.4	<b>Odvykací stav s delíriem</b> Stav, definovaný charakteristikou -.3 na čtvrtém místě, je komplikován delíriem, jak je definováno v F05.–.	
.5	<b>Psychotická porucha</b> Soubor psychotických fenoménů, které se objevují během použití psychoaktivních látek nebo po něm, které však nelze vysvětlit pouze akutní intoxikací a nejsou součástí odvykacího stavu. Vědomí je obvykle jasné, ale určitý stupeň jeho zastření může být přítomen, nikoliv však těžký stav zmatenosti.	Psychotická porucha reziduální nebo s pozdním nástupem se společnou charakteristikou -.7 na čtvrtém místě.

<b>.6</b>	<b>Amnestický syndrom</b> Syndrom sdružený s výrazným chronickým postižením paměti na nedávné i vzdálené skutečnosti. Bezprostřední vybavování je obvykle zachováno a čerstvá paměť je typicky více poškozena než paměť dávná.	Nealkoholický Korsakovův syndrom (F04).
<b>.7</b>	<b>Psychotická porucha reziduální a s pozdním nástupem</b> Porucha, u níž změny v poznávání, afektu, osobnosti nebo chování, vyvolané alkoholem nebo psychoaktivní substancí, přetrvávají za období, kdy přímý účinek ve vztahu k psychoaktivní látce může být předpokládán	Korsakovův syndrom a psychotická porucha.
<b>.8</b>	<b>Jiné duševní poruchy a poruchy chování</b>	
<b>.9</b>	<b>Neurčité duševní poruchy a poruchy chování</b>	

### 3.1.3 Vznik závislosti

Jde o soubor behaviorálních, kognitivních a fyziologických stavů. Vyvíjí se po opakovaném užití návykové látky a typicky zahrnuje silné přání opětovně užít tuto látku, porušené vědomí po jejím užití a přetrvávající užívání této látky i přes její škodlivé následky. Užívání drog je prioritou před ostatními aktivitami a závazky, vytváří se zvýšená tolerance pro drogu a někdy se dostavují i somatické odvykací stavy. Častým motivem k začátku užívání drog je zvědavost a k následnému vytvoření závislosti. Mnozí poprvé drogu vyzkouší jen proto, aby věděli „jaké to je“ (Segal et al., 2014; Bečková et al., 1999). Dalším možným motivem je stres či problémy, které daný člověk není schopen řešit jinak, nežli útekem od reality (Bečková et al., 1999; Novotný, 1995). V každém případě je však velmi důležitá prevence. Prevence užívání a vzniku závislosti na alkoholu a nealkoholových drog se podle World Health Organization (WHO) rozlišuje na: primární prevence, tj. předcházení užití u osob, které dosud s drogu nejsou v kontaktu; sekundární prevence, tj. předcházení vzniku a rozvoje závislosti u osob, které již drogu zkusili a užívají ji a terciární prevence, tj. předcházení vážnému či trvalému zdravotnímu a sociálnímu poškození z užívání drog; jde jak o resocializace či sociální rehabilitace, tak o opatření snižující přenos infekčních nemocí při nitrožilním užívání drog tzv. Harm Reduction program (World Health Organization online, 2016).

## **3.1.4 Fáze drogové závislosti**

### **3.1.4.1 Experimentální užívání**

Počáteční fáze drogové závislosti, kdy je uživatel drogou nadšen a seznamuje se s jejími účinky. Zažívá neznámé pocity a zcela se mění jeho pohled na svět. V této fázi není těžké bránit drogu utajit před okolím. Pozorovat užívání drog lze jen v náznacích - časté střídání nálad euforie a deprese, laxní přístup k problémům, nezáměr cokoli řešit. Vše mu jde velmi lehce, vše bere s nadhledem a s ničím si nedělá starosti, v práci nebo ve škole zatím uživatel také nemá žádné problémy (Sobell et al., 2013; Bernard, 2011). Naopak, často se mu daří dokonce lépe. Je soustředěnější a lépe mu funguje paměť (Bernard, 2011). Jelikož mu stačí k uspokojení potřeb relativně malé dávky, zatím není pocíťována taková finanční zátěž. Účinky drogy tedy nejsou v této době nijak negativní. Uživatel je často přesvědčený, že výroky o škodlivosti drog jsou jen výmysl (Segal et al., 2014; Bečková et al., 1999). Droga také v této době ještě spolehlivě pomáhá bagatelizovat problémy a unikat z reality do ideálního světa, kde problémy neexistují. Přestože je v této fázi ještě relativně lehké přestat (u většiny drog se ještě nevytvořila fyzická závislost), většina lidí nepřestane, protože vnímají jen pozitiva, která jim droga přináší, nastupuje psychická závislost (Bečková et al., 1999). Pokud uživatel v této době dokáže přestat, je u něj nesmírně důležitá psychologická příprava na nejrůznější životní situace. Pokud nebude připraven tyto budoucí situace a problémy řešit racionálně, pravděpodobně se opět uchýlí k dříve užívané droze (Sobell et al., 2013; Bernard, 2011).

### **3.1.4.2 Sociální užívání**

Jde již o pravidelnější užívání ve vyšších dávkách. Začíná se projevovat závislost a droga začíná být zdrojem problémů. Uživatelé si však ještě stále myslí, že mají bránit drogy pod kontrolou, a že s ním mohou kdykoliv přestat (Sobell et al., 2013; Bečková et al., 1999; Novotný, 1995). Denní cyklus a okruh přátel je užíváním návykových látek silně ovlivněn. Uživatel už si se svými přáteli nemá co říct a hledá si proto nové mezi narkomany. Docházka do školy či zaměstnání se v tomto období stává velkým problémem (Bečková et al., 1999). Droga již uživatele otupuje, zhoršuje jejich schopnost přemýšlet a pamatovat si. Snižují se tak jejich studijní/pracovní výkony. Rovněž uživatelé do školy či zaměstnání chodí pod vlivem drogy a jejich reakce na okolí se tak mohou ostatním zdát nepřiměřené (Bernard, 2011). Množí se konflikty s okolím,

s rodinou (časté pozdní příchody domů), s učiteli (nevyspalost, nepřipravenost či naprostý nezájem), se spolupracovníky a přáteli (ztráta společné řeči, zájmů a koníčků). Uživatelé si často závislost ještě nepřipouštějí (Galanter et al., 2014; Sobell et al., 2013; Bečková et al., 1999). V této fázi se již začínají projevovat určité zdravotní problémy, jedná o nespavost, nechut k jídlu, bolesti hlavy a celého těla, vzrůstající agresivita a podrážděnost, deprese či stres (Novotný, 1995; Ševčík, 1968).

#### **3.1.4.3 Každodenní užívání**

Vše se v tomto období podřizuje droze, denní režim, morální hodnoty, zaměstnání, přátelé, uživatel návykové látky nad závislostí ztrácí jakoukoli kontrolu (Bernard, 2011; Bečková et al., 1999). Dostavují se už i finanční problémy. Se zvyšující se dávkou roste i cena a závislý jedinec se uchyluje ke krádežím, podvodům, dívky často k prostituci (Sobell et al., 2013; Bečková et al., 1999). Míra závislosti je už tak vysoká, že ji nelze nadále před okolím skrývat a uživatel je propuštěn ze zaměstnání, je zcela vykořeněn ze svého sociálního zázemí a často opouští domov. Veškeré problémy je uživatel schopný řešit už jedině užitím drogy, čímž se dostává do spirály problémů, ze kterých zdánlivě není úniku, a často vedou až k vyloučení na okraj společnosti (Novotný, 1995). U většiny drog se v této fázi vytváří fyzická závislost (Švestka et al., 1995). Návrat k normálnímu životu je pro osoby závislé velmi náročný. Uživatel návykových látek má jiný žebříček hodnot, jiné přátele, rodina ho často zavrhla a závislost na droze je už velmi silná. I v této fázi se ještě mohou uživatelé snažit přestat, ale sami toho již nejsou schopni (Bečková et al., 1999; Novotný, 1995).

#### **3.1.4.4 Užívání k dosažení normálu**

Jde o poslední fázi závislosti a jako taková často končí smrtí předávkováním či naprostým selháním organismu. Uživateli droga již nic nepřináší, je pro něj jen úlevou od psychické a fyzické bolesti (Bečková et al., 1999). Dávky jsou na hranici snesitelnosti, jsou však zároveň pro uživatele životně důležité. Veškerý život a myšlení závislého jedince se v této fázi točí kolem užívání a získávání drogy. Přičemž s obstaráváním drog má uživatel stále větší problémy (Novotný, 1995). Závislý jedinec je v této fázi již velmi vyčerpaný a začíná se na něm silně projevovat pobyt v nevyhovujících socioekonomických podmínkách. Uživatel se pro získání drogy neštítí udělat naprosto

cokoli (Bečková et al., 1999; Novotný, 1995). V případě, že drogu nedostane, nastupuje u něho tzv. abstinenční syndrom, který má různý průběh v závislosti na používané droze. Jde například o zimnici, bolest celého těla, agresivitu, stres, deprese, absolutní vyčerpání, halucinace a další (Novotný, 1995; Riedl et al., 1971). Typický je také pocit viny z požití drogy, který se často snaží uživatel zmírnit aplikací další dávky. Z této fáze již není možné, aby se uživatel vymanil sám, je jednoznačně nutná pomoc zvenčí (Galanter et al., 2014; Sobell et al., 2013; Bečková et al., 1999; Novotný, 1995).

### **3.1.5 Léčba drogové závislosti**

Léčba drogové závislosti je velmi komplikovaná. Jde o komplexní proces, neb drogově závislý jedinec není postižen jen fyzickou závislostí, ale i psychickou a zároveň je zcela vykořeněn ze svého původního sociálního zázemí (Galanter et al., 2014; Sobell et al., 2013; Bernard, 2011). Cílem léčby je pokud možno úplné odstranění závislosti. Léčba musí probíhat postupně, při příliš rychlém vysazení drogy by mohly u jedinců fyzicky závislých například vzniknout zdravotní komplikace (Švestka et al., 1995; Riedl et al., 1971). Metoda práce s drogově závislým na odvykací léčbě je založená na práci v terapeutické skupině. Psychoterapie naučí pacienta zvládat těžké nebo krizové situace bez drog. Rovněž pacientovi pomáhá zapojit se opět do společenského života (Sobell et al., 2013; Bečková et al., 1999). Při léčbě se postupně snižují dávky drogy až na naprosté minimum. To pomáhá tělu, aby si postupně na drogy odvyklo a přešlo zpět do běžného režimu fungování. Někdy se také při léčbě používá tzv. substituční metoda, kdy je užívaná droga nahrazena jinou, slabší. Například substituce heroinu metadonem (Galanter et al., 2014; Bernard, 2011; Novotný, 1995). Důležitou složkou léčby je i rozvíjení „spirituální“ složky, neboť mnoho lidí propadne drogové závislosti z potřeby nalezení smyslu života (Sobell et al., 2013; Bečková et al., 1999). Důležité je odstranění rituálů. S rituály souvisí i prostředí nebo kolektiv, které je rovněž nutno nahradit něčím novým, co už se s drogou nepojí (Kendler et al., 2014; Novotný, 1995). Vše je ještě rozšířeno o intenzivní terapii, založenou na osobnostní rekonstrukci (Bernard, 2011).



## 3.2 Stimulační drogy

Tato práce se zabývá účinky MA a ten patří právě mezi stimulační drogy. Proto bych se jimi na tomto místě ráda dále věnovala. Mezi stimulační drogy patří psychostimulancia, psychoanaleptika, psychomimetika nebo psychomotorická stimulancia (Suchopár et al., 2009; Švestka et al., 1995). Mezi nejznámější stimulanty patří bezesporu kofein, mezi ty nelegální pak amfetaminy, v ČR zastoupeny hlavně pervitinem (MA). Dále je zde kokain a z něho vyráběný crack a od amfetaminu odvozené tzv. „taneční drogy“ (Kalina et al., 2003; Švestka et al., 1995).

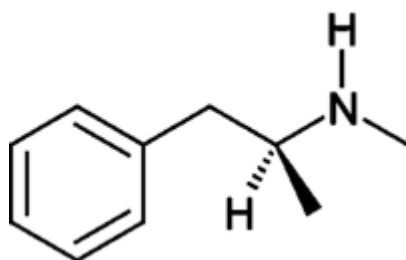
### 3.2.1 Charakteristika skupiny a obecný mechanismus účinku

Psychostimulancia mají silný budivý efekt. Ovlivňují jak centrální nervovou soustavu (CNS) tak i celý organismus. Např. extáze (MDMA), jako typický zástupce tanečních drog, má v menších dávkách především entaktogenní efekt (vyvolává potřebu tělesného dotyku), teprve ve vyšších dávkách funguje jako psychostimulant (Štefunková, 2010). Látky této skupiny zvyšují bdělost, zkracují spánek a potlačují únavu, urychlují myšlení, zvyšují míru asociací a výbavnost paměti, vyvolávají euforii a příjemný pocit duševní i tělesné síly (Weiss et al., 2015; Kalina et al., 2003). Spolu se stimulací dochází v organismu ke vzestupu krevního tlaku (může dojít až k hypertenzní krizi) a tepové frekvence, mění se distribuce krve ve prospěch kosterního svalstva a stoupá tak svalový tonus. Dále se rozšiřují dýchací cesty a prohlubuje dech (Weiss et al., 2015; Sobel et al., 2013). Princip působení spočívá v ovlivnění nervových buněk, resp. přenosu informace z neuronu na neuron. Mechanismy působení se u jednotlivých substancí liší, princip ale zůstává stejný. Tyto látky zvyšují koncentraci mediátoru v synapsích mezi neurony. To má za následek změny v přenosu nervového vzruchu. Např. MA poškozují nervová zakončení mediátoru dopaminu, extáze pak serotoninu. Díky adaptačním buněčným mechanismům se při opakovaném užití rozvíjí tolerance a následně závislost (Trojan, 2005; Kalina, 2003). Na rozvoji závislosti se podílí hned několik mechanismů. Jedním z nich je např. neuroadaptace, změny organismu vedoucí k udržení homeostázy (Trojan, 2005). Po odeznění účinků se dostavuje tzv. "dojezd". Při něm dominuje celkové vyčerpání, silná únava, bolest celého těla, uživatel trpí častými změnami nálad a depresemi. Stav obvykle odezní poměrně rychle, někdy však přetrvává i několik dní. Psychostimulační látky tedy v konečném důsledku vyvolávají úzkost, umocňují trému a deprese a i jejich jednorázové užití může vyvolat záchvat panického strachu (Claire et al., 2015). Dlouhodobé užívání vede k rozvoji psychózy, která

se projevuje paranoidními stavy, jako jsou pocity pronásledování a ohrožení (Birbaumer et al., 2005). Objevuje se po požití psychostimulační látky nebo po něm a nelze ji vysvětlit jen pouhou intoxikací. Zároveň není ani součástí odvykacího stavu. Po vysazení drogy tento stav může, ale také nemusí odeznít (Kalina et al., 2003; Hebb, 1972).

### 3.2.2 Metamfetamin

Metamfetamin (též pervitin, metylamfetamin, desoxyfedrin nebo methedrin) patří mezi budivé aminy (McCusker et al., 1997). Prvním objeveným zástupcem budivých aminů byl amfetamin, syntetizovaný v roce 1887 (Štefunková, 2010; Kalina et al., 2003). Skupina budivých aminů má stovky zástupců a v historii byly a jsou často používány jako lék proti únavě, narkolepsii, nadměrné chuti k jídlu nebo jako látky zneužívané armádou pro vyšší výkon bojových jednotek (Štefunková, 2010). Výchozí látkou pro syntézu MA je efedrin, k výrobě se používá louh a červený fosfor. Výrobce musí mít znalosti na úrovni střední chemické školy, protože nedokonalou přípravou může syntéza skončit ve fázi meziprojektu, což zvyšuje riziko pro uživatele (Štefunková, 2010). Super čistý MA se nachází v krystalické podobě, běžněji je ale prodáván jako mikrokystalický bílý prášek bez zápachu, hořké chuti. Díky příměsím zbytkových látek z domácí výroby často zabarven do žluta či do fialova (Štefunková, 2010; Kalina et al., 2003). MA lze klasifikovat jako nekatecholaminové sympatomimetikum (obr. 1). Což znamená, že má sympatomimetický efekt i bez struktury katecholaminů (McCusker et al., 1997). Na CNS má MA stimulační účinky (Zhang et al., 2001; Furmagalli et al., 1998; Plessinger et al., 1998). MA v rámci CNS uvolňuje noradrenalin (NA) z noradrenergických neuronů účinkujících na alfa receptory (Dubertret et al., 1998). Amfetaminy naproti tomu na tyto receptory skoro nemají vliv. Po podání se dále uvolňují 5-hydroxytryptamin (5-HT) a dopamin. To se projevuje zvýšenou psychomotorickou činností. MA z počátku navozuje bdělost, zbystření, potlačení únavy a zvýšení energie. Vyšší dávky pak navozují pocity euforie, blaha a zvýšeného sebevědomí (Kelley et al., 2004; Camp et al., 1988).



**Obr. 1: Strukturní vzorec metamfetaminu.** Převzato a upraveno [cit. 2017-07-22]: Senft V., dostupné online

MA akceleruje srdeční činnost, díky tomu stoupá krevní tlak, dochází k hypertermii, dilataci bronchů a rozšíření zornic (Numachi et al., 2007). Po odeznění dávky nastupuje pocit vyčerpání (Šlamberová et al., 2008). Na MA se vytváří silná psychická závislost, fyzická závislost nebyla prokázána (Šlamberová et al., 2008). Dobře se vstřebává v gastrointestinálním traktu a na sliznicích, díky svému lipofilnějšímu charakteru oproti amfetaminu snáze a rychleji prochází hematoencefalickou bariérou do CNS (Cho et al., 1991). Tam MA zvyšuje koncentraci mediátorů - monoaminů (dopaminu, noradrenalinu a serotoninu) v interneuronalních synapsích a v cytosolu nervové buňky. Zároveň také inhibuje zpětné vychytávání těchto neurotransmiterů a ve vysokých koncentracích inhibuje svou degradaci přes monoaminoxidázu (MAO) (Thrash et al., 2009). Inaktivaci drogy přes monoaminoxidázu brání přítomnost metylové skupiny na alfa uhlíku (Cho et al., 1991). Díky tomu se MA široce distribuuje tělem a jeho biologický poločas biologického rozpadu je 12 až 34 hodin (Lampert et al., 2015; Minařík, 2003). Po odeznění efektu dochází k nedostatku neuromediátorů, což je příčinou nepříjemného stavu, tzv. „dojezdu“ (Běláčková et al., 2012). V případě dlouhodobého užívání dochází k nevratným změnám v rámci metabolismu na úrovni mitochondrií, případně až k apoptóze poškozeného neuronu (Thrash et al., 2009). Při dlouhodobém užívání dochází k narušení sexuálních funkcí, vzestupu nervozity, neklidu, objevuje se insomnie, skřípání zuby (bruxismus) a snížení tělesné hmotnosti v důsledku potlačení chuti k jídlu (Yui et al., 1996). Neklid a podezřívavost se mohou změnit v paranoidní psychózu, která se může znovu vracet i po vysazení drogy (Běláčková et al., 2014; Vavříková et al., 2001b). Bylo zjištěno, že různé živočišné druhy metabolizují MA různě. Potkani například přes aromatickou hydroxylaci, králíci deaminací (Cho et al., 1991; Sipes et al., 1986). U lidí se podstatná část aplikovaného MA vylučuje močí v nezměněné

formě (cca 45 % během 24 hodin po aplikaci). Vylučování je silně závislé na pH. V kyselé moči se v nezměněné formě vyloučí až 76 %, zatímco v alkalické moči jsou to jen cca 2 % aplikované dávky (Vavříková et al., 2001a, Bauer et al., 2002). Močí se vylučují i metabolity: asi 15 % dávky se v játrech metabolizuje hydroxylací na hydroxymetamfetamin. Přibližně 7 % dávky se metabolizuje N – demethylací na amfetamin, ze kterého dále vznikají hydroxyamfetamin (2 – 4 %) a norefedrin (2 %), ze kterých vzniká hydroxynorefedrin (0,3 %) a konečně fenylacetone (0,9 %) metabolizovaný dále na kyselinu benzoovou, resp. kyselinu hippurovou (Senft, 2009; Cho et al., 1991; Sipes et al., 1986).

### **3.2.2.1 Metamfetamin: droga těhotných závislých žen**

Ženy obecně reagují na drogy citlivěji jak muži. Rychleji u nich vzniká závislost, zároveň ale i lépe reagují na léčbu. Během abstinence u nich však také častěji dochází k relapsu (Macúchová et al., 2014; Běláčková et al., 2012; Šlamberová et al., 2008). V posledních letech ženy omamné látky zneužívají především v průběhu těhotenství (Macúchová et al., 2014; Běláčková et al., 2012; Šlamberová, 2003). Citlivost k droze a její metabolismus je těhotenstvím také značně ovlivněn. Byla prokázána vyšší citlivost ke kokainu, který může způsobit náhlé úmrtí plodu, naopak u metadonu se citlivost snižuje a je nutné dávky zvyšovat (Behnke et al., 2013; Bauer et al., 2002; Vavříková et al., 2001b). Podle MUDr. Vavříkové (2001b) je užívání heroinu, kokainu a pervitinu často provázeno malnutricí a hyperpyrexii. Průměrná délka užívání, podle zkušeností z gynekologickoporodnické kliniky 2. LF UK a FN v Motole, v době otěhotnění je u uživatelůk MA 3,3 roky. Nejdelší doba závislosti, která byla v rámci zařízení zaznamenána, byla 10 let. Způsob aplikace je převážně intravenózní. U žen závislých na MA z 60 % (Vavříková et al., 2001b). Dlouhodobé užívání drog má za následek fyziologické změny plasmatického objemu a celkově i tělesné vody. To v průběhu těhotenství může silně ovlivňovat koncentrační peak, distribuční objem a poločas biologické účinnosti (Vavříková et al., 2001a, Bauer et al., 2002). Placentární metabolismus je také silně ovlivněn užíváním drog (Kuczkowski et al., 2007). Změny na buněčných membránách, ve vazbách na proteiny a v molekulárních hmotnostech často brání přenosu živin, snižují průtok krve a tím i kyslíku a zapříchňují vyšší prostupnost drogy k plodu (Vavříková et al., 2001a). V děloze pak vyvolává kalcifikace a morfologická poškození placenty, dále pak potraty případně i smrt matky (Plotka et al., 2014). Je známo, že MA prochází snadno placentární bariérou do oběhu plodu, kde je kolem 50 % koncentrace drogy v těle matky (Rambousek et al., 2014;

Smith et al., 2008). MA se odbourává v játrech a ty u plodu ještě nejsou schopné takovou zátěž zvládat. Koncentrace tedy v průběhu času v plodu vzrůstá a nakonec převyšuje koncentrace drogy u matky (Moore et al., 2011; Šlamberová, 2003; Dattel, 1990). MA je považován za kyslíkový radikál (ROS). Navzdory potížím vysvětlit přímý mechanismus teratogeneze během organogeneze, bylo prokázáno, že hladiny většiny antioxidantů jsou v embryu sniženy. Proto nedochází k účinné obraně organismu proti vlivům MA (Neri et al., 2015). To může mít za následek oxidační poškození například lipidů, proteinů, DNA a stejně tak aktivaci apoptózy nebo nekrotické buněčné smrti (Wells et al., 2016; Moore et al., 2011; Jeng et al., 2005). Bylo prokázáno, že MA snižuje dopamin a noradrenalin, inhibitory MAO, zvyšující se synaptická aktivita tak má neurotoxické účinky na CNS (Ma et al., 2014). Cui et al., se domnívá, že kombinace MA s monoaminovými neurotransmitery proto ovlivňuje vývoj mozku plodu (Behnke et al., 2013; Cui et al., 2006). Toto teratogenní agens v těhotenství vede k úmrtí plodu a může mít za následek strukturální abnormality, jako je rozštěp patra a exencefalie (Wells et al., 2016; Golub et al., 2005). Kromě přímého účinku drogy na dítě je nutné vzít v potaz i účinky nepřímé. Ženy závislé na MA jsou z 85 % případů nezaměstnané (Vavříková et al., 2001b), z 90 % jde o svobodné matky a také mají statisticky nižší věk (Brown et al., 2006; Vavříková et al., 2001b). Prenatální a postnatální péče u nich není dostatečná, ženy se svým dětem nevěnují a často chybí potřebné zázemí (Ackerman et al., 2008). Proto je přímé působení drogy jen těžko rozlišitelné od vnějších negativních vlivů a všechny tyto aspekty mají negativní dopad na vývoj dítěte (Šlamberová, 2014; Vrajová et al., 2014; Schutová et al., 2013; Běláčková et al., 2012; Šlamberová et al., 2006; Šlamberová et al., 2005; Vavříková et al., 2001a Kinsley et al., 1994).

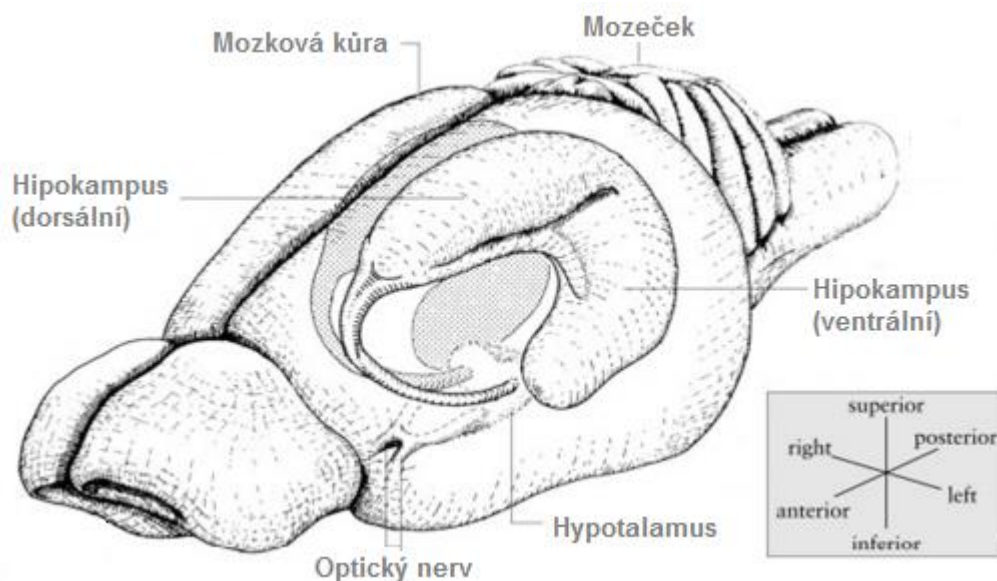
### 3.2.2.2 Metamfetamin: prenatálně ovlivněné děti

Prenatální vystavení MA je velkým a často diskutovaným problémem. Studií, potvrzujících přímý vliv na vyvíjející se mozek dítěte a díky tomu změny v chování, bylo provedeno jen velmi málo (Behnke, 2013). Je problémem dostatečně dlouho udržet dostatečně velkou testovanou skupinu. Proto zcela chybí studie dospělých jedinců prenatálně vystavených působení MA (Vassoler et al., 2014; Šlamberová, 2006). Navíc u většiny pouličně prodávaných drog, jako je kokain, heroin, pervitin a marihuana, byl prokázán vliv na dítě i během kojení (Bagheri et al., 2017; Oro et al., 1987; Steiner et al., 1984). Bylo provedeno několik málo studií na malých dětech, časně po narození (Smith et al., 2006; Smith et al., 2003; Eyler et al., 1999; Van Baar et al., 1989; Little et al., 1988) a v mladším předškolním věku (Eze et al., 2016; Nguyen et al., 2010; Smith et al., 2003). Předchozí studie předpokládaly, že užívání MA má za následek vyšší výskyt srdečních vad, rozštěpů rtu, oboustranné atrésie a mrtvě rozených dětí (Plessinger, 1998). Tyto studie proběhly v rámci retrospektivní analýzy s mnoha omezeními a na malém množství probandů. Nové studie žádný rozdíl, mezi kontrolním vzorkem a dětmi prenatálně vystavenými MA nenašly (Shah et al., 2012). Navíc, u novorozenců nebyl pozorován žádný abstinenční syndrom vyžadující lékařský zásah (Van Baar et al., 1989). Data, pocházející ze studií vývoje kojenců prenatálně vystavených MA, však ukazují na zpomalení neurobehaviorálního vývoje, který sestává ze špatné kvality pohybu, snížené vzrušivosti a vyššího stresu (Behnke et al., 2013; Smith et al., 2008; Smith et al., 2003; Behnke et al., 1993). MA vystavení novorozenci se často projevují neuspořádaným a kvalitativně špatným pohybem a jsou pod vysokým fyzickým napětím a silně namáhanou CNS (LaGasse et al., 2011; Covington et al., 2007; Kiblawi et al., 2014). V průběhu prvního měsíce však tato desorganizace mizí (Chakraborty et al., 2015; Kiblawi et al., 2014). Některé studie mluví o snížené porodní délce, váze a obvodu hlavičky a o zvýšení výskytu intrauterinní retardace (Oro et al., 1987; Little et al., 1988). Novodobé studie tyto výsledky spíše potvrzují. Smith et al. (2006) mluví o vyšším riziku narození dítěte menšího než je jeho gestační věk a o snížení porodní váhy. I po třetím roce života jsou tyto děti signifikantně menší, nežli jejich vrstevníci (Zabaneh et al., 2012). Cernerud et al. (1996) popisuje ve své studii malé kohorty dětí prenatálně vystavených MA od narození do 14 let. Ve sledované skupině jsou dívky prenatálně vystavené MA i po 14. roce života signifikantně menší, jak dívky z kontrolní skupiny. Růstová retardace plodu byla spojena s metabolickým syndromem a obezitou. Zhoršení růstu v novorozeneckém období tak může u těchto dětí vést ke zhoršení jejich

zdravotního stavu v dospělosti (Smith et al., 2016). Další studie dokládají vliv na strukturu mozku (Jablonski et al., 2015). Prenatální expozice drogou vede ke zmenšení objemu subkortikálních struktur, a to *putamen*, *globulus pallidus*, *nucleus caudatus* a hipokampu (Chang et al., 2004). Děti prenatálně vystavené MA mají tedy obecně menší striatum. V něm mají zároveň méně dopamin D2 receptorů, spolu se snížením celkového kreatinu (Derauf et al., 2012; Chang et al., 2007). Tyto děti však nemají nijak snížené IQ ani se u nich neprojevují jazykové problémy (Chakraborty et al., 2015; Williams et al., 2007; Smith et al., 2009). Studie naznačují možné problémy dětí mladšího školního věku se sociálním začleněním, vycházením s vrstevníky a slabšími výsledky v kognitivních testech (Jablonski et al., 2016; Billing et al., 1994). Jejich chování je často asociováno s depresemi, úzkostnými stavy a emocionální nestabilitou (Kiblawi et al., 2013; LaGasse et al., 2012; Barkus et al., 2010). Projevují se zvýšenou externalizací, poruchami osobnosti (Spurlock et al., 1998; Squire et al., 1998) a často u nich dochází k rozvoji poruchy pozornosti spojené s hyperaktivitou (ADHD syndrom) (Kiblawi et al., 2013; Raine et al., 2006; Holmes et al., 2001; Raine et al., 2000; Leech et al., 1999). Kolem 7. roku života jsou těmto dětem diagnostikovány poruchy chování s častou agresivitou (Eze et al., 2015; Davidson et al., 2000). Silné prenatální ovlivnění MA a celková „nepřízeň osudu“ v dětství je asociována se špatným funkčním neurologickým vývojem (Abar et al., 2013; Irner et al., 2012).

Pro pochopení vlivu MA na CNS je nejprve nutné pochopit vývoj této soustavy. Nervová soustava se vyvíjí a dozrává od prenatálního období až do dospívání. Obecně je sled událostí srovnatelný mezi druhy, ačkoli časová rozmezí jsou značně odlišná (obr. 2) (Sengupta, 2013; Rice et al., 2000). Citlivost k teratogennímu agens se mění v závislosti na vývojovém stádiu zárodku v době expozice. Kritická perioda je období, kdy je možné zevním zásahem narušit vývoj daného orgánu, po jejím uplynutí již nelze vyvolat strukturální vadu daného orgánu. Kritická perioda je determinovaná obdobím morfogeneze orgánu (Peterka et al., 2010). Kromě toho je nutné, aby se kritická perioda ještě překrývala s periodou senzitivní, kdy jsou buňky citlivé k danému agens. Různé klinické poruchy u lidí (např. schizofrenie, dyslexie, epilepsie nebo autismus) tak mohou být výsledkem zásahu do normálního vývoje nervové soustavy. Vývojová expozice zvířat i lidí na nejrůznější teratogenní agens (např. rentgenové záření, metylazoxymethanol, ethanol, olovo, metylortuť nebo chlorpyrifos) demonstruje, že interference s jedním nebo více z nich mohou vést k neurotoxicitě. Různé behaviorální domény (např. sensorická, motorická a různé kognitivní funkce) závisí na různých oblastech mozku (Won et al., 2001;

Westerga et al., 1990; Wagner, 1981). Ačkoli existují značné rozdíly mezi potkaním a lidským mozkem, lze identifikovat analogické struktury. Ontogeneze specifického chování pak může být použita k vyvození závěrů týkajících se dozrávání specifických struktur mozku nebo neurálních obvodů jak u hlodavců a primátů, tak i u lidí (Peterka et al., 2010; Rice et al., 2000). Dozrávání hlavních anatomických částí mozku probíhá ve stejném pořadí u potkana jako u člověka (Bayer et al., 1993).



**Obr. 2: Grafické znázornění mozku potkana.**

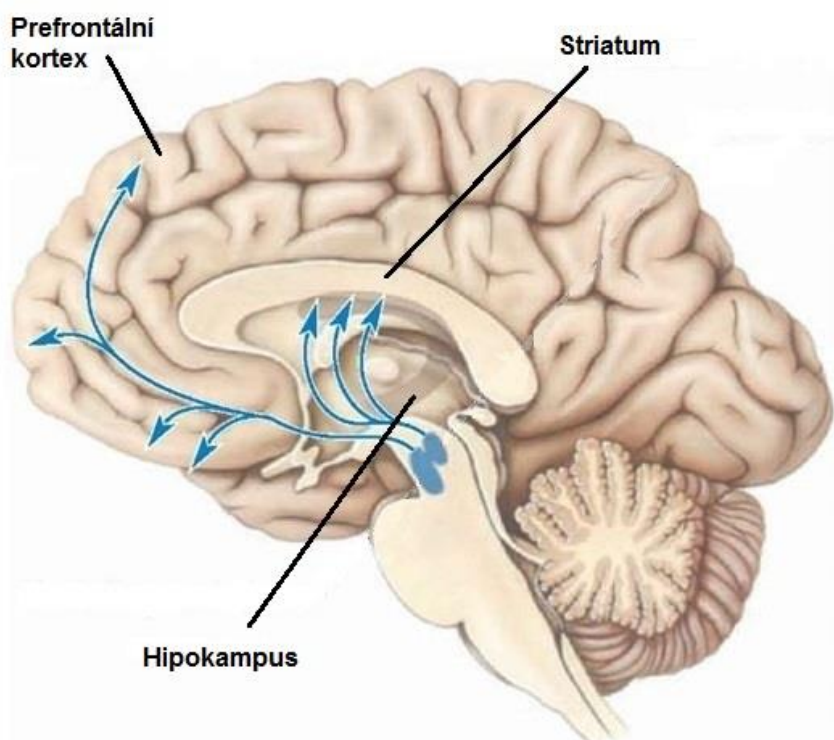
Studie na zvířecích modelech naznačují, že užívání MA v 1. a 3. trimestru může mít dlouhodobé účinky na systém dopaminu a serotoninu. To ovlivňuje učení a sociální rozvoj mozku plodu (Moore et al., 2011; Wiltgen et al., 2010). U potkaního modelu je 8. - 15. gestační den z 20 denní březosti kritickým obdobím organogeneze (Wells et al., 2009; Won et al., 2001). Předchozí studie ukázaly, že MA ovlivňuje CNS nárůstem katecholaminů v cytosolu nervových buněk (Maren et al., 2014; Silva, 2003). Zvýšení katecholaminů je způsobené snížením dopaminu a noradrenalinu v nervových zakončeních. Jejich reaktivní metabolity produkují volné radikály a výsledkem je oxidativní poškození DNA a apoptóza buněk (Quinton et al., 2006). Toto tvrzení bylo doloženo testem na březích samicích potkana, kdy jim byla podávána dávka 20 a 40 mg/kg MA, což vedlo k oxidativnímu poškození DNA a ovlivnilo to takto i vývoj mozku plodu (Behnke et al., 2013; Chang et al., 2007; Jeng et al., 2005; Won et al.,



2001). Bylo zjištěno, že nízké dávky (2-5 mg / kg) MA v průběhu celé březosti vedou ke snížení absorpce dopaminu a serotoninu, stejně jako ke snížení vazby serotoninu na serotoninergní receptor u potomstva. Naproti tomu vyšší dávky (10 mg / kg) této drogy způsobují zvýšení spotřeby dopaminu a serotoninu a potomci exponovaní MA jsou méně aktivní, nežli potomci kontrolní (Won et al., 2001). Další studie prokázaly, že užívání MA (5 mg/kg) během březosti ovlivňuje sensomotorický vývoj mláďat v období odstavení (Acuff-Smith et al., 1996; Martin et al., 1976), zvyšuje náchylnost k záchvatům u obou pohlaví (Šlaberová et al., 2005) a specificky mění citlivost na bolest v závislosti na pohlaví (Yamamotová et al., 2012).

### 3.3 Testované části mozku

Všechny živé organismy usilují o dynamickou rovnováhu, která se nazývá homeostáza (Trojan, 2003). Během závislosti je tato rovnováha ohrožena určitými fyzickými a psychologickými událostmi, které u závislého jedince vyvolávají vysoký stres (Chang et al., 2007; Anckarsater et al., 2006). V důsledku toho je jeho chování změněno. Pokud událost neodpovídá nějakému kognitivnímu zobrazení na základě předchozí subjektivní zkušenosti, dochází k nárůstu vzrušení, bdělosti, ostražitosti, pozornosti a kognitivního zpracování (Ma et al., 2005; Mena et al., 2005; Reine et al., 2004; Bechara et al., 2004; Amen et al., 1996; Bayer et al., 1993). Rozhraní mezi příchozími sensorickými informacemi a procesem hodnocení je tvořeno limbickými mozgovými strukturami, které zahrnují např. hipokampus a prefrontální kortex a strukturami přímo ovlivňujícími limbický systém, tedy striatem (obr. 3) (Druga et al., 2011; Rolls et al., 1998).



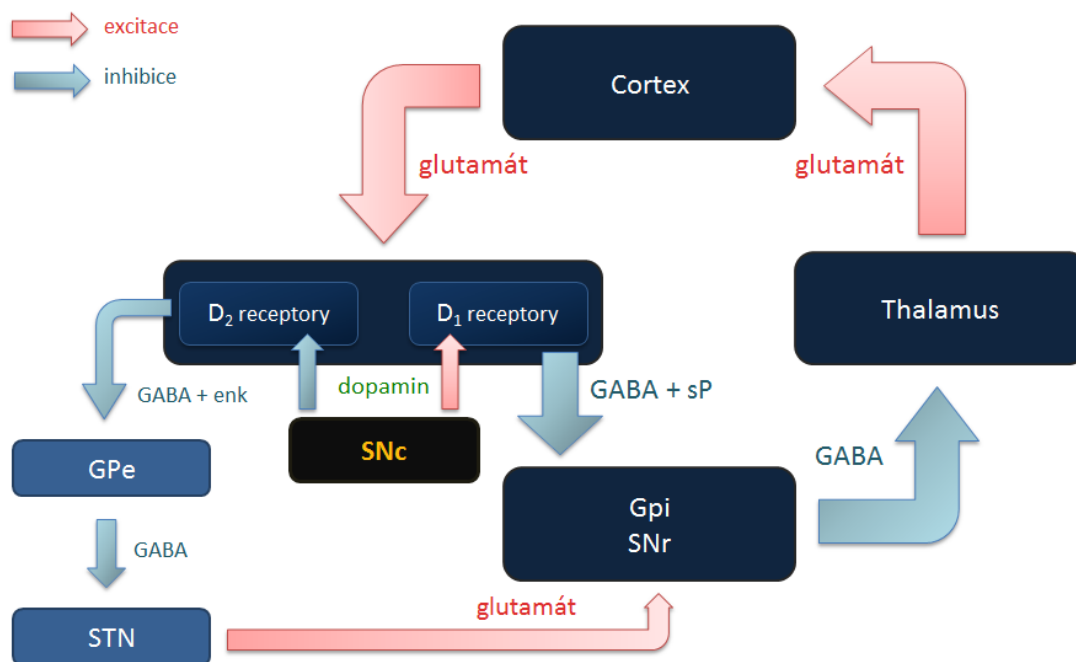
**Obr. 3: Mediální řez lidským mozkiem.** Modře naznačena hlavní dráha domaminové distribuce. Převzato a upraveno [cit. 8.3.2017]: *What-when-how*, dostupné online

Kontrolní oblasti v mozku vysílají signály, které konfigurují zpracování příchozích vjemů od okamžiku k okamžiku (Bullmore et al., 2009; Bechara et al., 2004). Lidé mají unikátní kognitivní flexibilitu. Systém kontroly mozku se skládá z funkčně rozmanitých oblastí, které jsou anatomicky odděleny od zbylých systémů zpracování nervové odpovědi (Bullmore et al., 2009). Schopnost provádět nesčetné úkoly vyžaduje řídicí funkce, které přetrvávají v průběhu času a předcházejí odvrácení pozornosti, ale mohou také rychle reagovat na nepředvídatelné požadavky (Anckarsater et al., 2006).

Výběr odebíraných částí mozku potkana byl založen na faktu, že MA v mozku nejvíce interferuje s dopaminergní a serotoninergní drahou nervové odpovědi. Obě tyto dráhy společně propojují oblasti mozku zodpovědné především za kontrolu pohybu a za mechanismy strachu, potěšení, odměny a vytváření závislosti (Maren et al., 2013).

## I. Dopaminergní systém

Dopamin je tzv. neurohormon. Jeho uvolnění z hypothalamu inhibuje sekreci prolaktinu z adenohypofýzy, v CNS ovlivňuje řízení motoriky, iniciuje různé vzorce chování a moduluje aktivitu viscerálních funkcí. Je to nízkomolekulární neurotransmitter a patří mezi katecholaminy. V krevním oběhu účinkuje jako sympatomimetikum a jako takové zvyšuje systolický krevní tlak a zrychluje srdeční frekvenci (Li et al., 2014; Krugel et al., 2009). Syntetizuje se z tyrosinu nebo z fenylalaninu. Dopamin je prekurzorem noradrenalinu (NA) a adrenalinu. Je degradován MAO a katechol-O-metyltransferázou (COMT). Konečným metabolitem je kyselina homovanilová (Mansour et al., 1990). Dopaminergní jádra v mozku se označují A8, A9 a A10. Nejvýznamnější je v *pars compacta substantiae nigrae* A9 a mediálně od něj v *area tegmentalis ventralis* A10. Vlákná ze *substantiae nigrae* projikují do striata a v menší míře i do *globus pallidus*. Vlákná vystupující z *area tegmentalis ventralis* vytvářejí tzv. mezolimbický dopaminergní systém a končí v *striatum ventrale*, *pallidum ventrale*, v *septum verum*, v *amygdale* a v mozkové kůře, hlavně v prefrontálním kortexu a v primárně motorické oblasti (obr. 4).



**Obr. 4: Zapojení D1 a D2 receptoru v rámci nervových drah mozku.** STN – nukleus subthalamicus, SNc – substantiae nigrae pars compacta, SNr – substantiae nigrae pars reticulata, Gpi – globulus pallidus internus, GPe – globulus pallidus externus, GABA – kyselina gamaaminomáselná, enk - enkefalín, sP – substance P. Převzato a upraveno podle: Rokyta, 2015.

Snížená koncentrace dopaminu ve striatu vyvolává hypokinezi a chvění svalstva. Snížená koncentrace v prefrontálním kortexu pak poruchy paměti, pozornosti a motivace. Užívání MA zvětšuje množství dopaminu dostupného na D3 receptorech (Brdička et al., 2016; Bourque et al., 2011). Ten přímo stimuluje centrum odměny v mozku. Při dlouhodobém užívání dochází k úbytku dopaminergních receptorů a ke snížení celkové produkce dopaminu. To má za následek abstinenční stavy u závislých osob a jejich potřebu navyšovat dávky zneužívané látky (Drago et al., 1998; Hollerman et al., 1998).

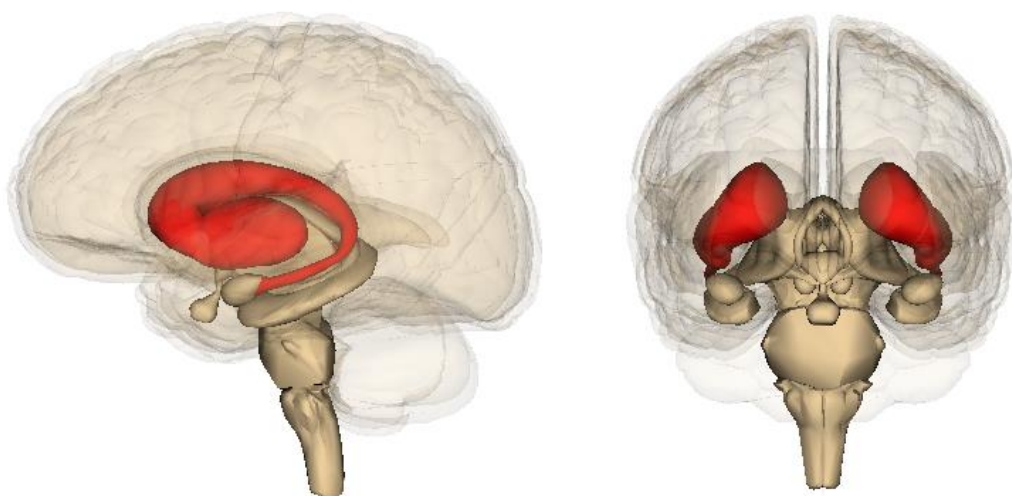
## II. Serotoninergní systém

Serotoninergní systém v CNS reguluje celou řadu funkcí a moduluje aktivitu ostatních projekčních systémů. Serotoninergní systém úzce souvisí se systémem noradrenergním a často ho doplňuje. Serotonin je odvozen od L – tryptofanu, jedná se o 5 – HT. Inaktivaci serotoninu katalyzuje dvojice enzymů MAO a aldehyddehydrogenáza. Působením těchto dvou enzymů vzniká 5 – hydroxyindolacetát (kyselina 5 – hydroxyindolactová), který se z těla vylučuje převážně močí (jako konjugát kyseliny glukuronové) (Holick et al., 2008). U serotoninu existuje ještě jedna metabolická dráha, během níž se ze serotoninu stane hormon melatonin. Nejdříve se na aminoskupinu serotoninu naváže acetyl za vzniku N-acetylserotonin, následně se na hydroxylovou skupinu naváže metyl a vzniká melatonin.

Známe 7 podtypů serotoninergních receptorů, tzv. 5-HT<sub>1-7</sub>R, některé excitační, jiné inhibiční. Efekt serotoninu silně závisí na receptorech, které jsou exprimovány neurony dané struktury. Většina neuronů tohoto systému je uložena v rafeálních jádrech retikulární formace. Jejich axony vstupují do vzestupných i sestupných svazků, směřujících do všech korových oblastí (např. prefrontální kortex) a do všech struktur limbického systému (např. hipokampus). Další končí ve striatu, thalamu, hypothalamu, v mozgovém kmeni, v mozečku a míše. Nadměrná aktivita ve vzestupných svazcích způsobuje změny nálad a poruchy chování. Vlákna končící v zadním rohu míchy ovlivňují přenos bolestivých signálů. Snížená syntéza serotoninu pak zapříčiňuje deprese a poruchy spánku (Frankle et al., 2003).

### 3.3.1 Striatum

Striatum (též *corpus striatum*) je hluboká oblast šedé hmoty uvnitř hemisfér koncového mozku (*telencephalon*) (obr. 5). Je to zřejmě rozsahem nejvýznamnější součástí tzv. bazálních ganglií (*nuclei basales*). Ty jsou součástí šedé hmoty koncového mozku (*telencephalonu*) zevně od mozkového hrbolu (*thalamus*). Bazální ganglia se uplatňují při vytváření a řízení pohybu, podílejí se na kognitivních funkcích a na funkcích limbického systému. Jedná se o vývojově staré struktury (Čihák et al., 2004; Trojan, 2003).



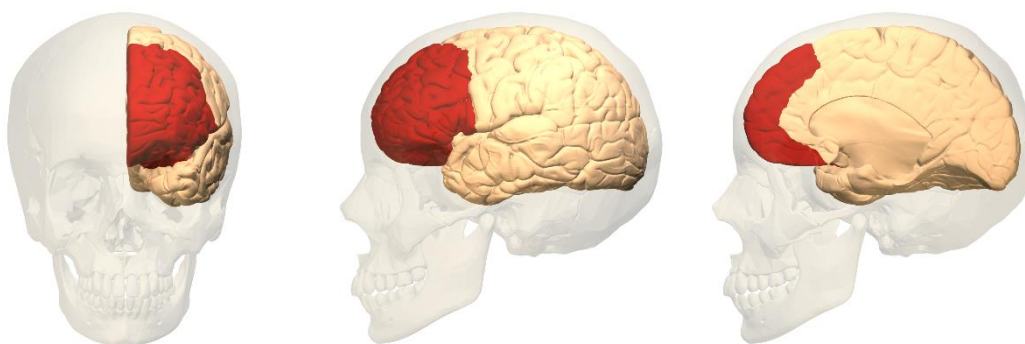
**Obr. 5: Řez lidským mozkem: striatum.** Zvýrazněno červeně, pohled ze strany a zepředu.  
Převzato [cit. 8.3.2017] : Wikipedia, dostupné online

Morfologicky sem patří především velká jádra v bazální části koncového mozku (*telencephalonu*) *nucleus caudatus*, *putamen* a *globus pallidus*, který se dále dělí na *globus pallidus medialis* (*pallidum internum*) – výstupní bazální ganglion; a *globus pallidus lateralis* (*pallidum externum*) – vmezeřený bazální ganglion (Grim et al., 2008; Čihák et al., 2004; Trojan, 2003). Struktury *nucleus caudatus* spolu s *putamen* jsou označovány jako *corpus striatum*. Označení vzniklo podle pruhů (*striae*) šedé hmoty, které spojují tato dvě jádra přes bílou hmotu *capsula interna*. Části *putamen* a *globus pallidus* pak tvoří *nucleus lentiformis* (Sadler, 2011; Grim et al., 2008; Čihák et al., 2004). Vývojově patří k bazálním gangliím také *corpus amygdaloideum*, které je však z funkčního hlediska řazeno spíše k limbickému systému (Sadler, 2011;

Waberžinek et al., 2006; Trojan, 2003). Bazální ganglia jsou zapojena do nejrůznějších okruhů fungujících v rámci mozku. Obecné schéma průchodu signálu je od kůry ke vstupnímu bazálnímu ganglionu. Od něj do výstupního bazálního ganglionu, dále do mozkového hrbolu (*thalamus*) a zpět do kůry. Popisujeme 4 kličky bazálních ganglií, a to senzomotorickou, okulomotorickou, limbickou a asociační. Při popisu záleží, z jaké korové oblasti přicházejí podněty do okruhu bazálních ganglií, dále pak záleží na jádrech, která se uplatňují jako vstupní či výstupní, a do jaké funkční korové oblasti směřuje následná projekce. (Grim et al., 2008; Čihák et al., 2006). Informace přicházejí především z motorických a somatosenzitivních oblastí mozkové kůry a vstupují do putamen. Pokračují přímou nebo nepřímou drahou (Grim et al., 2008). Funkcí přímé dráhy je podpora pohybů. Nepřímou drahou se pak inhibuje mozkový hrbol (*thalamus*), jehož prostřednictvím vzrůstá excitační vliv na mozkovou kůru. Zvýšená aktivita v přímé dráze má za následek vyšší pohybovou aktivitu. Nepřímá dráha slouží především k potlačení nechtěných pohybů (Grim et al., 2008; Trojan, 2003). Aktivita v obou drahách by měla být v rovnováze. V případě jejího narušení dochází k hyperkinetickým, popř. hypokinetickým poruchám (Chang et al., 2007; Trojan, 2003; Won et al., 2001). Na modulaci aktivity jednotlivých drah má zásadní vliv *pars compacta substantiae nigrae* působením dopaminu (obr. 4). Ten přes D1 receptory zvyšuje aktivitu v přímé dráze; přes D2 receptory snižuje aktivitu v nepřímé dráze (Barrett et al., 2009; Chang et al., 2007; Ganong, 2005; Seamans et al., 1998; Mansour et al., 1990). Bazální ganglia se uplatňují při řízení motorických a částečně i kognitivních funkcí. Obecně mají tlumivý vliv na motoriku. Neurony motorické kůry tlumí korové podněty přímým zpětnovazebným působením a prostřednictvím retikulární formace. Aktivují se již před zahájením pohybu, pravděpodobně se tedy podílejí na jeho plánování (Barrett et al. 2009; Ganong, 2005). Předpokládá se, že se také podílejí na kontrole složitých pohybových vzorců, jako je např. psaní, hra s míčem či řeč (Guyton, 2006).

### 3.3.2 Prefrontální kortex

Prefrontální kortex je jednou z největších kortikálních oblastí lidského mozku a tvoří zhruba 29 % jejího objemu. Je zodpovědný za nejvyšší funkce lidského mozku. Korová oblast frontálního laloku (obr. 6), která nepatří k motorickým oblastem, představuje významnou součást asociační kůry (Grim et al., 2008; Campbell, 2007; Trojan, 2003). Je spojen se zrakovou, sluchovou a čichovou kůrou a dochází zde k integraci smyslových vjemů. Shromažďuje informace z různých zdrojů, odehrává se v něm plánování, rozhodování, tvoří nové myšlenky a ideje. Je propojen s celým mozkem, hlavně pak s rostrálním *thalamem*. Je to jediná kortikální oblast, která vysílá přímé projekce do *hypothalamu* a septálních oblastí a zastává tak vedoucí role v regulaci limbického systému. Má s ním přímé obousměrné propojení a podílí se tak na učení a paměti (Ambler, 2011; Grim et al., 2008; Campbell, 2007; Waberžinek et al., 2006) Poškození prefrontální korové oblasti se projevuje výraznými poruchami psychických funkcí, jako třeba apatií, poruchou paměti, agresivitou, obsesemi, ztrátou společenských zábran či emoční nestabilitou (Apergis-Schoute et al., 2016; Gillan et al., 2015; Campbell, 2007; Blair et al., 2001; Brower et al., 2001).

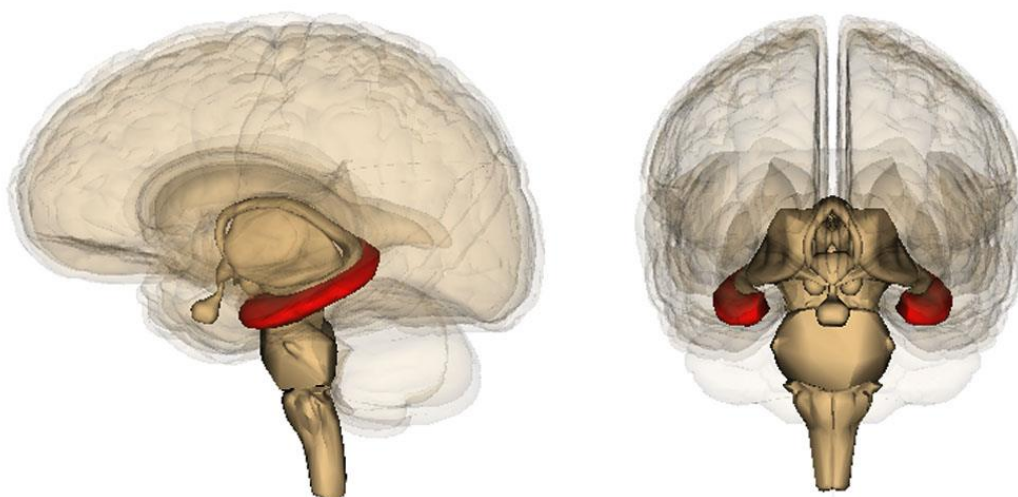


**Obr. 6: Řez lidským mozkem: prefrontální kortex.** Zvýrazněno červeně, pohled zřepředu, ze strany a mediálně. Převezato [cit. 8.3.2017]: Neurosciencenews, dostupné online



### 3.3.3 Hipokampus

Hipokampus je párový útvar *telencephalonu*. Leží v pravé (resp. levé) hemisféře ve střední části spánkového laloku (obr. 7). Je součástí limbického systému. Zprostředkovává krátkodobou i dlouhodobou paměť a pomáhá při prostorové orientaci (Stuchlík, 2014; Nakazawa et al., 2002; Kesner et al., 2002). Přijímá informace jdoucí z kůry mozku a z limbického systému, posílá je do předního *thalamu*, *hypothalamu* a zpět do mozkové kůry. Tato rytmicky se opakující vzrušovací aktivita hipokampu je základem složitých integračních dějů, jako je třeba ukládání informací do dlouhodobé paměti (Trojan, 2003; Burges et al., 2002). Díky hipokampu se orientujeme v prostoru a čase. Dovoluje nám vnímat naši polohu vůči prostředí a změny rychlosti a polohy v čase (Bannerman et al., 2014; Stuchlík, 2014). Jeho poškození se může projevat jak poruchami učení (ukládání informace do dlouhodobé paměti), tak poruchami krátkodobé paměti i třeba úplnou amnézií (Směšes et al., 2007).



**Obr. 7: Řez lidským mozkem: hipokampus.** Zvýrazněno červeně, pohled ze strany a zředu.  
Převzato [cit. 8.3.2017]: *Psypost*, dostupné online

V mozku je řada buněk kódujících prostor. Nacházejí se jak v hipokampu, tak např. v mozečku či v mozkové kůře (Honey et al., 2000). U většiny savců je struktura hipokampu prakticky stejná (Bannerman et al., 2006; McCutcheon et al., 2009; Bullmore et al., 2009; Squire, 1992). Pokud se subjekt nachází v omezeném a definovaném prostoru začnou pyramidové (a v mozečku také zrnité) buňky v této části mozku produkovat silné vzruchy (Caputi et al., 2012; O'Keefe et al., 1978; Rawlins et al., 1982; O'Keefe et al. 1971). Toto prostředí tak definuje aktivní a receptivní

prostředí subjektu. Analýzu těchto buňek lze provádět v otevřené aréně s volným pohybem, nebo pomocí radiálního či Morrisova vodního bludiště (Mariano et al. 2009; Pothuizen et al., 2004). U pozemních savců (např. potkan) jsou tyto buňky méně citlivé na svislý rozměr, naopak u netopýrů jsou vysílány silné vzruchy v reakci na všechny 3 základní osy směru (Stuchlík, 2014; Stuchlík et al., 2007). Buňky směru hlavy, které se nacházejí hned v několika mozkových strukturách spojených s hipokampem, v roce 1990 objevil spolu s kolegy Taube. Spouštějí vzruchy, pokud se zvíře dívá určitým směrem. U těchto buněk tedy nezáleží na tom, kde v prostoru se zvíře nachází, ale naopak na tom, jaký má úhel pohledu. Zároveň byly v hipokampu nalezeny i buňky citlivé jak na směr hlavy, tak na celkovou polohu zvířete v prostoru (Stuchlík, 2014; Stuchlík et al., 2007; Stuchlík et al., 2004). Narušení této struktury může vést k emocionální nestabilitě jedince projevující se jako úzkostné stavy, deprese nebo obsese (Apergis-Schoute et al., 2016; Barkus et al., 2010; Pentkowski et al., 2006; Deaco et al., 2002; Nicolini et al., 1996).

### 3.4 Testované geny a endogenní kontroly

V rámci výzkumu prováděném na Ústavu lékařské genetiky 3.lf UK (grantový projekt GA ČR: 14-03708S) byla testována exprese 13 genů (tab. 4) ve vybraných 3 částech mozku u 16 dospělých potkanů (8 prenatalně vystavených metamfetaminu a 8 kontrolních). Expese všech genů byla vždy vztažena k expresi 2 vybraných endogenních kontrol. Jako endogenní kontroly byly vybrány dva homeboxové geny *B2M* a *RPS6* (tab. 5). Vybrány byly na podkladě jejich stálé a vyrovnané exprese ve všech 3 odebíraných částech mozku potkana.

Tab. 4: Seznam testovaných genů v rámci projektu GA ČR: 14-03708S

Geny	Celý název	Funkce
<b><i>BDNF</i></b>	Brain derived neurotrophic factor	Kóduje proteiny růstového faktoru nervů (Joyce et al., 2004)
<b><i>CARTPT</i></b>	Cocaine And Amphetamine Regulated Transcript protein	Kóduje preproprotein, který je proteolyticky zpracován za vzniku více biologicky aktivních peptidů, které regulují chut k jídlu, energetickou rovnováhu, udržování tělesné hmotnosti a dále se podílejí na vzniku závislosti a stresové reakce (Piechota et al., 2012)
<b><i>DRD3</i></b>	Dopamine Receptor D <sub>3</sub>	Receptor lokalizovaný v limbických oblastech mozku, které jsou spojeny s kognitivními, emocionálními a endokrinními funkcemi (Birbaumer et al., 2005; Szekeres et al., 2004Xu et al., 1997).
<b><i>ESR1</i></b>	Estrogen Receptor 1	Gen kódující estrogenový receptor, ligandem aktivovaný transkripční faktor složený z několika domén důležitých pro vazbu hormonů, DNA vazbu a aktivaci transkripce. (Shiba et al., 2011)
<b><i>FOXP2</i></b>	Forkhead Box P <sub>2</sub>	Gen kódující člena rodiny transkripčních faktorů forkhead/winged-helix. Gen nezbytný pro správný vývoj řečových a jazykových oblastí mozku během embryogeneze (Lai et al., 2003)

<b>GRIN1</b>	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 1	Tyto geny kódují protein je N-metyl-D-aspartátová (NMDA) receptorová podjednotka. NMDA receptory jsou ligandově a napětově závislé a podílejí se na dlouhodobé potenciaci. Aktivně zvyšují účinnost synaptického přenosu, u něhož se předpokládá určitá spojitost s pamětí a učením (Erikson et al., 2010; Kerdsan et al., 2009; Romberg et al., 2009; Sanderson et al., 2011, Sanderson et al., 2007).
<b>GRIN2</b>	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2	
<b>GRIN2a</b>	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A	
<b>IGF1R</b>	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor	Receptor váže IGF s vysokou afinitou a má tyrosinkinázovou aktivitu. Receptor IGF1 hraje rozhodující roli při růstu (Dluzen et al., 2011).
<b>OLR522</b>	Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor	Tento protein se podílí na regulaci apoptózy indukované Fas receptorem (Ma et al., 2005).
<b>NR3</b>	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1	Tento gen kóduje glukokortikoidní receptor, který funguje jako transkripční faktor a jako regulátor jiných transkripčních faktorů. (Pamaudeau et al., 2014; Fukaya et al. 2003)
<b>RPS6KA3</b>	Ribosomal Protein S6 Kinase A3	Aktivita tohoto proteinu souvisí s řízením růstu a diferenciací buněk (Tang et al., 2011).
<b>TACR3</b>	Tachykinin Receptor 3	Tento gen kóduje receptor pro tachykininový neurokinin 3, označovaný také jako neurokinin B (Barros et al., 2013; Topaloglu et al., 2009)

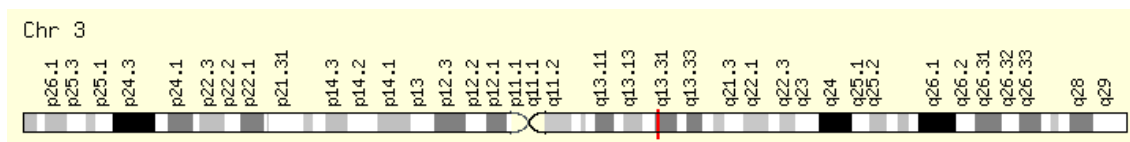
**Tab. 5: Testované endogenní kontroly v rámci projektu GA ČR: 14-03708S** Endogenní kontroly byly testované na stálou expresy ve 3 vybraných částech mozku.

Gen	Název	Stálá exprese
<i>B2M</i>	Beta-2-Microglobulin	ano
<i>RPS6</i>	Retinitis Pigmentosa 6 (X-Linked Recessive)	ano
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl Isomerase A	x
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate Kinase 1	x
<i>GAPDM</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	x

V rámci své diplomové práce jsem se podrobněji zabývala 3 vybranými geny. A to geny *DRD3*, *FOXP2* a *TACR3*.

## I. Gen *DRD3*

Lidské i zvířecí studie naznačují, že dopaminové receptory hrají ústřední roli ve vývoji závislostí a v rozvoji psychotických poruchách vyvolaných konzumací různých látek, např. alkoholu, nikotinu, opioidů, kanabinoidů, kokainu či amfetaminů (Birbaumer et al., 2005; Volkow et al., 2004; Drago et al., 1998) (obr. 8).



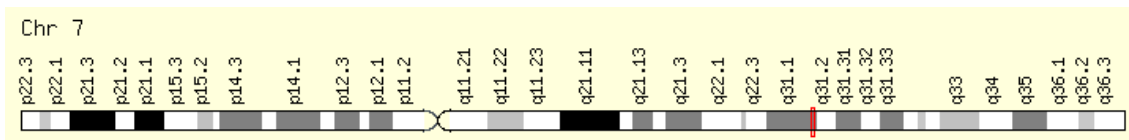
Obr. 8: Umístění genu *DRD3* na lidském chromosomu 3. Naznačeno červeně

Známe 5 dopaminových receptorů, tzv. D<sub>1-5</sub>, které jsou spřaženy s G-proteinem ovlivňujícím aktivitu adenylátcyklázy. Dělíme je do dvou skupin podle toho, zda adenylátcyklázu stimulují prostřednictvím G<sub>s</sub>-proteinu (D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>), nebo inhibují prostřednictvím G<sub>i</sub>-proteinu (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) (Jönsson et al., 2003). Jednotlivé struktury CNS se liší denzitou a zastoupením jednotlivých receptorů. Např. motorické korové oblasti jsou bohaté na D<sub>2</sub>, na rozdíl od limbického systému, kde převládají receptory D<sub>3</sub> a D<sub>4</sub>. Předpokládá se, že genetické varianty dopaminergních receptorů ovlivňuje individuální citlivost na MA a čas nástupu psychózy. MA se v CNS přímo váže na dopaminergní receptory všech podtypů (D<sub>1-5</sub>) (Ujike et al., 2009; Utsunomiya et al., 2008). Primárním účinkem MA je zvýšení koncentrace dopaminu v synaptické štěrbině a aktivace dopaminových receptorů v nucleus accumbens, což je jedním z klíčových mechanismů indukce návyku a odměňování (Ujike et al., 2009; Duberter et al., 1998).

## II. Gen *FOXP2*

Tento gen pro forkhead box protein 2 je svázán se správným vývojem řeči a jazyka. Osoby s chybou v tomto genu trpí tzv. apraxií řeči, což ztěžuje vytváření sekvencí zvuků, slabik a slov (obr. 9). Tento stav je důsledkem abnormalit ve striatu, kde se plánují a koordinují pohyby rtů, úst a jazyka. Děti s dětskou apraxií řeči typicky říkají svá první slova později, jejich řeč je často obtížně srozumitelná, ačkoli se jasnost řeči poněkud zlepšuje v průběhu času. Kromě problémů s vytvářením řeči, mohou mít takto postižení lidé potíže také s porozuměním řeči.

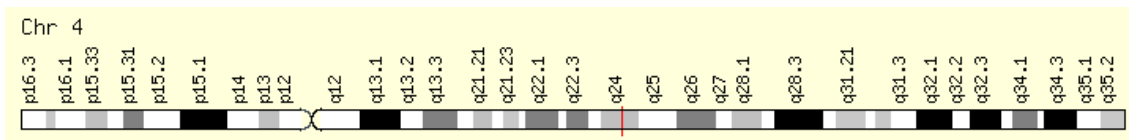
Objevují se problémy se čtením, psáním, pravopisem a gramatikou. Často také dochází ke zpomalení vývoje motorických dovedností, jako jsou chůze či jemná motorika a k poruchám autistického spektra, které je charakterizováno narušením komunikace a sociální interakce (Lai et al., 2003).



**Obr. 9: Umístění genu FOXP2 na lidském chromosomu 7. Naznačeno červeně**

### III. Gen TACR3

Gen *TAC3* kóduje neurokinin B a gen *TACR3* (obr. 10) kóduje jeho receptor. Neurokinin B je vysoce exprimován v hypothalamických neuronech spolu s kisspeptinem. Oba se podílejí na centrální regulaci gonadálních funkcí prostřednictvím gonadotropin-releasing hormonu (GnRH). Neurokinin B, potažmo jeho receptor kódovaný genem *TACR3*, tedy sehrává zásadní roli ve fyziologii puberty (Barros et al., 2013; Topaloglu et al., 2009).



**Obr. 10: Umístění genu TACR3 na lidském chromosomu 4. Naznačeno červeně**

## 4 Materiál

V současné době máme u člověka k dispozici pouze kusé informace z oblasti genetických mechanismů vzniku psychických poruch a z oblasti přenosu drogové závislosti (Shilling et al., 2006). Klinické studie jsou v této problematice převážně zaměřeny na statistické srovnávání. Navíc není prakticky možné udržet dostatečně velkou skupinu dětí prenatalně exponovaných MA až do jejich dospělosti (Behnke et al., 2013). Právě z důvodu omezených možností klinických studií je většina prací o prenatalním působení drog prováděna na zvířecích modelech (Schutová et al., 2013; Šlamberová et al., 2006). Na první pohled se zdá, že vývoj lidí a potkanů je zcela jiný. To je způsobeno především obrovskými rozdíly v délce trvání prenatalního a postnatalního vývoje. Dítě se narodí po devíti měsících (270 dnech) in utero a dospělosti dosáhne přibližně ve 20 letech, zatímco vývoj potkana trvá přibližně 6 týdnů, 3 týdny před (embryonický den (E) 0 až 21) a 3 týdny po porodu (postnatalní den (P) 0 až 21). Nicméně, nápadné podobnosti lze pozorovat v rozvoji mozku a s tím spojené motoriky vztáhneme-li je na časovou osu, kde jednomu dni ve vývoji mláděte potkana odpovídá jeden měsíc vývoje dítěte (tab. 6) (Vinay et al., 2005).

**Tab. 6: Srovnání délky vývojových období potkana a člověka.** Pokusný potkan se dožívá cca 3 let, člověk pak v průměru 80 let. Výpočet:  $(80 \times 365) \div (3 \times 365) = 26,7$  lidských dní odpovídá 1 dni v životě potkana. Zároveň:  $365 \div 26,7 = 13,8$  dnů v životě potkana odpovídá 1 roku života člověka. Převzato a upraveno podle: Sengupta, 2013

Období života	Potkan	Člověk
Délka života	2-3 roky	75-85 let
Odstavení	Mezi 3.-4. týdnem	Po 6-12 měsících
Prepubertální období	4. týden	Mezi 8-10 rokem
Adolescence	5.-10. týden	10-20 let
Dospělost	Od 10.-12. týdne	Od 20. roku
Nástup klimaktéria	Od 16. měsíců	Od 45 roku
Pozdní věk	Od 20. měsíce	Od 60. roku

Oba (dítě i mládě) jsou z pohledu motoriky při narození poměrně nezralí. Potkan ležící v nachýlené poloze je schopen zvednout hlavu v den P2 (Westerga et al., 1990; Altman et al., 1975), což odpovídá zhruba třetímu měsíci u dítěte. V den P5 u potkana se ramena zvedají ze země. To je spojeno s funkčním dozráváním předních končetin, které postupně začínají podporovat váhu přední části těla (Altman et al., 1975). Na konci prvního postnatálního týdne zadní končetiny zatím nejsou schopny podporovat u potkanů váhu pánve. Podpora pomocí tlapy je poprvé pozorována v den P10. Ode dne P12 dále pak zvíře může chodit (Westerga et al., 1990; Altman et al., 1975). A stejně tak batole začíná chodit koncem 1. roku (Vinay et al., 2005).



## 4.1 Zvířata a chov

Společností Anlab (Praque, Czech Republic) byli dovezeni samci (300-400 g) a samice (250-300 g) potkana Wistar z Charles River Laboratories International, Inc. Zvířata byla umístěna do klecí po 4-5 kusech podle pohlaví, místnost s kolonií byla vytápěna na 22 – 24,8 °C a byl zde udržován standardní 12 hodinový cyklus světla a tmy, přičemž světlo se zapínalo vždy v 6.00 hod. Zvířata byla po dobu jednoho týdne ponechána bez vyrušení s přístupem k vodě a krmivu dle libosti. Po uplynutí aklimačního období byly samice zváženy a pomocí vaginálního výtěru byl stanoven jejich estrální cyklus. Fáze estrálního cyklu byla stanovena pro každou pohlavně dospělou samici. Samice na začátku fáze estrus byla na jeden den dána do klece s pohlavně dospělým samcem, vždy jeden pár v jedné kleci (Šlamberová et al., 2005). Následující den byl samicím proveden vaginální stěr. Pokud byly objeveny spermie, byl den fertilizace zapsán jako Den 1 gestace. Samice byly následně vráceny do své původní klece. V Den 21 byla samice přesunuta do vlastní klece. Den narození byl zapsán jako Postnatální den 0 (PD 0). Každá matka se starala přibližně o 12 mláďat. Aby se zabránilo zkreslení, byly matce v den PD 1 většinou přiděleny 3 její vlastní samice a samci a 3 cizí samice a samci od matky s rozdílným zacházením (dále). V PD 21 byla mláďata odstavena a přesunuta do separátních klecí, rozdělená dle pohlaví. Cyklus dne a noci jim byl převrácen a rozsvícení bylo nastaveno na 18.00 hod. Zvířata byla ponechána nerušená až do dospělosti.

Postupy pro zacházení se zvířaty v rámci tohoto experimentu byly přezkoumány a schváleny Ústřední komisí pro ochranu zvířat a jsou v souladu s ustanoveními Vlády a se zákonem č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a s vyhláškou č.311/1997 Sb. Ministerstva zemědělství České republiky.

## 4.2 Podávání drogy a experimentální skupiny

Těhotné samice byly rozděleny do dvou skupin: MA skupina a SAL skupina. Samicím z MA skupiny byl podáván D-metamfetamin hydrochlorid, poskytnutý Farmaceutickou fakultou UK v Hradci Králové, a to v dávce 5 mg/kg. Dávka byla samicím podávána v objemu 0,5 ml/kg podkožně (s.c.) po celou dobu březosti (resp. od prvního do posledního dne gestace) (Šlamberová et al. 2005). Množství podávaného MA bylo zvoleno na podkladě studie Acuff-Smith et al., 1996. Dávky 5 mg/kg vyústí v podobnou koncentraci drogy v mozku potkana, jaká byla zjištěná u dětí žen závislých na MA. Tato dávka byla a je využívána i v dalších pokusech (Šlamberová et al., 2005). Samicím ze SAL skupiny byl podáván 0,9% NaCl roztok s.c. po celou dobu březosti. V den narození, PD 1, byla všechna mláďata označena černým India inkoustem aplikovaným pod kůži. Mláďata z MA skupiny byla označena na levé noze, mláďata ze SAL skupiny pak na noze pravé.

### 4.3 Přístrojová technika, pomůcky a programy

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

Automatická pipeta jednobáňová Biopipette A (Labnet) (1000 – 5000 µl)

Automatické pipety jednobáňové Discovery+ (HTL) (Lab Solution)

(0,1 – 2; 2 – 20; 20 – 200; 100 – 1000 µl)

Centrifuga Z 300 (Hermle)

Centrifuga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Hlubokomrazicí box U410 (New Brunswick)

LabCycler gradient SensoQuest (Scholler)

Laminární box Auramini (Bioair)

Laminární box HERAsafe (Heraeus)

Laminární box CleanAir (Scholler)

Lednička ARC (Whirlpool)

Minicentrifuga Z100 M (Hermle)

Mraznička zásuvková (Whirlpool)

Nanofotometr (Implen)

Powergen 125 (Fisher Scientific)

Stolový vortex (Scientific industrie)

Termocykler C1000TM (Bio-Rad)

Třepačka a inkubátor NB205-QF (N-Biotek)

Váhy digitální 40SM-200A (Precisa)

7000 SDS ABI Prism (Applied Biosystem)

#### **Programy:**

7000 Sequence Detection Software 1.2.3. (Applied Biosystems)

Assays-on-Demand TM (Applied Biosystems)

Genesnap (Syngene)

GraphPad Prism 3

RQ Manager 1.2.1 (TermoFisher Scientific)

TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

## **4.4 Chemikálie, reaktenty a kity**

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

Kyselina octová 99,8 % (Sigma Aldrich)

Chloroform (Sigma Aldrich)

Isopropylalkohol (Sigma Aldrich)

RNase free voda (Sigma Aldrich)

Hydroxid sodný (Sigma Aldrich)

Citronan sodný (Sigma Aldrich)

TRIreagent (Sigma Aldrich)

### **Čištění RNA Dnázou**

DNase I, Amplification Grade (Invitrogen)

### **Reverzní transkripce**

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

### **Kvantitativní PCR**

Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)

TaqMan® Endogenous Controls (Applied Biosystems)

(Rn02112097\_g1; Rn005608665\_m1)

TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

(Rn04220254\_s1; Rn02531967\_s1; Rn01436038\_m1; Rn00561341\_m1; Rn00568514\_m1;  
Rn00561369\_m1; Rn01640372\_m1; Rn00583837\_m1; Rn01456150\_m1; Rn01419234\_m1;  
Rn01645174\_m1; Rn00566955\_m1; Rn00567568\_m1)

## 5 Metodika práce

### 5.1 Izolace RNA

Byla izolována celková RNA (směs mRNA, tRNA a rRNA) z vyoperovaných částí mozku dospělého potkana. Potkanům byly vyoperovány striatum, prefrontální kortex a hipokampus. Každá ze 3 částí byla potopena do vlastní zkumavky s TRI reagent. Tkáň byla homogenizována, centrifugována, promyta chloroformem a vysrážena v isopropanolu. Získaná totální RNA byla použita pro metody DNA microarray hybridizace a real-time PCR.

#### 5.1.2 Vlastní postup

1. TRIreagent byl rozpipetován do zkumavek při pokojové teplotě. Bylo potřeba 1 ml TRIreagentu na 50-100 mg tkáně.
2. Všechny následující kroky izolace probíhaly na ledu.
3. Z potkaního mozku byly odebrány 3 vybrané části. Každá o hmotnosti přibližně 50-100 mg.
4. Kousky mozku byly okamžitě umístěny do 1-2 ml TRIreagentu.
5. Vzorky v TRIreagentu byly homogenizovány za použití homogenizátoru tkání Powergen 125 (Fisher Scientific). Homogenizace probíhala za postupného zvyšování otáček od 5 000 k cca 20 000 za minutu po dobu 30 – 60 sekund. Homogenizace byla prováděna, dokud nevznikl homogenní roztok.
6. Vzorky byly při pokojové teplotě inkubovány 5-10 minut.
7. K vzorkům bylo přidáno 0,2 ml chloroformu na 1 ml použitého TRIreagentu.
8. Vzorky byly po dobu 15-30 sekund ručně promíchávány a následně inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.
9. Vzorky byly stáčeny při 10 000 x g po dobu 15 minut při 4 °C.
10. Horní vodní fáze obsahující celkovou RNA byla opatrně odeberána a umístěna do nových 2 ml ependorfeček. Zbylá organická fáze TRIreagentu byla uskladněna pro izolaci DNA při teplotě 4 °C. Takto může být uchovávána i několik měsíců.
11. RNA byla vysrážena přidáním 0,5 ml isopropylalkoholu na 1 ml použitého TRIreagentu.
12. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 10-30 minut nebo ponechány v -80 °C přes noc.

13. Vzorek byl stáčen při 12 000 x g po dobu 15 minut při 4 °C.
14. Supernatant byl opatrně odeberán a peleta byla promývána 75% ethanolem. Byl použit 1 ml 75% ethanolu na 1 ml použitého TRIreagentu.
15. Vzorek byl stáčen při 12 000 x g po dobu 15 minut při 4 °C.
16. Supernatant byl opatrně odeberán a peleta byla sušena 5-10 minut v laminárním boxu.
17. K peletě bylo přidáno 200-300  $\mu$ l (v závislosti na velikosti pelety) RNase free vody.
18. Celková RNA byla vysrážena přidáním 60  $\mu$ l 2M octanu sodného (RNase free), pH 5.2. Vše bylo dobře promícháno.
19. Ke vzorku byl přidán 1 ml absolutního ethanolu. Vzorek byl umístěn na suchý led nebo do -80 °C. Vzorek v tomto stavu mohl zůstat několik dní až týdnů.
20. Po rozmrazení byl vzorek stočen při 180000 x g po dobu 20-30 minut při 4 °C.
21. Supernatant byl odeberán.
22. Pelety byly promývány 500  $\mu$ l 70% ethanolem a opět stáčeny při 18 000 x g po dobu 20-30 minut při 4 °C.
23. Vzorky byly sušeny 5-10 minut v laminárním boxu.
24. Peleta byla resuspendována v RNase free vodě. Výsledná koncentrace byla 5-7  $\mu$ g/ $\mu$ l.
25. Vzorky byly stočeny, po dobu 5-7 minut zahřívány při 65 °C a zvortexovány.
26. Na spektrofotometru bylo změřeno množství RNA ve vzorku. Na měření optické hustoty A260 byl použit 1  $\mu$ l vzorku, poměr nastaven na A260/A280.
27. Vzorky RNA byly takto připraveny pro další metody a až do použití uloženy do -80 °C.

## 5.2 Úprava vzorku pro metodu DNA microarray hybridizace a real-time PCR

Před použitím vzorku pro metody microarray hybridizace a real-time PCR bylo nutno provést čištění pomocí vysrážení a DNase a následný přepis mRNA do cDNA pomocí reverzní transkripce.

### 5.2.1 Postup čištění vzorku vysrážením

Postup čištění pro přípravu vzorku na zpracování metodou microarray hybridizace.

1. Do nové RNase free microcentrifugační ependorfky, o objemu 340  $\mu$ l, bylo přeneseno 100  $\mu$ g nebo méně RNA.
2. Celková RNA byla vysrážena přidáním 60  $\mu$ l RNase free 2M octanu sodného a dobře promíchána.
3. Pak byl přidán 1 ml absolutního ethanolu a vzorky byly umístěny do -80 °C nebo na suchý led.
4. Vzorky byly ponechány v mrazu dokud zcela neztuhly. Takto zpracované vzorky mohou být v -80 °C ponechány několik týdnů.
5. RNA byla vysrážena stočením vzorku při 18 000 x g po dobu 25 minut při 4 °C.
6. Byl odebrán supernatant.
7. Peleta byla jednou promyta 500  $\mu$ l 70% alkoholu a stočena při 18 000 x g po dobu 25 minut při 4 °C.
8. Peleta RNA byla resuspendována v RNase free vodě, výsledná koncentrace byla 5-7  $\mu$ g/ $\mu$ l.
9. Vzorky byly zvortexovány, krátce stočeny a po dobu 5 minut inkubovány v termocykleru při 65 °C. Pak byly ponechány na ledu.
10. Koncentrace celkové RNA byla změřena na spektrofotometru. Na měření optické hustoty A260 byl použit 1  $\mu$ l vzorku, poměr nastaven na A260/A280.
11. Takto upravené vzorky byly buďto dále zpracovány pomocí reverzní transkripce nabo uchovány při -20 °C až do dalšího zpracování.

## 5.2.2 Přečištění vzorku DNázou

Postup čištění pro přípravu vzorku na zpracování metodou real-time PCR.  
(Postup dle protokolu výrobce.)

1. Dnaza je senzitivní k fyzické denaturaci, tudíž se nevortexuje. Mícháme opatrně protřepáním zkumavky či pipetováním a krátce stáčíme.
2. Pro přečištění vzorku byl použit 1  $\mu$ l DNázy na 8  $\mu$ l vzorku.
3. Vzorky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě.
4. Poté byl ke každému vzorku přidán 1  $\mu$ l 50mM Stop Solution (EDTA).
5. Vzorky byly inkubovány v termocykleru 10 minut při 70 °C.
6. Koncentrace celkové RNA byla změřena na spektrofotometru. Na měření optické hustoty A260 byl použit 1  $\mu$ l vzorku, poměr nastaven na A260/A280.
7. Takto upravené vzorky byly dále zpracovány pomocí reverzní transkripce nebo uchovány při -20 °C až do dalšího zpracování.



### 5.2.3 Reverzní transkripce

Přepis mRNA do cDNA pomocí High Capacity cDNA Kit. (Postup dle protokolu výrobce.)

1. Podle koncentrace RNA ve vzorcích byl připraven RT mix (tab. 7) na 20  $\mu$ l reakce.
2. Bylo přidáno tolik RNA, aby její celkové množství v reakci bylo do 2  $\mu$ g.
3. Reakční směs byla doplněna DNase free vodou do 20  $\mu$ l, promíchána a krátce stočena.
4. Vzorky byly umístěny do termocykleru s nastaveným programem pro reverzní transkripci (tab. 8).

**Tab. 7: Příprava reakční směsi pro reverzní transkripci**

Reakční komponenta	Objem v $\mu$ l
2 x RT pufr	10 $\mu$ l
20 x RT enzyme Mix	1 $\mu$ l
Vzorek	Do 9 $\mu$ l (do 2 $\mu$ g)
DNase free voda	Do 20 $\mu$ l celkového objemu
Celkový objem	20 $\mu$ l

**Tab. 8: Nastavení termocykleru pro reverzní transkripci.**

Reakční krok	Teplota v $^{\circ}$ C	Čas
Hybridizace	37	60 min
Reverzní transkripce	95	5 min
Inaktivace enzymu	4	$\infty$

## 5.3 Genotypizace vzorku metodou micro-array hybridizace

Metoda byla prováděna na Akademii věd, v laboratořích ÚMG na oddělení buněčné biologie. Byla předána celková RNA z hipokampu a striata. Z prefrontálního kortexu se z důvodu omezených zdrojů na metodu žádné vzorky neposílaly. Na ÚMG byly po zjištění složení a koncentrace složek vybrány nejčistší vzorky, vždy 3 MA na 3 SAL vzorky od příslušného potkana. Na podkladě výsledků z microarray hybridizace bylo zvoleno 13 genů testovaných metodou real-time PCR.

### 5.3.1 Analýza rozptylu

Jde o variantu t-testu, kdy se mezi sebou srovnávají více jak 2 skupiny dat. Analýza rozptylu tzv. ANOVA test (Analysis of variance) je metoda umožňující ověřit, zda na hodnotu náhodné veličiny pro určitý vzorek má statisticky významný vliv hodnota některého pozorovatelného znaku. Tento znak slouží k rozdělení vzorků do vzájemně porovnávaných skupin a musí nabývat jen konečného počtu možných hodnot (nejméně 2). Kvantitativní hodnota znaku přitom nemá povahu míry. ANOVA test probíhá v zásadě ve 2 krocích. Nejprve zjišťujeme, zda mezi skupinami existuje nějaká odlišnost. Pokud ano, v dalším kroku zjišťujeme mezi kterými skupinami se tato odlišnost nachází (Šerek, 2013). Pomocí této statistické metody byla určena kritická hodnota (s určitou hladinou významnosti) a byla testována statistická významnost nalezených rozdílů mezi skupinami.

## 5.4 Měření genové exprese metodou Real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z nejmocnějších technologií molekulární biologie. Pomocí PCR mohou být specifické sekvence v templátu DNA nebo cDNA kopírovány, resp. amplifikovány až miliónkrát s použitím sekvencně specifických oligonukleotidů, tepelně stabilní DNA polymerázy a tepelného cyklu. V kvantitativní real-time PCR se v každém cyklu měří PCR produkt. Monitorováním reakcí během exponenciální amplitudy reakce uživatel může s velkou přesností určit počáteční množství targetu. Detekce množství DNA je možná díky fluorescenčnímu substrátu, který se specificky váže na přítomnou DNA. Fluorescence je vyzařovaná substrátem až po jeho navázání na DNA, nikoliv volným substrátem. Hladina fluorescence substrátu odráží množství přítomné DNA. Real-time PCR se obvykle provádí v 96 jamkových destičkách a fluorescence je odečítána z každé jamky zvlášť. Pro detekci cílové DNA je Real-time PCR vysoce citlivou metodou a pokud jsou využity specifické fluorescenční substráty, tak je to i metoda vysoce specifická. V rámci našeho pokusu bylo pracováno se TaqMan® assayemi. Signál assaye je v časných PCR cyklech detekován pouze nízký. Tato počáteční data, automaticky odečtená v programu real-time PCR, se nazývají fluorescenční práh. Pokud vzorek obsahuje hledaný target, nakonec se vytvoří dostatečné množství štěpené assaye, aby vytvořila dostatečně silný signál překračující fluorescenční práh.

## 5.4.1 Postup real-time PCR amplifikace

Pro každý sledovaný gen byla připravena reakční směs (tab. 9). Množství směsi bylo upraveno dle počtu měřených vzorků se započítanou negativní kontrolou a vše násobeno neb reakce byla pipetována v tripletech.

(Postup dle protokolu výrobce.)

1. Vzorek cDNA byl 10 x naředěn RNase free vodou a rozpipetován do 96 jamkové destičky.
2. Destička byla stočena při 500 x g po dobu 2 minut.
3. K 10  $\mu$ l cDNA bylo přidáno 15  $\mu$ l reakční směsi.
4. Destička byla přelepena fólií a stočena při 2 000 x g po dobu 2 minut.
5. Amplifikace proběhla v přístroji 7000 SDS ABI Prism dle nastaveného teplotního programu (tab. 10).

**Tab. 9: Reakční směs pro jednu reakci real-time PCR.**

Reakční komponenta	Objem v $\mu$ l
TaqMan® Gene Exp. Master Mix (2x)	25 $\mu$ l
TaqMan® Gene Exp. Assay (20x)	2.5 $\mu$ l
Vzorek (cDNA templát)	10-100ng
RNase free voda	Do 50 $\mu$ l celkového objemu
Celkový objem do reakce	50 $\mu$ l

**Tab. 10: Teplotní program pro real-time PCR amplifikaci. UNG – uracil-N-glykosyláza.**

Reakční krok	Teplota v $^{\circ}$ C	Čas	
Aktivace UNG	50	2 minut	
Aktivace polymerazy	95	10 minut	
Denaturace	95	15 vteřin	Opakovat
Hybridizace a elongace	60	1 minut	50 x

## 5.4.2 Kvantifikace genové exprese

Data z real-time PCR reakce byla vyhodnocena pomocí programu RQ Manager 1.2.1 (ThermoFisher Scientific), z něhož byly získány hodnoty pro  $C_T$  (threshold cycle). Tyto hodnoty odpovídají cyklu PCR reakce, ve kterém došlo k překročení fluorescenčního prahu. Relativní genová exprese byla analyzována komparativní  $C_T$  metodou. Pro stanovení hodnot  $\Delta C_T$  byly analyzované geny normalizované vůči endogenní kontrole.

## 5.4.3 Statistické vyhodnocení metody real-time PCR

Statistické analýzy a grafické znázornění byly zpracovány programem GraphPad Prism 3 (GraphPad Software). Normální distribuce hodnot byla vyhodnocena D'Agostino-Pearsonovým testem. Jelikož byly hodnoty nerovnoměrně distribuovány, byl pro výpočet použit neparametrický Mann-Whitneyho U test. Vzájemný vztah dvou veličin byl definován prostřednictvím parametrického Pearsonova či neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu. Za statisticky signifikantní hodnotu byla považována hladina významnosti  $p < 0,05$ .

### 5.4.3.1 Metoda kvantifikace s kalkulací efektivity PCR

Během relativní kvantifikaci genové exprese byla porovnávána relativní změna genové exprese ve více vzorcích. Jako kontrolní (endogenní geny) byly vybrány geny *B2M* a *RPS6*. Byly zjišťovány změny v množství mRNA testovaného vzorku oproti endogenní kontrole. Pro výpočet relativní kvantifikace genové exprese byla použita metoda kvantifikace s kalkulací efektivity PCR tzv. Pfafflova metoda. Protože tato metoda bere v úvahu možný rozdíl mezi rychlostí a efektivitou amplifikace jednotlivých genů, musí být před jejím použitím nejprve stanovena efektivita PCR reakce jak pro sledovaný gen, tak pro endogenní kontrolu.

Nejprve tedy byla sestrojena kalibrační křivka, kdy z rovnice regresní přímky kalibrační křivky byla vypočtena efektivita reakce (Pfaffl, 2001) podle vzorce:

$$E = 10^{\frac{1}{\text{směrnice přímky}}}$$

Pro výpočet  $\Delta C_T$  se vypočítá rozdíl mezi geny a endogenní kontrolou u jednotlivých experimentálních vzorků (Pfaffl, 2001). Výpočet poměru množství cílového genu ku endogenní kontrole:

$$RQ = \frac{E_{\text{sledovaný gen}}^{\Delta C_T \text{ sledovaný gen (endogenní kontrola - sledovaný gen)}}}{E_{\text{endogenní kontrola}}^{\Delta C_T \text{ sledovaný gen (endogenní kontrola - sledovaný gen)}}$$

### 5.4.3.2 Mann-Whitneyův U test

Jde o neparametrickou variantu t-testu se skoro stejnou silou v případě normálního rozložení dat. Předpokladem je tvrzení, že  $X > Y = Y > X$ . Vypočítaná statistika má přibližně normální rozdělení. Přičemž u malých počtů jsou hodnoty tabelovány zvlášť. Byla spočítána U statistika pro první sadu měření. Hodnoty z obou sad měření se seřadily dle velikosti. Přičemž hodnota  $U_1$  byla součtem hodnot ze sady 2, které byly nižší než jednotlivé prvky sady 1.

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2}$$

*Kdy  $R_1$  je součet pořadí skupiny 1.*

Následně jsme provedli normalizaci pomocí vzorce:

$$z = \frac{U - m_U}{\delta_U}$$

*Kdy  $z$  je normalizovaná statistika.*

$$m_U = \frac{n_1 n_2}{2}$$

*Kdy  $m_U$  je průměr U statistiky.*

$$\delta_U = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

*Kdy  $\delta_U$  je směrodatná odchylka U statistiky.*

Vypočtená statistika byla porovnána s tabelovými hodnotami pro Mann-Whitneyův U test.

## 6 Výsledky s dokumentací

V rámci projektu GA ČR: 14-03708S byly statisticky vyhodnocovány výsledky microarray hybridizace a výsledky pro 13 genů testovaných ve 3 částech mozku metodou real-time PCR. Ze statistického vyhodnocení microarray hybridizace nevyšla změněná exprese u žádného z testovaných genů signifikantně. Ze 3 testovaných částí mozku byla nalezena signifikantně změněná genová exprese jen ve striatu. V prefrontálním kortexu však byl nalezen jeden z genů na hranici signifikance. Statistická významnost byla vypočítána pro každý z testovaných genů a vztažena ku oběma endogenním kontrolám (tab. 11). Po statistickém vyhodnocení real-time PCR byla signifikantně změněná exprese nalezena u 2 genů vztaženým ku 1 z používaných endogenních kontrol. Signifikantně zvýšená genová exprese u genu *DRD3* a *TACR3* byla nalezena ve striatu. U genu *FOXP2* byly naměřeny hraniční hodnoty pro sníženou genovou expresi v prefrontálním kortexu. Dá se předpokládat, že to zapříčinil příliš malý vzorek testovaných subjektů. Všechny testované geny byly pipetovány na 96 jamkovou destičku v tripletech, endogenní kontroly v dupletech. Pro účely této diplomové práce jsou uvedeny výsledky ze statistického vyhodnocení real-time PCR pro geny *DRD3*, *TACR3* a *FOXP2*.

**Tab. 11: Tabulka p hodnot pro 3 testované geny vztažené ke 2 endogenním kontrolám ve 3 částech mozku. Zeleně zvýrazněny statisticky signifikantní změny. \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* -  $p \leq 0,001$**

Část mozku/gen	<i>FOXP2</i> ku		<i>DRD3</i> ku		<i>TACR3</i> ku	
	<i>B2M</i>	<i>RPS6</i>	<i>B2M</i>	<i>RPS6</i>	<i>B2M</i>	<i>RPS6</i>
Striatum	0,5054	0,4418	* 0,0148	0,879	** 0,0023	0,9497
Prefrontální kortex	0,3282	* 0,0281	0,8785	0,879	0,3823	0,9591
Hipokampus	0,6454	0,7984	0,7209	X	0,8785	0,1304



## 6.1 Výsledky testování genu *DRD3*

Bylo testováno 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených metamfetaminu ku 8 dospělým potkanům prenatalně vystaveným fyziologickému roztoku. Z každého potkana byly odebrány 3 části mozku a v nich byla testována změna genové exprese pro gen *DRD3* vztažená k endogenní kontrole *B2M* (graf 2) a *RPS6* (graf 3).

Změněná genová exprese ve smyslu zvýšení exprese genu *DRD3* byla nalezena ve striatu v porovnání s endogenní kontrolou *B2M* (tab. 12 a 13). Výsledky pro endogenní kontrolu *RPS6* nebyly statisticky významné (tab. 14 a 15).

**Tab. 12: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *DRD3* ku *B2M*; Striatum. KS – potkani kontrolní, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>DRD3</i> ku <i>B2M</i>
1 KS	0,000196
2 KS	0,000074
3 KS	0,000334
4 KS	0,000553
5 KS	0,002220
6 KS	0,002570
7 KS	0,001840
8 KS	0,004268

**Tab. 13: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *DRD3* ku *B2M*; Striatum. MS – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>DRD3</i> ku <i>B2M</i>
1 MS	0,006939
2 MS	0,004401
3 MS	0,003594
4 MS	0,007115
5 MS	0,005152
6 MS	0,002026
7 MS	0,002459
8 MS	0,002084

**Tab. 14: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen DRD3 ku RPS6; Striatum. MS – potkání kontrolní, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA DRD3 ku RPS6
1 KS	0,000903
2 KS	0,000425
3 KS	0,001889
4 KS	0,003983
5 KS	0,005417
6 KS	0,014486
7 KS	0,007640
8 KS	0,019822

**Tab. 15: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen DRD3 ku RPS6; Striatum. MS – potkání prenatalně vystavení metamfetaminu, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA DRD3 ku RPS6
1 MS	0,018695
2 MS	0,015680
3 MS	0,005839
4 MS	0,009215
5 MS	0,016948
6 MS	0,009709
7 MS	0,005294
8 MS	0,004240

V prefrontálním kortexu (tab. 16, 17 a 18, 19) a v hipokampu (tab. 20 a 21) nebyla nalezena žádná statisticky významná změna exprese. V hipokampu navíc došlo k chybě během real-time PCR při srovnání genu *DRD3* s endogenní kontrolou *RPS6* a data nebylo možno vyhodnotit. Danou metodu nebylo možno opakovat z důvodu malého množství testovaného vzorku.

**Tab. 16: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *DRD3* ku *B2M*; Prefrontální kortex. KP – potkani kontrolní, prefrontální kortex**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>DRD3</i> ku <i>B2M</i>
1 KP	0,0008962
2 KP	0,0004363
3 KP	0,0005110
4 KP	0,0002429
5 KP	0,0002784
6 KP	0,0002995
7 KP	0,0014170
8 KP	0,0006515

**Tab. 17: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *DRD3* ku *B2M*; Prefrontální kortex. MP – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>DRD3</i> ku <i>B2M</i>
1 MP	0,000128
2 MP	0,000432
3 MP	0,000359
4 MP	0,000380
5 MP	0,001450
6 MP	0,000326
7 MP	0,000727
8 MP	0,003725

**Tab. 18: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen DRD3 ku RPS6; Prefrontální kortex. KP – potkani kontrolní, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA DRD3 ku RPS6
1 KP	0,002013
2 KP	0,001203
3 KP	0,000674
4 KP	0,001657
5 KP	0,000696
6 KP	0,001075
7 KP	0,000486
8 KP	0,001304

**Tab. 19: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen DRD3 ku RPS6; Prefrontální kortex. MP – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA DRD3 ku RPS6
1 MP	0,000384
2 MP	0,001253
3 MP	0,000492
4 MP	0,000605
5 MP	0,002152
6 MP	0,000668
7 MP	0,001335
8 MP	0,008293

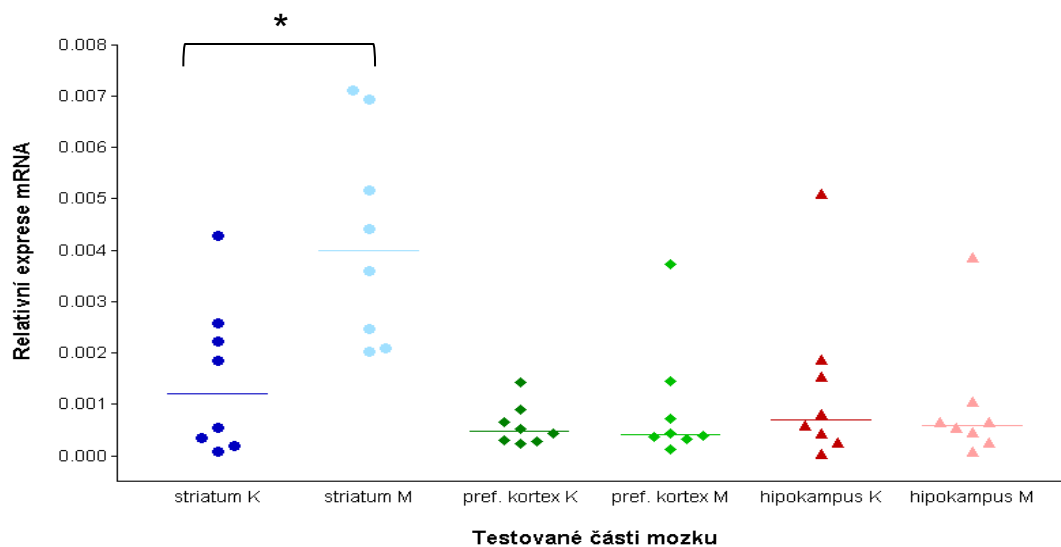
**Tab. 20: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen DRD3 ku B2M; Hipokampus. KH – potkani kontrolní, hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA DRD3 ku B2M
1 KH	0,000261
2 KH	0,005094
3 KH	0,001546
4 KH	0,000034
5 KH	0,000818
6 KH	0,000429
7 KH	0,000578
8 KH	0,001876

**Tab. 21: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen DRD3 ku B2M; Hipokampus. MH – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, hipokampus.**

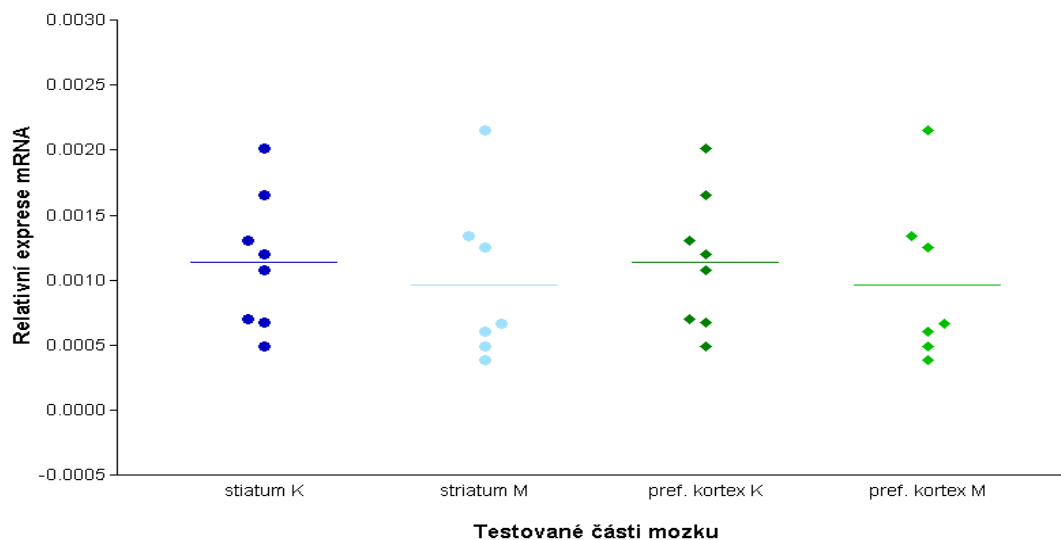
<b>Testovaný potkan</b>	<b>Relativní exprese mRNA DRD3 ku B2M</b>
1 MH	0,000646
2 MH	0,003855
3 MH	0,000654
4 MH	0,000068
5 MH	0,000257
6 MH	0,000539
7 MH	0,000447
8 MH	0,001055

### Vztah relativní exprese mRNA DRD3 ku B2M



**Graf 2: Srovnání relativní exprese mRNA genu DRD3 ku B2M ve všech 3 částech mozku.**  
 Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu.

### Vztah relativní exprese mRNA DRD3 ku RP6S



**Graf 3: Srovnání relativní exprese mRNA genu DRD3 ku RPS6 ve 2 částech mozku.**  
 Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu.

## 6.2 Výsledky testování genu *TACR3*

Bylo testováno 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených metamfetaminu ku 8 dospělým potkanům prenatalně vystaveným fyziologickému roztoku. Z každého potkana byly odebrány 3 části mozku a v nich byla testována změna genové exprese pro gen *TACR3* vztažená k endogenní kontrole *B2M* (graf 4) a *RPS6* (graf 5).

Změněná genová exprese ve smyslu zvýšení exprese genu *TACR3* byla nalezena ve striatu v porovnání s endogenní kontrolou *B2M* (tab. 22 a 23). Výsledky pro endogenní kontrolu *RPS6* nebyly statisticky významné (tab. 24 a 25). Během přípravy real-time PCR došlo k chybě, kterou pro male množství vzorku již nebylo možné napravit. Proto hodnoty z real-time PCR ze striata pro kontrolní potkany č. 6 a 8 ku oběma endogenním kontrolám a pro potkana č. 6 prenatalně vystaveného metamfetaminu ku endogenní kontrole *B2M* nemáme k dispozici.

**Tab. 22: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *TACR3* ku *B2M*; Striatum. KS – potkani kontrolní, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>TACR3</i> ku <i>B2M</i>
1 KS	0,000199
2 KS	0,000899
3 KS	0,001983
4 KS	0,000463
5 KS	0,001483
6 KS	
7 KS	0,002549
8 KS	

**Tab. 23: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku B2M; Striatum. MS – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M
1 MS	0,002140
2 MS	0,003171
3 MS	0,008618
4 MS	0,012855
5 MS	0,009024
6 MS	
7 MS	0,009774
8 MS	0,007400

**Tab. 24: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku RPS6; Striatum. KS – potkani kontrolní, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku RPS6
1 KS	0,021725
2 KS	0,013112
3 KS	0,008266
4 KS	0,020767
5 KS	0,006352
6 KS	
7 KS	0,0430004
8 KS	

**Tab. 25: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku RPS6; Striatum. MS – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku RPS6
1 MS	0,007314
2 MS	0,011033
3 MS	0,015117
4 MS	0,020386
5 MS	0,032148
6 MS	0,029976
7 MS	0,012245
8 MS	0,008410



V prefrontálním kortexu (tab. 26, 27 a 28, 29) a v hipokampu (tab. 30, 31 a 32, 33) nebyla nalezena žádná statisticky významná změna exprese.

**Tab. 26: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku B2M; Prefrontální kortex. KP – potkani kontrolní, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M
1 KP	0,026902
2 KP	0,021153
3 KP	0,013624
4 KP	0,007722
5 KP	0,017640
6 KP	0,018864
7 KP	0,011187
8 KP	0,049032

**Tab. 27: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku B2M; Prefrontální kortex. MP – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M
1 MP	0,010299
2 MP	0,017285
3 MP	0,030100
4 MP	0,036795
5 MP	0,027524
6 MP	0,022839
7 MP	0,032275
8 MP	0,014776

**Tab. 28: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku RPS6; Prefrontální kortex. KP – potkani kontrolní, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku RPS6
1 KP	0,042029
2 KP	0,048426
3 KP	0,019163
4 KP	0,007722
5 KP	0,039465
6 KP	0,054867
7 KP	0,031460
8 KP	0,049032

**Tab. 29: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku RPS6; Prefrontální kortex. MP – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku RPS6
1 MP	0,031661
2 MP	0,046072
3 MP	0,037380
4 MP	0,047693
5 MP	0,040817
6 MP	0,047384
7 MP	0,046922
8 MP	0,032525

**Tab. 30: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku B2M; Hipokampus. KH – potkani kontrolní, hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M
1 KH	0,004843
2 KH	0,006323
3 KH	0,021862
4 KH	0,016587
5 KH	0,014084
6 KH	0,015066
7 KH	0,140301
8 KH	0,034034

**Tab. 31: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku B2M; Hipokampus. MH – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu, hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M
1 MH	0,007103
2 MH	0,004453
3 MH	0,026240
4 MH	0,037691
5 MH	0,008053
6 MH	0,009180
7 MH	0,019049
8 MH	0,023105

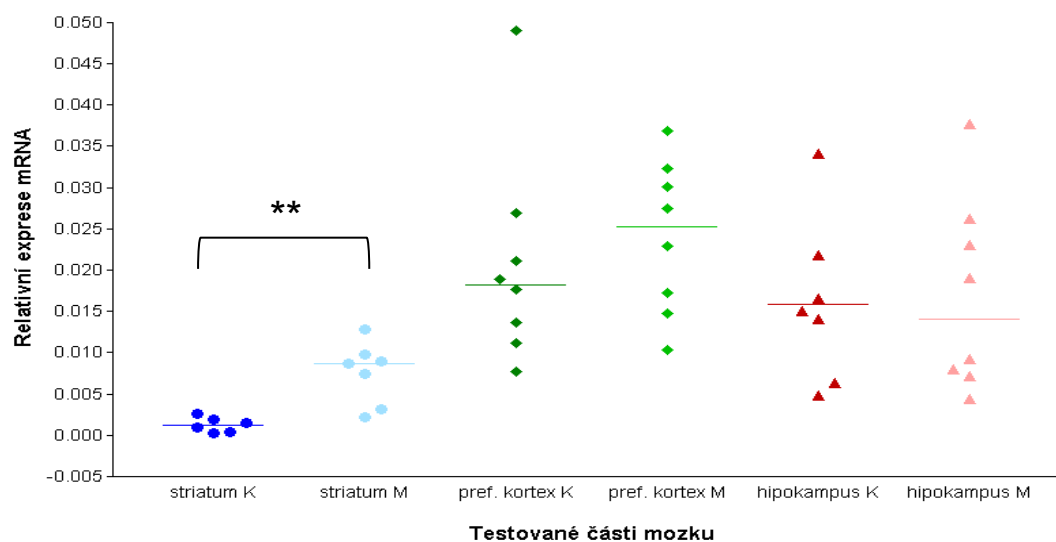
**Tab. 32: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku RPS6; Hipokampus. KH – potkani kontrolní, hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku RPS6
1 KH	0,017389
2 KH	0,014707
3 KH	0,045290
4 KH	0,016587
5 KH	0,031545
6 KH	0,036406
7 KH	0,034165
8 KH	0,034034

**Tab. 33: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen TACR3 ku RPS6; Hipokampus. MH – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu, hipokampus.**

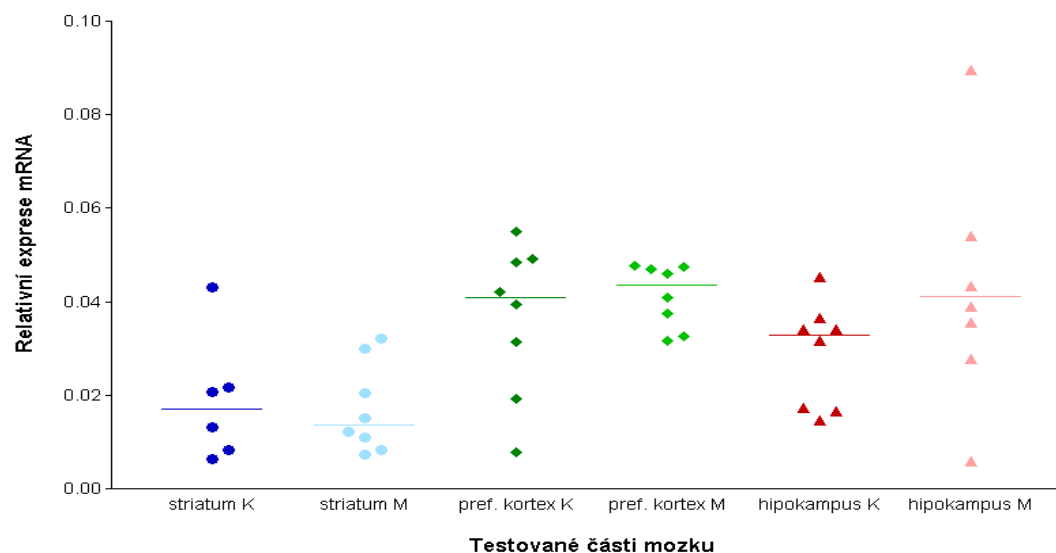
Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA TACR3 ku RPS6
1 MH	0,035489
2 MH	0,005821
3 MH	0,038831
4 MH	0,089357
5 MH	0,348527
6 MH	0,027633
7 MH	0,043267
8 MH	0,053980

### Vztah relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M



**Graf 4: Srovnání relativní exprese mRNA genu TACR3 ku B2M ve všech 3 částech mozku.** Pref. cortex – prefrontální cortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu.

### Vztah relativní exprese mRNA TACR3 ku RP6S



**Graf 5: Srovnání relativní exprese mRNA genu TACR3 ku RPS6 ve všech 3 částech mozku.** Pref. cortex – prefrontální cortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu.

### 6.3 Výsledky testování genu *FOXP2*

Bylo testováno 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených metamfetaminu ku 8 dospělým potkanům prenatalně vystaveným fyziologickému roztoku. Z každého potkana byly odebrány tři části mozku a v nich byla testována změna genové exprese pro gen *FOXP2* vztážená k endogenní kontrole *B2M* (graf 6) nebo *RPS6* (graf 7).

Hraniční změněná genová exprese ve smyslu snížení exprese genu *FOXP2* byla nalezena v prefrontálním kortexu v porovnání s endogenní kontrolou *RPS6* (tab. 36 a 37). Výsledky pro endogenní kontrolu *B2M* nebyly statisticky významné (tab. 34 a 35).

**Tab. 34: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *FOXP2* ku *B2M*; Prefrontální kortex. KP – kontrolní potkani, prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>FOXP2</i> ku <i>B2M</i>
1 KP	0,014874
2 KP	0,028174
3 KP	0,028646
4 KP	0,028255
5 KP	0,024070
6 KP	0,043772
7 KP	0,028875
8 KP	0,031779

**Tab. 35: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen *FOXP2* ku *B2M*; Prefrontální kortex. MP – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu; prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA <i>FOXP2</i> ku <i>B2M</i>
1 MP	0,032085
2 MP	0,013092
3 MP	0,031334
4 MP	0,014340
5 MP	0,019741
6 MP	0,029270
7 MP	0,013034
8 MP	0,027780

**Tab. 36: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku RPS6; Prefrontální kortex. KP – potkani kontrolní; prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku RPS6
1 KP	0,030212
2 KP	0,087309
3 KP	0,066024
4 KP	0,159017
5 KP	0,068256
6 KP	0,103481
7 KP	0,086637
8 KP	0,053837

**Tab. 37: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku RPS6; Prefrontální kortex. MP – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu; prefrontální kortex.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku RPS6
1 MP	0,077812
2 MP	0,045157
3 MP	0,038487
4 MP	0,017076
5 MP	0,028261
6 MP	0,066585
7 MP	0,018623
8 MP	0,054044

Ve striatu (tab. 38, 39 a 40, 41) a v hipokampu (tab. 42, 43 a 44, 45) nebyla nalezena žádná statisticky významná změna exprese.

**Tab. 38: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku B2M; Striatum. KS – potkani kontrolní; striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku B2M
1 KS	0,052034
2 KS	0,001660
3 KS	0,013378
4 KS	0,021918
5 KS	0,033075
6 KS	0,067477
7 KS	0,030599
8 KS	0,119453

**Tab. 39: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku B2M; Striatum. MS – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu; striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku B2M
1 MS	0,052341
2 MS	0,025278
3 MS	0,012275
4 MS	0,020928
5 MS	0,022113
6 MS	0,037304
7 MS	0,025760
8 MS	0,014135

**Tab. 40: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku RPS6; Striatum. KS – potkani kontrolní; striatum; *Odlehlá hodnota***

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku RPS6
1 KS	12,160380
2 KS	0,010687
3 KS	0,014154
4 KS	0,116967
5 KS	0,058878
6 KS	0,937371
7 KS	0,095301
8 KS	2,402490

**Tab. 41: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku RPS6; Striatum. MS – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu; striatum.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku RPS6
1 MS	0,163889
2 MS	0,093730
3 MS	0,027377
4 MS	0,031317
5 MS	0,091964
6 MS	0,115068
7 MS	0,067897
8 MS	0,042585

**Tab. 42: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku B2M; Hipokampus. KH – potkani kontrolní; hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku B2M
1 KH	0,012178
2 KH	0,072410
3 KH	0,006157
4 KH	0,004741
5 KH	0,006614
6 KH	0,007287
7 KH	0,006570
8 KH	0,009959

**Tab. 43: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku B2M; Hipokampus. MH – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu; hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku B2M
1 MH	0,010678
2 MH	0,002277
3 MH	0,002169
4 MH	0,004919
5 MH	0,012074
6 MH	0,013878
7 MH	0,005932
8 MH	0,010969



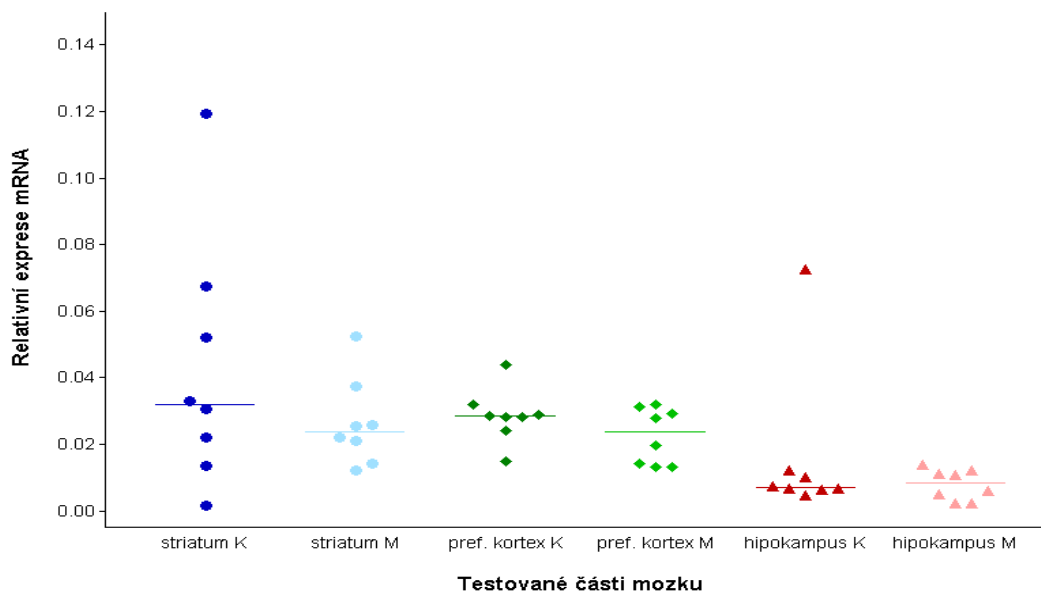
**Tab. 44: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku RPS6; Hipokampus. KH – potkani kontrolní; hipokampus.**

Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku RPS6
1 KH	0,065081
2 KH	0,158814
3 KH	0,015178
4 KH	0,011403
5 KH	0,021837
6 KH	0,029386
7 KH	0,013450
8 KH	0,028895

**Tab. 45: Tabulka výsledků relativní exprese mRNA pro testovaný gen FOXP2 ku RPS6; Hipokampus. MH – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu; hipokampus.**

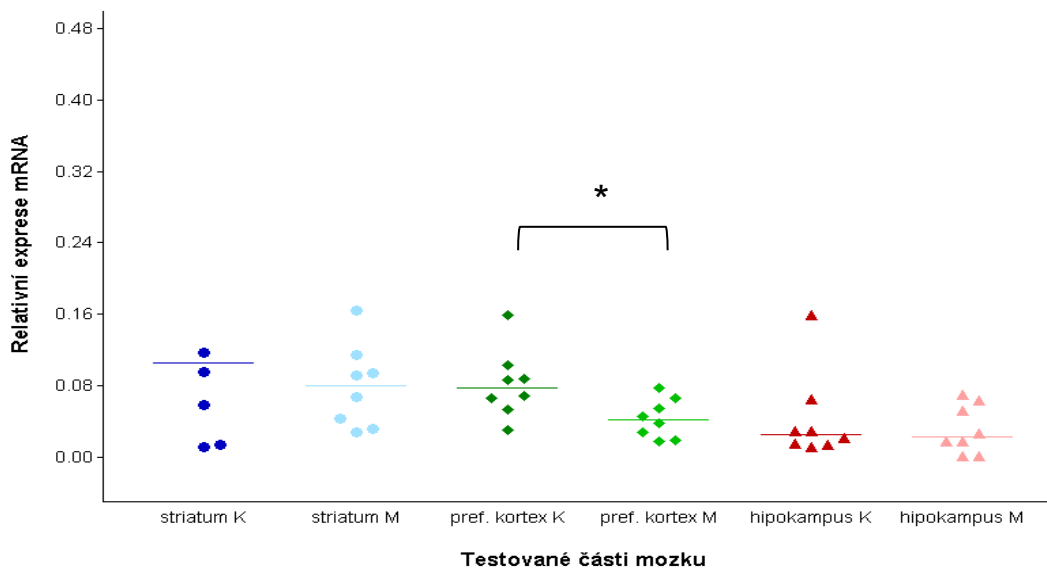
Testovaný potkan	Relativní exprese mRNA FOXP2 ku RPS6
1 MH	0,052462
2 MH	0,001648
3 MH	0,001710
4 MH	0,017065
5 MH	0,063938
6 MH	0,070163
7 MH	0,018256
8 MH	0,026506

### Vztah relativní exprese mRNA FOXP2 ku B2M



**Graf 6:** Srovnání relativní exprese mRNA genu FOXP2 ku B2M ve všech 3 částech mozku. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu.

### Vztah relativní exprese mRNA FOXP2 ku RP6S



**Graf 7:** Srovnání relativní exprese mRNA genu FOXP2 ku RPS6 ve všech 3 částech mozku. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatalně vystavení metamfetaminu.

## 7 Diskuse

V současné době je studován význam prenatálního ovlivnění MA. Výsledky studií by nám dopomohly k objasnění patogeneze či se staly spolehlivými ukazateli celkové aktivity MA v organizmu prenatálně ovlivněného dítěte. Cílem projektu GA ČR: 14-03708S bylo zanalyzovat vybrané geny. Pro účely této diplomové práce by vybrány geny *DRD3*, *TACR3* a *FOXP2*, a pokusit se potvrdit hypotézu, že je jejich exprese změněna v mozku u dětí závislých matek. Pokusila jsem se zhodnotit jejich možné asociace s psychomotorickým vývojem a případným orgánovým postižením těchto dětí. V této práci, na kterou bude plynule navazovat další výzkum naší laboratoře, jsme se zaměřili na hodnocení hladin exprese genů ve vztahu k endogenní kontrole ve vybraných částech mozku, ve striatu, hipokampu a prefrontálním kortexu. Tyto geny byly testovány u dospělých potkanů prenatálně vystavených MA a u kontrolní skupiny a výsledky mezi sebou srovnány.

Náš výzkum vycházel z tvrzení předchozích studií, že dopaminové receptory D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> a D<sub>4</sub> jsou silně provázány s účinky MA, kdy hrají hlavní roli ve vývoji závislosti a v rozvoji psychotických poruch vyvolaných konzumací MA (Volkow et al., 2004; Drago et al., 1998). Studie dětí mladšího školního věku prenatálně vystavených MA ukazují na problémy se sociálním začleněním, vycházením s okolím (Billing et al., 1994), jejich psychický stav je asociován s depresemi, úzkostnými stavy a emocionální nestabilitou (LaGasse et al., 2012; Barkus et al., 2010), u těchto dětí se často rozvíjí poruchy chování spojené s agresivitou (Eze et al., 2015; Blair et al., 2001). Předpokládáme, že zásadní roli hraje právě prenatální ovlivnění dopaminových receptorů a změna jejich exprese v mozku. V rámci našeho výzkumu jsme prokázali statisticky signifikantní zvýšení genové exprese ve striatu u genu *DRD3* vůči endogenní kontrole *B2M*.

Je prokázáno, že po prenatálním vystavení MA se rodí menší děti s nižší porodní hmotností (Smith et al., 2006). Po 3 roce života jsou stále menší, než jejich vrstevníci (Zabaneh et al., 2012). Předpokládá se, že zhoršený růst v novorozeneckém období může u těchto dětí vést ke zhoršení jejich zdravotního stavu v dospělosti (Smith et al., 2016). Gen *TAC3* kóduje neurokinin B a gen *TACR3* kóduje jeho receptor, jsou vysoce exprimovány v hypothalamických jádrech. Zvýšená hladina neurokininu B byla nalezena u těhotenství s preeklampií a intrauteriní růstovou retardací (IUGR). Zároveň v těchto rizikových těhotenstvích korelovala zvýšená hladina neurokininu B se zvýšenou hladinou

metabolitu oxidu dusnatého, což může být kompenzační mechanismus pro zlepšení průtoku krve do uteroplacentární jednotky (D'anna et al., 2004). Placentární metabolismus užívání MA silně ovlivňuje. V děloze vyvolává morfologické poškození placenty (Plotka et al., 2014), často dochází ke snížení průtoku krve a tím i kyslíku (Vavříková et al., 2001a). Proto předpokládáme, že námi naměřená zvýšená exprese genu *TACR3* souvisí s biologickou odpovědí plodu na IUGR způsobenou mateřským užíváním MA.

Gen kódující správný vývoj řeči a jazyka, *FOXP2*, v našich testech vyšel s hraničně sníženou expresí v prefrontálním kortexu vůči endogenní kontrole *RPS6*. Osoby s tzv. apraxií řeči mají často narušený gen *FOXP2*, případně porušené centrum příjmu ve striatu, kde se plánují a koordinují pohyby rtů, úst a jazyka. Kromě problémů s vytvářením řeči se objevují také potíže s porozuměním řeči, problémy se čtením, psaním, pravopisem a gramatikou. Studie dětí prenatálně vystavených MA dokládají vliv na strukturu mozku. Prenatální expozice drogou vede ke zmenšení objemu striata (*putamen, globulus pallidus, nucleus caudatus*) a hipokampu (Chang et al., 2004). Tyto děti nemají nijak snížené IQ a neprojevují se u nich jazykové problémy (Smith et al., 2008), ale jsou slabší v kognitivních testech (Billing et al., 1994). Předpokládáme, že děti prenatálně vystavené MA mají sníženou expresí genu *FOXP2*. Kvůli malému vzorku testovaných subjektů však nebylo možné tento trend prokázat.

Nalezená změněná exprese jen u 2 genů ze 13 testovaných se dá přisuzovat relativně nízkým dávkám MA podávaným březím samicím potkana. Kromě přímého účinku drogy na dítě je proto nutné vzít v potaz i účinky nepřímé. Ženy závislé na MA jsou z 85 % případů nezaměstnané (Vavříková et al., 2001b), prenatální a postnatální péče o dítě není dostatečná, ženy se mu dostatečně nevěnují a často chybí potřebné zázemí. Přímé působení drogy jen proto jen těžko rozlišitelné od vnějších negativních vlivů. Všechny tyto aspekty mají negativní dopad na vývoj dítěte (Běláčková et al., 2012; Vavříková et al., 2001a; Matějovská et al., 2014; Šlamberová, 20014; Šlamberová et al., 2006; Kinsley et al., 1994). Zároveň předpokládáme, že MA silně násobí účinky stresu. Březí samice potkana však byly chovány v podmínkách s dostatkem vody a krmení, s pravidelným denním rytmem a nebyly pod žádným stresem. Je proto důležité na dané problematice dále pracovat a objasnit roli MA ve spojitosti se stresem a učením.

## 8 Závěr

Ve své diplomové práci jsem se snažila objasnit následky užívání MA v průběhu těhotenství. Popsat jeho účinky na vyvíjející se CNS plodu a jeho možný dlouhodobý dopad na dítě.

Ve své práci jsem uvedla výsledky 3 testovaných genů metodou real-time PCR. Jejich exprese byla srovnána s 2 endogenními kontrolami. Z prezentovaných výsledků vyplývá, že užívání MA v průběhu těhotenství je spojeno s dlouhodobými účinky na potomstvo. Bylo zjištěno, že prenatální účinek MA dlouhodobě ovlivňuje genovou expresi. V rámci statistického vyhodnocení microarray hybridizace nevyšla změněná exprese u žádného z testovaných genů signifikantně. Byly naměřeny pouze hraniční hodnoty pro 13 genů, které byly dále testovány metodou real-time PCR. Po statistickém vyhodnocení real-time PCR byla signifikantně změněná exprese nalezena u 2 genů vztažených ku jedné ze dvou endogenních kontrol. Signifikantně zvýšená genová exprese u genu *DRD3* a *TACR3* byla nalezena ve striatu. U genu *FOXP2* byly naměřeny hraniční hodnoty pro sníženou genovou expresi v prefrontálním kortexu. Usuzujeme, že prenatální expozice drogou bez stresové zátěže potomka nevede k významným změnám genové exprese ve specifických oblastech mozku dospělého potomstva.

## 9 Seznam použité literatury

- Abar B, LaGasse LL, Derauf C, Newman E, Shah R, Smith LM, Arria, A, Huestis M, Della GS, Dansereau LM, Neal C; Lester BM. Examining the relationships between prenatal methamphetamine exposure, early adversity, and child neurobehavioral disinhibition. *Psychology of Addictive Behaviors*. 2013; 27(3):662-673.
- Ackerman JP, Llorente AM, Black MM, Ackerman CS, Mayes LA, Nair P. The effect of prenatal drug exposure and caregiving context on children's performance on a task of sustained visual attention. *J Dev Behav Pediatr*. 2008; 29:467-474.
- Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal behaviour*. 1975; 23:896-920.
- Ambler Z. *Základy neurologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 7. vyd. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-707-3.
- Amen DG, Stubblefield M, Carmicheal B, Thisted R. Brain SPECT findings and aggressiveness. *Annals of Clinical Psychiatry*. 1996; 8(3):129-137.
- Anckarsater H. Central nervous changes in social dysfunction: autism, aggression, and psychopathy. *Brain Research Bulletin*. 2006; 69(3):259-265.
- Apergis-Schoute AM, Gillan CM, Fineberg NA, Fernandez-Egea E, Sahakian BJ, Robbins TW. Neural basis of impaired safety signaling in Obsessive Compulsive Disorder. *PNAS*, Edited by Ahmad R. Hariri, Duke University, Durham, NC and accepted by Editorial Board Member Marlene Behrmann December 19, 2016 (received for review July 27,2016). 2016.
- Bagheri J, Rajabzadeh A, Baei F, Jalayeri Z, Ebrahimzadeh-bideskan A. The effect of maternal exposure to methamphetamine during pregnancy and lactation period on hippocampal neurons apoptosis in rat offspring. *Toxin Rev.*, early online. 2017; 1-10.
- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JNP, Monyer H, Seeburg PH. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014; 15:181-192, DOI:10.1038/nrn3677
- Bannerman DM, Rawlins JNP, Good MA. The drugs don't work—or do they? Pharmacological and transgenic studies of the contribution of NMDA and GluR-A-containing AMPA receptors to hippocampal-dependent memory. *Psychopharmacology (Berl.)* 2006; 188:552-566.
- Barrett KE, Barman SM. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23rd Edition. 23. vydání. McGraw-Hill Medical, 2009. 726 s. ISBN 978-0071605670.
- Barros M, Dempster EL, Illott N, Chabrawi S, Maior RS, Tomaz C, Müller CP. Decreased methylation of the NK3 receptor coding gene (TACR3) after cocaine-induced place preference in marmoset monkeys. *Addiction biology*. 2013; 18(3): 452-454.
- Barnard M. *Drogová závislost a rodina*. Praha: Triton, 2011. ISBN 978-80-7387-386-8.
- Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between

- cognition and emotion. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 626:49–56.
- Van Baar AL, Fleury P, Soepatmi S, Ultee CA, Wesselman PJM. Neonatal behaviour after drug dependent pregnancy. *Archives of disease in childhood.* 1989; 64:235-240.
- Bauer CR, Shankaran S, Bada HS, Lester B, Wright LL, Krause-Steinrauf H, Smeriglio VL, Finnegan LP, Maza PL, Verter J. The Maternal Lifestyle Study: Drug exposure during pregnancy and short-term maternal outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2002; 186(3): 487–495
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., & Zhang, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.* 1993; 14(1):83.
- Bechara A. The role of emotion in decision making: evidence from neurological patients with orbitofrontal damage. *Brain and Cognition.* 2004; 55(1):30–40.
- Bečková I, Višňovský P. Farmakologie drogových závislostí. Ilustroval Martin BOHÁČ. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-864-6.
- Behnke M, Smith VC, Committee on substance abuse, Committee on fetus and newborn. Prenatal Substance Abuse: Short- and Long- term Effects on the Exposed Fetus. *Pediatrics.* 2013, 131(3):1009-1024.
- Behnke M, Eyler FD. The Consequences of Prenatal Substance Use for the Developing Fetus, Newborn, and Young Child. *International Journal of the Addictions.* 1993; 28(13): 1341-1391.
- Billing L, Eriksson M, Jonsson B, Steneroth G, Zetterström R. The influence of environmental factors on behavioural problems in 8 – year – old children exposed to amphetamine during fetal life. *Child abuse & neglect.* 1994; 18(1):3-9.
- Blair RJ. Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, & Psychiatry.* 2001; 71(6):727–731.
- Birbaumer N, Veit R, Lotze M, Erb M, Hermann C, Grodd W, Flor H. Deficient fear conditioning in psychopathy: a functional magnetic resonance imaging study. *Archive General Psychiatry.* 2005; 62(7):799–805.
- Bourque M, Liu B, Dluzen DE, Di Paolo T. Sex differences in methamphetamine toxicity in mice: Effect on brain dopamine signalling pathways. *Elsevier – Psychoneuroendocrinology.* 2011; 36:955-969
- Brdička R a Didden W. Genetika v klinické praxi. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7492-277-0.
- Brower MC, Price BH. Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behavior: A critical review. *Journal of Neurology, Neurosurgery, & Psychiatry.* 2001; 71(6):720–726.
- Brown J, Hohman M. The impact of methamphetamine use on parenting. *J Soc Work Pract Addict.* 2006; 6:63–88.
- Bullmore E, Sporns O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nature reviews. Neuroscience.* 2009; 10(3):186.
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 2002; 35:625–641.

- Campbell TG. The best of a bad bunch: the ventromedial prefrontal cortex and dorsal anterior cingulate cortex in decision-making. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27(3):447–448.
- Caputi A, Fuchs EC, Allen K, Le Magueresse C, Monyer H. Selective reduction of AMPA currents onto hippocampal interneurons impairs network oscillatory activity. *PLoS ONE* 2012; 7:e37318.
- Cernerud L, Eriksson M, Jonsson B, Steneroth G, Zetterstrom R. Amphetamine addiction during pregnancy: 14-year follow-up of growth and school performance. *Acta paediatrica*. 1996; 85(2):204-208.
- Chakraborty A, Anstice NS, Jacobs RJ, LaGasse LL, Lester BM, Woudes TA, Thompson B. Prenatal exposure to recreational drugs affects global motion perception in preschool children. *Scientific reports*. 2015; 5.
- Chang L, Alicata D, Ernst T, Volkow N. Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addiction, Society for the Study of Addiction*. 2007; 102(1):16–32.
- Chang L, Smith LM, LoPresti C, Yonekura ML, Kuo J, Walot I, Ernst T. Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2004; 132(2):95-106.
- Covington CY, Nordstrom-Klee B, Ager J, Sokol R, Delaney-Black V. Birth to age 7 growth of children prenatally exposed to drugs: a prospective cohort study. *Neurotoxicology and teratology*. 2002; 24(4):489-496.
- Cui C, Sakata-Haga H, Ohta KI, Nishida M, Yashiki M, Sawada K, Fukui Y. Histological brain alterations following prenatal methamphetamine exposure in rats. *Congenital anomalies*. 2006; 46(4):180-187.
- Čihák R a Grim M. *Anatomie. 2. upr. a dopl. vydání*. Praha: Grada Publishing, 2004. 673 s. sv. 3. ISBN 80-247-1132-X.
- Čihák R. *Anatomie 3. 2. vydání*. Praha: Grada Publishing, 2004. 692 s. ISBN 978-80-247-1132-4.
- D'anna R, Baviera G, Corrado F, Crisafulli A, Ientile R, Buemi M, Squadrito F. Neurokinin B and nitric oxide plasma levels in pre-eclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2004; 111(10):1046-1050.
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation - a possible prelude to violence. *Science*. 2000; 289(5479):591–594.
- Deacon RM, Bannerman DM, Rawlins JN. Anxiolytic effects of cytotoxic hippocampal lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 2002; 116:494–497.
- Derauf C, LaGasse LL, Smith LM, Newman E, Shah R, Neal CR, Lin H. Prenatal methamphetamine exposure and inhibitory control among young school age children. *J Pediatr*. 2012; 161:452–459.
- Dluzen ED, McDermott LJ, Bourque M, Di Paolo T, Darvesh SA, Buletko BA, Laping JN. Markers associated with sex differences in methamphetamine-induced striatal dopamine neurotoxicity. *Current neuropharmacology*. 2011; 9(1):40-44.
- Dubertret C, Gorwood P, Ades J, Feingold J, Schwartz JC, Sokoloff P. Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: Ethnic heterogeneity and



- significant association in caucasians. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 1998;81(4):318-322.
- Drago J, Padungchaichot P, Accili D, Fuchs S. Dopamine receptors and dopamine transporter in brain function and addictive behaviors: insights from targeted mouse mutants. *Developmental neuroscience*. 1998;20(2-3):188-203.
- Druga R, Grim M. *Anatomie centrálního nervového systému*. 1. vydání. Praha: Galén; Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1895-1.
- Erickson MA, Maramba LA, Lisman J. A single brief burst induces GluR1-dependent associative short-term potentiation: a potential mechanism for short-term memory. *J. Cogn. Neurosci*. 2010; 22:2530–2540.
- Eyler FD, Behnke M. Early development of infants exposed to drug prenataly. *Clin Perinatol*. 1999; 26:107–150.
- Eze N, Smith LM, LaGasse LL, Derauf C, Newman E, Arria A, Lester BM. School-aged outcomes following prenatal methamphetamine exposure: 7.5 – year follow-up from the Infant Development, Environment, and Lifestyle Study. *The Journal of pediatrics*. 2016; 170:34-38.
- Frankle WG, Lombardo I, New AS, Goodman M, Talbot PS, Huang Y, Hwang D, Slifstein M, Curry S, Abi-Dargham A, Laruelle M, Siever LJ. Brain serotonin transporter distribution in subjects with impulsive aggressivity: a positron emission study with [<sup>11</sup>C] McN 5652. *American Journal of Psychiatry*. 2005; 162(5):915–923.
- Fukaya M, Kato A, Lovett C, Tonegawa S, Watanabe M. Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*. 2003; 100:4855–4860.
- Furst PT. *Halucinogeny a kultura*. Praha: Maťa, 1996. Nové trendy. ISBN 80-85905-20-5
- Galanter M, Kleber HD, Brady K. *The American Psychiatric Publishing textbook of substance abuse treatment*. American Psychiatric Pub. 2014
- Ganong WF. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Praha: Galén, 2005. 890 s. ISBN 80-7262-311-7.
- Gillan CM, Apergis-Schoute AM, Morein-Zamir S, Urcelay CP, Sule A, Fineberg, Sahakian BJ, Robbins TW. Functional neuroimaging of avoidance habits in obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Psychiatry*. 2015; 172(3):284-293.
- Golub M, Costa L, Crofton K, Frank D, Fried P, Gladen B, Rowland A. NTP-CERHR Expert Panel Report on the reproductive and developmental toxicity of amphetamine and methamphetamine. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 2005; 74(6):471-584.
- Grim M a Druga R. *Základy anatomie: 5. Anatomie krajín těla*. 1. vydání. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-179-8
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 11. vydání. Elsevier, 2006. 1104 s. 11; ISBN 978-0-7216-0240-0.
- Hebb DO. *Textbook of Psychology 3rd edn*, W. B. Saunders Company, 1972.
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33:406–417.

- Holmes SE, Slaughter JR, Kashani J. Risk factors in childhood that lead to the development of conduct disorder and antisocial personality disorder. *Child Psychiatry and Human Development*. 2001; 31(3):183–193
- Hollerman JR, Schultz W. Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature Neurosci*. 1998; 1:304–309.
- Honey RC, Good M. Associative modulation of the orienting response: distinct effects revealed by hippocampal lesions. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process* 2000; 26:3–14.
- Inner, TB. Substance exposure in utero and developmental consequences in adolescence: a systematic review. *Child Neuropsychology*. 2012; 18(6):521-549.
- Jablonski SA, Williams MT, Vorhees CV. Mechanisms involved in the neurotoxic and cognitive effects of developmental methamphetamine exposure. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2016; 108(2):131–141.
- Jablonski SA, Williams MT, Vorhees CV. Neurobehavioral Effects from Developmental Methamphetamine Exposure. *Neurotoxin Modeling of Brain Disorders — Life-long Outcomes in Behavioral Teratology, of the series Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2015; 29:183-230.
- Jönsson EG, Flyckt L, Burgert E, Crocq MA, Forslund K, Mattila-Evenden M, Bjerkenstedt L. Dopamine D3 receptor gene Ser9Gly variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Psychiatric genetics*. 2003;13(1):1-12.
- Joyce JN, Renish L, Osredkar T, Walro JM, Kucera J, Dluzen DE. Methamphetamine-induced loss of striatal dopamine innervation in BDNF heterozygote mice does not further reduce D3 receptor concentrations. *Synapse*. 2004; 52(1):11-19.
- Kalina K. a kol. *Drogy a drogové závislosti*. Praha: NMC-Úřad vlády, 2003, ISBN 80-86734-05-6.
- Kendler KS, Maes HH, Sundquist K, Ohlsson H, Sundquist J. Genetic and family and community environmental effects on drug abuse in adolescence: a Swedish national twin and sibling study. *American Journal of Psychiatry*. 2014; 171(2):209-217.
- Kerdsan W, Thanoid S, Nudmamud-Thanoi S. Changes in glutamate/NMDA receptor subunit 1 expression in rat brain after acute and subacute exposure to methamphetamine. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2009; 2009:1-4.
- Kesner RP, Gilbert PE, Barua LA. The role of the hippocampus in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Behav. Neurosci*. 2002; 116:286–290.
- Kiblawi ZN, Smith LM, LaGasse LL, Diaz SD, Derauf C, Newman E, Strauss A. Prenatal methamphetamine exposure and neonatal and infant neurobehavioral outcome: results from the IDEAL study. *Subs Abus*. 2014; 35:68–73.
- Kiblawi ZN, Smith LM, LaGasse LL, Diaz SD, Newman E, Shah R, Neal C. The effect of prenatal methamphetamine exposure on attention as assessed by continuous performance tests: results from the infant development, environment, and lifestyle study. *J Dev Behav Pediatr*. 2013; 34:31–37.
- Krugel LK, Biele G, Mohr PNC, Li SC, Heekeren HR. Genetic variation in

- dopaminergic neuromodulation influences the ability to rapidly and flexibly adapt decisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(42):17951-17956.
- Kuczkowski KM. The effects of drug abuse on pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2007; 19(6):578-585.
- Lai CS, Gerrelli D, Monaco AP, Fisher SE, Copp AJ. FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain*. 2003; 126(11):2455-2462.
- Lampert SM, Kaye AD, Urman RD, Manchikanti L. Drug testing and adherence monitoring in substance abuse patients. In *Substance Abuse*. Springer New York. 2015; 621-631
- Leech SL, Richardson GA, Goldschmidt L, Day NL. Prenatal substance exposure: effects on attention and impulsivity of 6 – year – olds. *Neurotoxicology and teratology*. 1999; 21(2):109-118.
- Li H, Scholl JL, Tu W, Hassell JE, Watt MJ, Forster GL, Renner KJ. Serotonergic responses to stress are enhanced in the central amygdala and inhibited in the ventral hippocampus during amphetamine withdrawal. *European journal of neuroscience*. 2014; 40(11):3684-3692.
- Lindsay MK, Burnett E. The use of narcotics and street drugs during pregnancy. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2013; 56(1):133-141.
- Little BB, Snell LM, Gilstrap LC. Methamphetamine abuse during pregnancy: outcome and fetal effects. *Obstetrics & Gynecology*. 1988; 72(4):541-544.
- Macúchová M, Šlamberková R. Gender differences in the effect of adult amphetamine on cognitive functions of rats prenatally exposed to methamphetamine. *Elsevier - Behavioural brain research*. 2014; 270:8-17
- Matoušek O. a kol. *Sociální práce v praxi*. Praha: Portál, 2005, ISBN 80-7367-002-X.
- Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Rev. Neurosci*. 2013; 14:417–428.
- Mariano TY, Bannerman DM, McHugh SB, Preston TJ, Rudebeck PH, Rudebeck SR, Campbell TG. Impulsive choice in hippocampal but not orbitofrontal cortex-lesioned rats on a nonspatial decision-making maze task. *Eur. J. Neurosci*. 2009; 30:472–484.
- Matějovská I, Bednášová K, Šlamberová R. Effect of prenatal methamphetamine exposure and challenge dose of the same drug in adulthood on epileptiform activity induced by electrical stimulation in female rats. *Neuroscience*. 2014; 257:130-138.
- McCusker J, Bigelow C, Vickers-Lahi M, Spotts D, Garfield F, Frost R. Planned duration of residential drug abuse treatment: efficacy versus effectiveness. *Addiction*. 1997; 92:1467-1478.
- McCutcheon JE, Marinelli M. Age matters. *Eur J Neurosci*. 2009; 29(5):997–1014.
- Mena JC, Cuellar H, Vargas D, Riascos R. PET and SPECT in drug and substance abuse. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2005; 16(3):253–256.
- Ma F, Xie H, Dong ZQ, Wang YQ, Wu GC. Expression of ORL 1 mRNA in some brain nuclei in neuropathic pain rats. *Brain research*. 2005; 1043(1):214-217.

- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ. Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *Journal of neuroscience*, 1990; 10(8):2587-2600.
- Moore KL, Persaud TVN. Zrození člověka: Embryologie s klinickým zaměřením. 6. vydání. 2011. 564 s. ISBN 80-85866-94-3.
- Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Tonegawa S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*. 2002; 297(5579):211-218.
- Neri M, Bello S, Turillazzi E, Riezzo I. Drugs of abuse in pregnancy, poor neonatal development, and future neurodegeneration. Is oxidative stress the culprit?. *Current pharmaceutical design*. 2015; 21(11):1358-1368.
- Nguyen D, Smith LM, LaGasse LL, Derauf C, Grant P, Shah R, Della Grotta S. Intrauterine growth of infants exposed to prenatal methamphetamine: results from the infant development, environment, and lifestyle study. *The Journal of pediatrics*. 2010; 157(2):337-339.
- Nicolini H, Cruz C, Camarena B, Orozco B, Kennedy JL, King N, Sidenberg D. DRD2, DRD3 and 5HT2A receptor genes polymorphisms in obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 1996; 1(6):461-5.
- Novotný I. Drogová závislost'. 2. vyd. Bratislava: Metodické centrum mesta Bratislavy, 1995. ISBN 80-7164-081-6.
- Numachi N, Ohara A, Yamashita M, Fukushima S, Kobayashi K, Hata H, Watanabe H, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I. Methamphetamine-induced hyperthermia and legal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters. *Elsevier – European Journal of pharmacology* 2007; 572:120-128
- O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map* (Oxford Univ. Press, 1978).
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*. 1971; 34(1):171-175.
- Pamaudeau P, Dongelmans ML, Turiault M, Ambroggi F, Delbes AS, Cansell C, Luquet S, Piazza PV, Tronche F, Barik J. Glucocorticoid receptor gene inactivation in dopamine-innervated areas selectively decreases behavioral responses to amphetamine. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014; 8:1-12.
- Pentkowski NS, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard RJ. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur. J. Neurosci*. 2006; 23:2185–2196.
- Peterka M, Novotná B. Úvod do teratologie: příčiny a mechanismy vzniku zrozených vad. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 9788024617800.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29(9):e45-e45.
- Piechota M, Korostynski M, Sikora M, Golda S, Dzbek J, Przewlocki R. Common transcriptional effects in the mouse striatum following chronic treatment with heroin and methamphetamine. *Genes, Brain and Behavior*. 2012; 11(4):404-414.

- Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee B. K. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19:705–712.
- Raine A, Lencz T, Bihrlé S, LaCasse L, Colletti P. Reduced prefrontal gray matter volume and reduced autonomic activity in antisocial personality disorder. *Archives of General Psychiatry.* 2000; 57(2):119–127.
- Raine A, Yang Y. The neuroanatomical bases of psychopathy: A review of brain imaging findings. In: Patrick CJ, editor. *Handbook of Psychopathy.* Guilford; New York: 2004.
- Raine A, Yang Y. Neural foundations to moral reasoning and antisocial behavior. *Soc Cognitive and Affective Neuroscience.* 2006; 1:203–213.
- Rambousek L, Kacer P, Syslová K, Bumba J, Bubeníková – Valesová V, Šlamberová R. Sex differences in methamphetamine pharmacokinetics in adult rats and its transfer to pups through the placental membrane and breast milk. *Elsevier - Drug and Alcohol dependence* 2014; 139:138-144
- Rawlins JN, Olton DS. The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behav. Brain Res.* 1982; 5:331–358.
- Rice D, Baron S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ health perspectives.* 2000; 108(3):511–533.
- Riedl O. Vondráček V. *Praktická toxikologie.* Avicenum, Praha 1971
- Rokyta R. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi.* Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
- Rolls ET, Treves A. *Neural Networks and Brain Function* (Oxford Univ. Press, 1998).
- Romberg C, Raffel J, Martin L, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP, Paulsen O. Induction and expression of GluA1 (GluR-A)-independent LTP in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience.* 2009; 29(6):1141-1152.
- Sadler TW. *Langmanova lékařská embryologie: Překlad 10. vydání. 1. vydání.* Praha: Grada Publishing, a. s, 2011. 432 s. ISBN 978-80-247-2640-3.
- Sanderson DJ, Sprengel R, Seeburg PH, Bannerman DM. Deletion of glutamate receptor-A (GluR-A) AMPA receptor subunits impairs one-trial spatial memory. *Behav. Neurosci.* 2007; 121:559–569.
- Sanderson DJ, Sprengel R, Seeburg PH, Bannerman DM. Deletion of the GluA1 AMPA receptor subunit impairs recency-dependent object recognition memory. *Learn. Mem.* 2011; 18:181–190.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Belzung C. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 2003; 301(5634):805-809.
- Shiba T, Yamato M, Kudo W, Watanabe T, Utsumi H, Yamada KI. In vivo imaging of mitochondrial function in methamphetamine-treated rats. *Neuroimage.* 2011; 57(3):866-872.
- Schutová B, Hrubá L, Rokyta R, Šlamberová R. Gender differences in behavioral changes elicited by prenatal methamphetamine exposure and application of the same drug in adulthood. *Wiley Periodicals, Inc. Dev. Psychobiology.*

- Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG. D1 receptor modulation of hippocampal–prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *Journal of neuroscience*. 1998; 18(4):1613-1621.
- Segal B, Morral, AR, Stevens SJ. *Adolescent substance abuse treatment in the United States: Exemplary models from a national evaluation study*. Routledge.2014.
- Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine*. 2013; 4(6):624.
- Shilling PD, Kuczenski R, Segal DS, Barrett TB, Kelsoe JR. Differential regulation of immediate-early gene expression in the prefrontal cortex of rat with a high vs. low behavioral response to methamphetamine. *Neuropsychopharm*. 2006; 31:2359-2367.
- Silva AJ. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J. Neurobiol*. 2003; 54:224–237.
- Simões PF, Silva AP, Pereira FC, Marques E, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CE, Macedo TR. Methamphetamine changes NMDA and AMPA glutamate receptor subunit levels in the rat striatum and frontal cortex. *N.Y. academy of science*. 2008; 1139:232-241.
- Simões PF, Silva AP, Pereira FC, Grade S, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, Macedo TR. Methamphetamine induces alternations on hippocampal NMDA and AMPA receptor subunit levels and impairs spatial working memory. *Elsevier - Neuroscience* 2007; 150:433-441
- Smith AM, Chen A. Neonatal amphetamine exposure and hippocampus-mediated behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2009; 91:207–217
- Smith LM, Santos LC. Prenatal exposure: The effects of prenatal cocaine and methamphetamine exposure on the developing child. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2016; 108(2):142–146
- Smith LM, LaGasse LL, Derauf C, Grant P, Shah R, Arria A, Fallone M. Prenatal methamphetamine use and neonatal neurobehavioral outcome. *Neurotoxicology and teratology*. 2008; 30(1):20-28.
- Smith LM, LaGasse LL, Derauf C, Grant P, Shah R, Arria A, Liu J. The infant development, environment, and lifestyle study: effects of prenatal methamphetamine exposure, polydrug exposure, and poverty on intrauterine growth. *Pediatrics*. 2006 118(3):1149-1156.
- Smith LM, Yonekura ML, Wallace T, Berman N, Kuo J, Berkowitz C. Effects of prenatal methamphetamine exposure on fetal growth and drug withdrawal symptoms in infants born at term. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 2003; 24(1):17-23.
- Sobell LC, Sobell MB, Ward E. *Evaluating alcohol and drug abuse treatment effectiveness: Recent advances*. Elsevier. 2013
- Spurlock G, Williams J, McGuffin P, Aschauer HN, Lenzinger E, Fuchs K, Mallet J. European Multicentre Association Study of Schizophrenia: a study of the DRD2 Ser311Cys and DRD3 Ser9Gly polymorphisms. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 1998; 81(1):24-28.
- Squire, LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*. 1992; 99(2):195.

- Štefunková M. Metamfetamin (pervitin): situace v EU a její globální kontext. Praha: Centrum adiktologie, Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN v Praze, 2010. Učební texty (Všeobecná fakultní nemocnice. Centrum adiktologie). ISBN 978-80-86620-24-4.
- Steiner E, Villen T, Hallberg M, Rane A. Amphetamine secretion in breast milk. *European journal of clinical pharmacology*. 1984; 27(1):123-124.
- Stuchlik A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014; 8.
- Stuchlik A, Rehakova L, Rambousek L, Svoboda J, Vales K. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. *Neuroscience research*. 2007; 58(2):133-139.
- Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neuroscience letters*, 2004; 366(2):162-166.
- Suchopár J, Valentová Š. *Remedia compendium*, 4. vyd. Praha: Panax, 2009. ISBN 978-80-902806-4-9.
- Szekeres G, Kéri S, Juhász A, Rimanóczy Á, Szendi I, Czimmer C, Janka Z. Role of dopamine D3 receptor (DRD3) and dopamine transporter (DAT) polymorphism in cognitive dysfunctions and therapeutic response to atypical antipsychotics in patients with schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2004; 124(1):1-5.
- Ševčík M. *Praktická toxikologie: otravy chemickými přípravky s obchodními názvy*. 3. dopln. a přeprac. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968.
- Šlamberová R, Macúchová E, Nohejlová K, Štofková A, Juroviová J. Effect of amphetamine on adult male and female rats prenatally exposed to methamphetamine. *Prague Medical Report*. 2014; 115(1-2):43-59
- Šlamberová R, Pometlová M, Charousová P. Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Elsevier - Progress in Neuro-Psychopharmacology A Biological Psychiatr*. 2006; 30:82-88.
- Šlamberová R, Charousová P, Pometlová M. Methamphetamine administration during gestation impairs maternal behavior. *Wiley Periodicals, Inc. Dev. Psychobiology*. 2005; 46:57-65.
- Švestka J, Češková E a Náhunek K. *Psychofarmaka v klinické praxi*. Praha: Grada, 1995. ISBN 80-7169-169-0.
- Tang B, Di Lena P, Schaffer L, Head SR, Baldi P, Thomas EA. Genome-wide identification of Bcl11b gene targets reveals role in brain-derived neurotrophic factor signaling. *PLoS One*. 2011; 6(9):e23691.
- Taube JS, Muller RU, Ranck JB. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *Journal of Neuroscience*, 1990; 10(2):420-435.
- Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Imamoglu S. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature genetics*. 2009; 41(3):354-358.
- Trojan S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN

80-247-0512-5.

- Ujike H, Katsu T, Okahisa Y, Takaki M, Kodama M, Inada T, Iyo M. Genetic variants of D2 but not D3 or D4 dopamine receptor gene are associated with rapid onset and poor prognosis of methamphetamine psychosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2009;33(4):625-629.
- Utsunomiya K, Shinkai T, De Luca V, Hwang R, Sakata S, Fukunaka Y, Nakamura J. Genetic association between the dopamine D3 gene polymorphism (Ser9Gly) and schizophrenia in Japanese populations: evidence from a case-control study and meta-analysis. *Neuroscience letters*. 2008; 444(2):161-165.
- Vassoler FM, Byrnes EM, Pierce RC. The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects. *Neuropharmacology*. 2014; 76:269-275.
- Vavříková B, Binder T, Živný J, Vítková I. Placental and umbilical cord changes in drug-addicted women. *Česká gynekol*. 2001a; 66:345-349
- Vavříková B, Binder T, Živný J. Characteristics of a population of drug dependent pregnant women in Czech Republic. *Česká gynekol*. 2001b; 66:285-291
- Vinay L, Ben-Mabrouk F, Brocard F, Clarac F, Jean-Xavier C, Pearlstein E, Pflieger JF. Perinatal development of the motor systems involved in postural control. *Neural plasticity*. 2005; 12(2-3):131-139.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM, Telang F. Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. *Archives of neurology*. 2007;64(11):1575-1579.
- Vondráček HF, Holub V. *Fantastické a magické z hlediska psychiatrie*. V Praze: Columbus, 2012. ISBN 978-80-87588-04-8.
- Vrajová M, Schutová B, Klaschka J, Štěpánková H, Řípková D, Šlamberová R. Age-related differences in NMDA receptor subunits of prenatally MA – exposed male rats. *Springer science + business media N.Y. Neurochem. Res*. 2014; 39(11):2040-2046.
- Waberžinek G, Krajíčková D. *Základy speciální neurologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1020-5.
- Wagner AR. *Information Processing in Animals: Memory Mechanisms* (eds Spear, N. E. & Miller, R. R.) 5–47 (Erlbaum, 1981).
- Weiss RD, Potter JS, Griffin ML, Provost SE, Fitzmaurice GM, McDermott KA, Carroll KM. Long-term outcomes from the national drug abuse treatment clinical trials network prescription opioid addiction treatment study. *Drug and alcohol dependence*. 2015; 150:112-119.
- Wells PG, Bhatia S, Drake DM, Miller-Pinsler L. Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine. 2016; 108(2):108–130.
- Westerga J, Gramsbergen A. The development of locomotion in the rat. *Develop brain research*. 1990; 57(2):163-174.
- Williams JH, Ross L. Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents. *European child & adolescent psychiatry*. 2007; 16(4):243-253.
- Wiltgen BJ, Royle GA, Gray EE, Abdipranoto A, Thangthaeng N, Jacobs N,



- Fanselow MS. A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One*, 2010; 5(9):e12818.
- Won L, Bubula N, McCoy H, Heller A. Methamphetamine concentrations in fetal and maternal brain following prenatal exposure. *Neurotoxicology and teratology*. 2001; 23(4):349-354.
- Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, Moratalla R, Cooper DC, Hu XT, Tonegawa S. Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron*. 1997;19(4):837-848.
- Yamamotová A, Šlamberková R. Behavioral and antinociceptive effects of different psychostimulant drugs in parentally methamphetamine-exposed rats. *Physiol. Res*. 2012; 61(2):139-147.
- Yang Y, Raine A. Functional neuroanatomy of psychopathy. *Psychiatry*. 2008; 7(3):133–136.

## Právní dokumenty

- Zákon č. 162/1993 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.
- Zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách, ve znění pozdějších předpisů.
- Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů.
- Zákon č. 350/2011 Sb., o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon).
- Zákon č. 379/2005 Sb., o opatřeních k ochraně před škodami působenými tabákovými výrobky, alkoholem a jinými návykovými látkami a o změně souvisejících zákonů.

## Internetové zdroje

- Alkohol, krátká historie, Řekni ne drogám – řekni ano životu, říjen 2016 [cit. 2016-10-09]. Dostupné z:  
<http://www.drogy.cz/alkohol/kap-alkohol-kratka-historie.html>
- Alkohol a jiné návykové látky u dětí, Nespork K. [online]. [cit. 2017-01-22]. Dostupné z:  
<http://www.alkoholik.cz/zavislost/ke-stazeni/online-knihy/category/1-online-knihy.html>
- Český statistický úřad, okres Benešov, prosinec 2015 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z:  
[https://www.czso.cz/csu/xs/charakteristika\\_okresu\\_benesov](https://www.czso.cz/csu/xs/charakteristika_okresu_benesov)
- Drogy a drogová závislost, Centrum Moniky Plocové, nestátní nezdravotnické zařízení [online] březen 2016 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z:  
<http://www.monikaplocova.cz/drogy-a-drogova-zavislost>
- Fakulta sportovních studií Masarykovy univerzity [online] září 2016 [cit. 2017-03-09]. Dostupné z:  
<http://www.fsps.muni.cz/inovace-SEBS-ASEBS/elearning/kriminologie/> Stav
- Klinika adiktologie: 1. lékařská fakulta [online]. Praha: World Health Organization, 2011 [cit. 2017-07-26]. Dostupné z:  
<http://www.adiktologie.cz/cz/articles/68/Drogy-a-zakon>
- Klinika adiktologie: 1. lékařská fakulta [online]. Praha: World Health Organization, 2011 [cit. 2017-07-26]. Dostupné z:  
<http://www.adiktologie.cz/cz/articles/detail/90/210/Ceska-drogova-politika-1993-2003-analyza-vyvoje-1-cast>
- Kriminalita a delikvence – charakteristika, Národní informační centrum pro mládež [online] srpen 2016 [cit. 2016-08-6]. Dostupné z:  
<http://www.icm.cz/kriminalita-a-delikvence-charakteristika>
- National Institute on Drug Abuse. Drugs and the Brain [online]. [cit. 2017-08-01]. Dostupné z:  
<http://www.nida.nih.gov/scienceofaddiction/brain.html>
- Nelátkové závislosti, Prev-Centrum, z.ú., říjen 2016 [cit. 2017-01-03]. Dostupný z:  
<http://www.prevcentrum.cz/Nelatkove-zavislosti>

- Neuroscience news [online]. USA: Neurosciencenews.com, 2015 [cit. 2017-07-26].  
Dostupné z:  
<http://neurosciencenews.com/fnir-parkinsonian-syndromes-3293/>
- Neuroscience news [online]. USA: Neurosciencenews.com, 2015 [cit. 2017-07-26].  
Dostupné z:  
<http://neurosciencenews.com/fnir-parkinsonian-syndromes-3293/>
- PsyPost [online]. USA: PsyPost.com, 2015 [cit. 2017-07-26]. Dostupné z:  
<http://www.psypost.org/2015/10/hippocampal-hierarchies-different-memory-resolutions-map-onto-different-brain-locations-38659>
- Policie ČR [online]. Praha: Policie ČR, 2015 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z:  
[www.policie.cz/soubor/historie-drog-pdf.aspx](http://www.policie.cz/soubor/historie-drog-pdf.aspx)
- PubChem Compound [databáze]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, [cit. 2017-07-26]. Dostupné z:  
[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=66124&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=66124&loc=ec_rcs)
- Robinson SR. *The Role of Dopamine and Norepinephrine in Depression* [online]. Primary Psychiatry, ©2007. [cit. 2017-08-01]. Dostupné z:  
<http://www.primarypsychiatry.com/asp/articleDetail.aspx?articleid=1066>
- Senft V. [online]. Praha: Václav Senft, 2009 [cit. 2017-07-26]. Dostupné z:  
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/SFADL.htm>
- Šerek J. PSY252 Statistická analýza dat II. *Slideplayer* [online]. Praha: Slideplayer, 2013 [cit. 2017-08-02]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/>
- ÚZIS ČR. ÚZIS ČR [online]. Praha: ÚZIS ČR, ©2010-2017 [cit. 2017-07-22].  
Dostupné z:  
<http://www.uzis.cz/>
- Užívání návykových látek, Ostrov radosti - Středisko volného času, září 2016 [cit. 2017-03-1]. Dostupné z:  
<http://www.ostrovzl.cz/prevence/uzivani-navykovych-latek/>
- Wikipedia commons [online]. Californie: Wikipedia, 2011 [cit. 2017-07-26].  
Dostupné z:  
<https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Striatum#/media/File:Striatum.png>
- Wikipedia commons [online]. Californie: Wikipedia, 2011 [cit. 2017-07-26].  
Dostupné z:  
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Striatum.png/obrázek>
- What-when-how: In Depth Tutorials and Information [online]. USA: The-Crankshaft Publishing, 2016 [cit. 2017-07-26]. Dostupné z:  
[what-when-how.com/neuroscience/behavioral-and-psychiatric-disorders-integrative-systems-part-2/](http://what-when-how.com/neuroscience/behavioral-and-psychiatric-disorders-integrative-systems-part-2/)