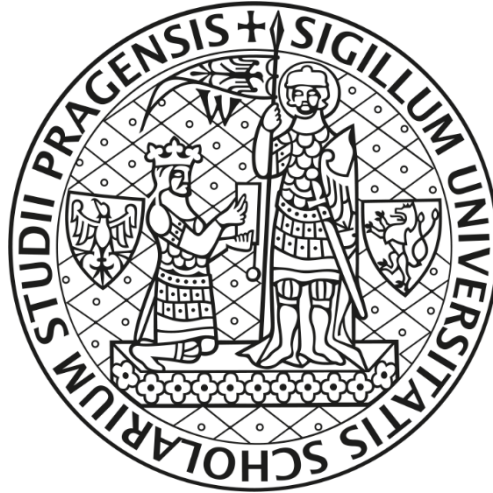


Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Biologie
Antropologie a genetika člověka



Bc. Anežka Tomášková

**Nastavení genové exprese v dospělém mozku pokusného
potkana po prenatálním vystavení metamfetaminu.**

Gene expression pattern in the adult brain of the experimental rat after
prenatal exposure to methamphetamine.

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. MUDr. Marie Černá, DrSc.

Praha, 2017

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. MUDr. Marii Černé, DrSc. za veškerou pomoc a možnost vypracování diplomové práce na Ústavu lékařské genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Rovněž děkuji všem kolegům za přínosné rady a RNDr. Hance Zoubkové, Ph.D. za odborné vedení.

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. 12. 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 projektu 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). Naše práce si klade za cíl provést obecný screening exprese genů ve vybraných oblastech mozku potkanů F1 generace prenatálně ovlivněných metamfetaminem a vyhodnocení případné změny exprese jednotlivých genů.

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

Výsledky: V rámci statistického vyhodnocení microarray hybridizace nebyla zjištěna signifikantně změněná exprese u žádného z testovaných genů. Byly zjištěny 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 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. 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 taken by drug-addicted pregnant women and happens to be 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: This research aims to provide a general screening of gene expression in selected regions of the F1 generation of the brain prenatally affected by methamphetamine, to verify whether exposure to methamphetamine affects the generation of offspring of exposed females at the level of gene expression in selected regions of the brain, and to evaluate possible changes in gene expression.

Methods: In selected parts of the brain, collected from a rat, the microarray hybridization and the real-time PCR were set to evaluate express changes in the expression of selected genes.

Results: Statistical analysis of the microarray hybridization did not show a significantly altered gene expression in the tested genes. Only boundary values for 13 genes were measured, which were further tested by the real-time PCR. After a statistic evaluation of the real-time PCR, the significantly altered expression was found in 2 genes. The notably changed expression of *DRD3* and *TACR3* genes was found only in the striatum, but not in other parts of the brain. In the case of *FOXP2* gene a reduced expression in the prefrontal cortex was measured. We conclude that the prenatal exposure to drug without stress load of descendant does not lead to significant changes of gene expression in specific regions of the brain of an adult offspring. This project could contribute to a better understanding of the effect of methamphetamine on the development of the brain of the fetus and clarify 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	-	komplementární DNA
CNS	-	centrální nervová soustava
COMT	-	katechol-O-metyltransferázou
C _t	-	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	-	monoaminoxydáza
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	-	ribozomální 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

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	NÁVYKOVÉ LÁTKY	3
3.1.1	Pohled na drogovou situaci v ČR	3
3.1.2	Drogy a drogová závislost	5
3.1.3	Třídění podle účinků na uživatele	7
3.2	VZNIK ZÁVISLOSTI.....	9
3.3	STIMULAČNÍ DROGY.....	10
3.3.1	Charakteristika skupiny a obecný mechanismus účinku	10
3.3.2	Metamfetamin.....	11
3.3.3	Metamfetamin: droga těhotných závislých žen.....	13
3.3.4	Metamfetamin: prenatálně ovlivněné děti	15
3.3.5	Testování prenatálního vlivu MA na potomky	16
3.4	TESTOVANÉ ČÁSTI MOZKU	21
3.4.1	Striatum	25
3.4.2	Prefrontální kortex.....	27
3.4.3	Hipokampus.....	28
3.5	TESTOVANÉ GENY A ENDOGENNÍ KONTROLY	30
4	MATERIÁL	34
4.1	ZVÍŘATA A CHOV	34
4.2	PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA, POMŮCKY A PROGRAMY	37
4.3	CHEMIKÁLIE, REAKTANTY A KITY	38
5	METODIKA PRÁCE	39
5.1	IZOLACE RNA	39
5.1.2	Vlastní postup	39
5.2	ÚPRAVA VZORKU PRO METODU DNA MICROARRAY HYBRIDIZACE A REAL-TIME PCR.....	41

5.2.1	Postup čištění vzorku vysrážením	41
5.2.2	Přečištění vzorku DNázou	42
5.2.3	Reverzní transkripce	43
5.3	GENOTYPIZACE VZORKU METODOU MICRO-ARRAY HYBRIDIZACE	44
5.3.1	Analýza rozptylu.....	44
5.4	MĚŘENÍ GENOVÉ EXPRESE METODOU REAL-TIME PCR.....	45
5.4.1	Postup real-time PCR amplifikace.....	46
5.4.2	Kvantifikace genové exprese.....	47
5.4.3	Statistické vyhodnocení metody real-time PCR.....	47
5.4.3.1	Metoda kvantifikace s kalkulací efektivity PCR.....	48
5.4.3.2	Mann-Whitneyův U test	49
6	VÝSLEDKY S DOKUMENTACÍ.....	50
6.1	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ GENU <i>DRD3</i>	51
6.2	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ GENU <i>TACR3</i>	55
6.3	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ GENU <i>FOXP2</i>	59
7	DISKUSE.....	63
7.1	GEN <i>DRD3</i>	68
7.2	GEN <i>TACR3</i>	70
7.3	GEN <i>FOXP2</i>	72
7.4	NEPŘÍMÉ VLIVY SOUVISEJÍCÍ S GENOVOU EXPRESÍ	74
8	ZÁVĚR.....	76
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	78

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 pro nízkou cenu (Carvalho, 2012). Mezi jednotlivci existují značné rozdíly v citlivosti uživatelů na stimulantia. 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. Provést celogenomový screening exprese genů ve specifických oblastech mozku potkanů F1 generace prenatálně ovlivněných metamfetaminem metodou microarray hybridizace.
- II. Ověřit, zda expozice metamfetaminem ovlivňuje generaci potomků exponovaných samic na úrovni exprese vybraných genů ve specifických oblastech mozku metodou real-time PCR.
- III. Vyhodnotit případné změny exprese jednotlivých genů.

3 Literární přehled

3.1 Návykové látky

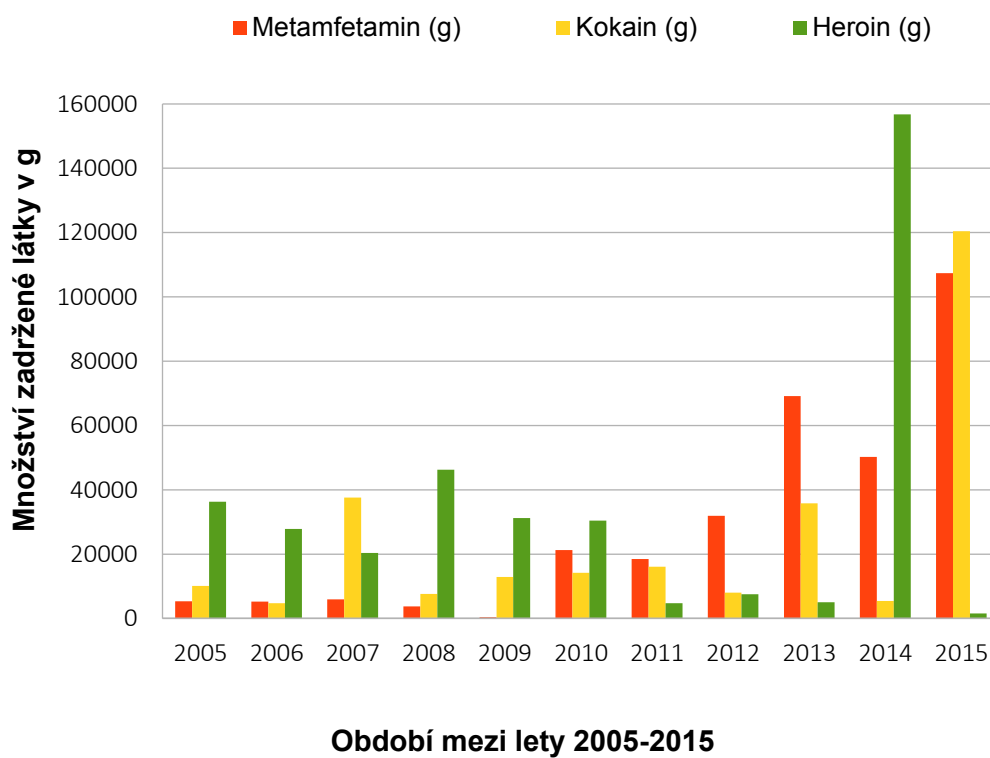
3.1.1 Pohled na drogovou situaci v ČR

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. Fenmetrazin, 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 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)

Dělení drog je poměrně složité. Dají se třídit podle několika norem (Matoušek et al., 2005; Kalina et al., 2003):

- I. Na tvrdé a měkké drogy:

Dělení vzniklé na právním podkladě toho, co je ještě společnost ochotna tolerovat. 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

Seznam omamných a psychotropních látek je uveden v zákoně č. 167/1998 Sb., o návykových látkách, v platném znění pozdějších úprav (tab. 1). Seznam uvedených látek vychází z mezinárodních úmluv, jimiž je Česká republika vázána. Ustanovení § 283, 284 a ustanovení § 286 tohoto zákona se týká také jedů, přičemž 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 (Trestní zákoník ČR).

Tab. 1: Návykové látky a množství větší než malé v ČR. Výřitek 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	Účinná látka	Nejmenší množství účinné látky
Pervitin	Metamfetamin	> 1,5 g	(+) – 1 – fenyl – 2 – methylaminopropan	0,5 g
Heroin	Heroin	> 1,5 g	3,6 – diacetylmorfin	0,2 g
Kokain	Kokain	> 1,0 g	Metylester benzoylekgoninu	0,54 g
Extáze MDMA MDA MDEA	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	1,0 g
LSD LSD-25	LSD	> 5 papírků atd. impregnovaných účinnou látkou	(+) – N,N – dietyllysergamid (dietylamid kyseliny lysergové)	0,134 mg
Marihuana	Konopí	> 10,0 g sušiny	δ-9-tetrahydrocannabinol	1,0 g
Hašiš	Pryskyřice z konopí	> 5,0 g	δ-9-tetrahydrocannabinol	1,0 g

3.1.3 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 nepociťuje 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).

3.2 Vznik závislosti

Jde o soubor behaviorálních, kognitivních a fyziologických stavů. Vytváří 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 dostávají i somatické odvykací stavy. Častým motivem k začátku užívání drog je zvědavost až později dojde 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 velmi důležitá prevence. Prevence užívání a vzniku závislosti na alkoholu a nealkoholových drog se podle World Health Organization (WHO) rozlišuje na: primární prevenci, tj. předcházení užití u osob, které dosud s drogu nejsou v kontaktu; sekundární prevenci, tj. předcházení vzniku a rozvoje závislosti u osob, které již drogu zkusily a užívají ji a terciární prevenci, tj. předcházení vážnému či trvalému zdravotnímu a sociálnímu poškození z užívání drog; jde jak o resocializaci či sociální rehabilitaci, tak o opatření snižující přenos infekčních nemocí při nitrožilním užívání drog, tzv. Harm Reduction program (World Health Organization online, 2016).

Počáteční fáze drogové závislosti, kdy je uživatel drogu nadšen a seznamuje se s jejími účinky, nazýváme experimentálním užíváním. Při sociálním užívání jde již o pravidelnější užívání ve vyšších dávkách. Začíná se projevovat závislost a droga začíná být zdrojem problémů. V rámci každodenního užívání se již vše podřizuje droze, denní režim, morální hodnoty, zaměstnání, přátelé, uživatel návykové látky nad závislostí ztrácí jakoukoli kontrolu (Bernard, 2011; Bečková et al., 1999). Tzv.: „užívání k dosažení normálu“ je poslední fází závislosti a jako taková často končí smrtí předávkováním či naprostým selháním organismu (Bečková et al., 1999). 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)

3.3 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 vyráběny crack a od amfetaminu odvozené tzv. „taneční drogy“ (Kalina et al., 2003; Švestka et al., 1995).

3.3.1 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

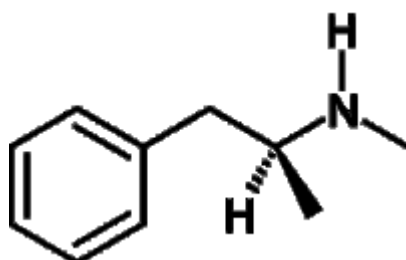
v konečném důsledku vyvolávají úzkost, umocňují trému a deprese a i jejich jednorázové užití může vyvolat záchvat panického strachu (Claire et al., 2015).

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).

3.3.2 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 mikrokrystalický 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., 2014; 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 poločas jeho 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 zubů (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 – demetylací na amfetamin, ze kterého dále vznikají hydroxyamfetamin (2 – 4 %) a norefedrin (2 %), ze kterých vzniká hydroxynorefedrin (0,3 %) a konečně fenylaceton (0,9 %) metabolizovaný dále na kyselinu benzoovou, resp. kyselinu hippurovou (Senft, 2009; Cho et al., 1991; Sipes et al., 1986).

3.3.3 Metamfetamin: droga těhotných závislých žen

Ženy obecně reagují na drogy citlivěji než 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, 2005). 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 Vavříkové (2001b) je užívání heroinu, kokainu a pervitinu často provázeno malnutricí a hyperpyrexíí. 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 i celkového objemu vody v těle. 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 tělních sloučenin často brání přenosu živin, snižují průtok krve a tím i

kyslíku a zapřičiňují 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 přítomno kolem 50 % drogy ve srovnání s tělem 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 koncentraci 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 hladinu dopaminu a noradrenalinu, inhibitorů 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 dítětem 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).

3.3.4 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 dlouho sledovat 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; 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 (Derauf 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 (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, než 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, než 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).

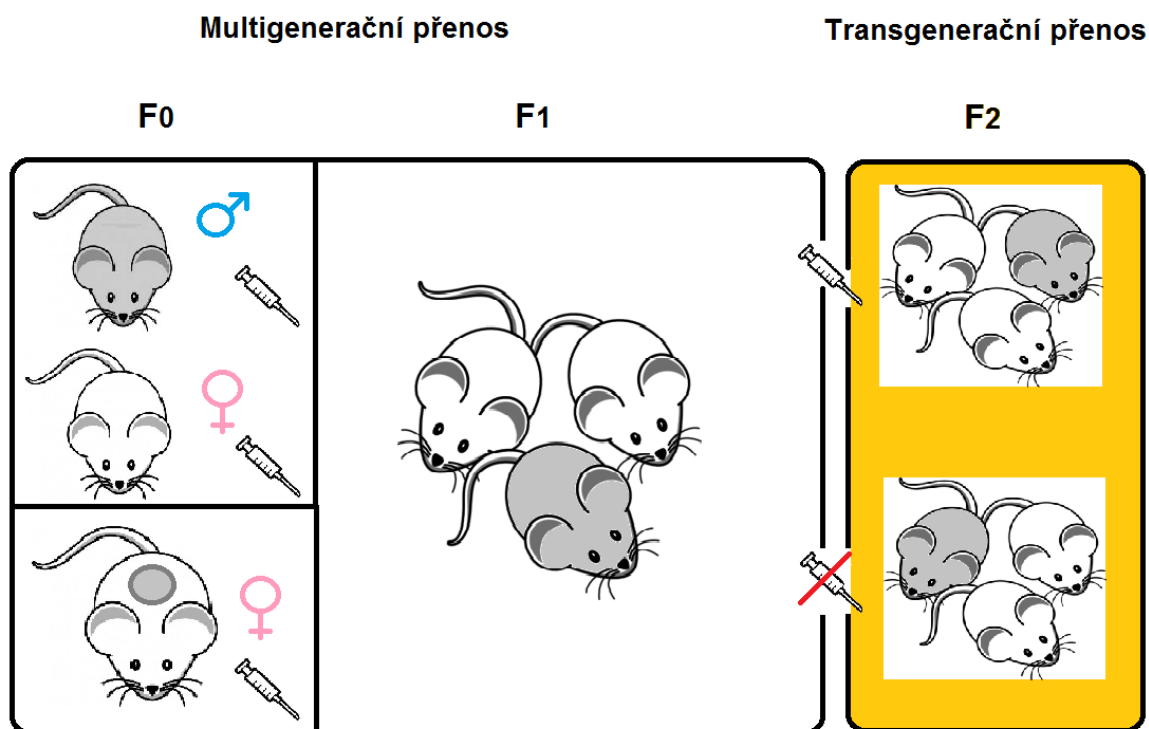
Studie naznačují možné problémy dětí mladšího školního věku se sociálním začleněním, vycházením s vrstevníky a slabšími výsledky v kognitivních testech (Jablonski et al., 2016; Billing et al., 1994). Jejich chování je často asociováno s depresemi, úzkostnými stavy a emocionální nestabilitou (Kiblawi et al., 2013; Abar et al., 2013; 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., 2016; 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; Imer et al. 2012).

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 prenatálně exponovaných MA až do jejich dospělosti (Behnke et al., 2013). Právě z důvodu omezených možností klinických studií je většina prací o prenatálním působení drog prováděna na zvířecích modelech (Schutová et al., 2013; Šlamberová et al., 2006).

3.3.5 Testování prenatálního vlivu MA na potomky

Prenatální vliv užívání návykových látek se dá testovat několika způsoby. Jednak multigeneračním ovlivněním, kdy se droga podává generaci F0 a sleduje se vliv na generaci F1 potomků. V tomto případě lze ovlivnit jak matku, tak otce budoucího potomka, případně jen samici v průběhu březosti. Druhou možností je transgenerační ovlivnění, kdy drogu podáváme generaci F0 a F1 a sledujeme vliv na F2 potomky,

případně drogu podáváme jen F0 generaci a sledujeme vliv na F2 potomky. Opět je zde možnost ovlivnění jak obou rodičů, tak jen březí samice (obr. 2)



Obr. 2: Schéma testování mezigeneračního přenosu drogové závislosti. Pro studium multigeneračního přenosu se využívá ovlivnění F0 generace, a to buď obou pohlaví, nebo březích samic potkana (tento postup byl použit v tomto projektu). Testována je F1 generace. Pro studium transgeneračního přenosu se ovlivňuje F0 generace stejně jako v předchozím případě, dále se může, ale nemusí ovlivnit F1 generace. Testována je F2 generace potkanů. Vytvořeno podle Fujáková-Lipski et al., 2017.

Na první pohled se zdá, že vývoj lidí a potkanů je zcela jiný. To je způsobeno především obrovskými rozdíly v délce trvání prenatálního a postnatálního 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 (postnatální 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. 2) (Vinay et al., 2005). 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

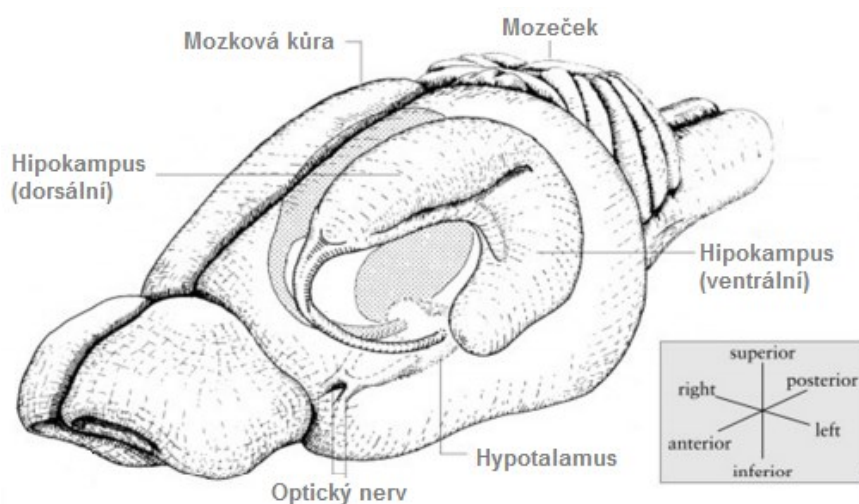
et al., 1990; Altman et al., 1975), což odpovídá zhruba třetímu měsíci u dítěte. V den P5 u potkana se ramena zvedají ze země. To je spojeno s funkčním dozráváním předních končetin, které postupně začínají podporovat váhu přední části těla (Altman et al., 1975). Na konci prvního postnatálního týdne zadní končetiny zatím nejsou schopny podporovat u potkanů váhu páne. 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).

Tab. 2: 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

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. 3) (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. Prenatální 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 mozkiem, 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).



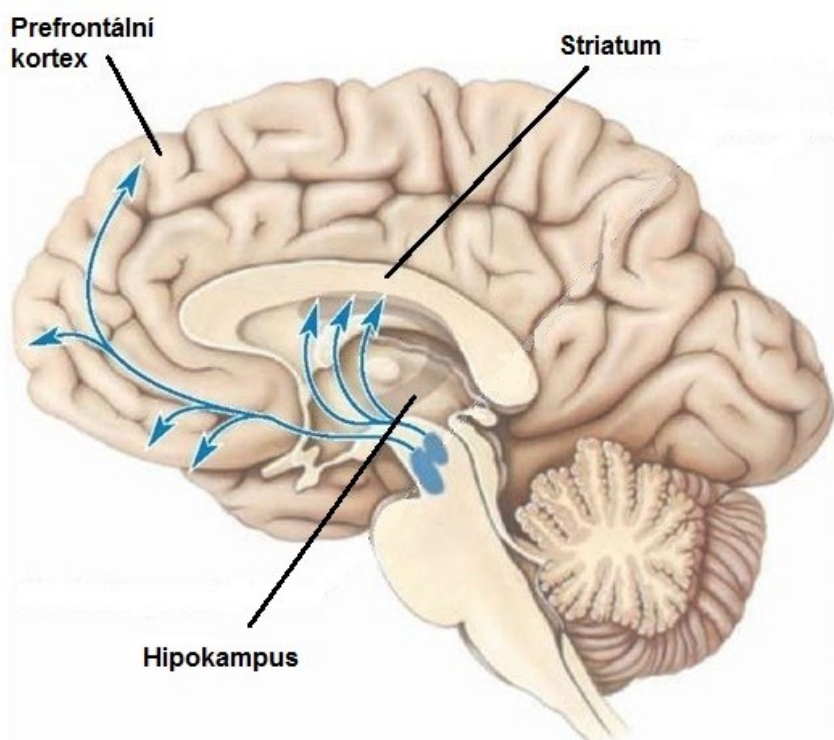
Obr. 3: Grafické znázornění mozku potkana. Převzato a upraveno: Cheung et al., 2005.

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., 1974), zvyšuje náchylnost k záchvatům u obou pohlaví (Šlamberová et al., 2005) a specificky mění citlivost na bolest v závislosti na pohlaví (Yamamotová et al., 2012).

3.4 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 mozkovými strukturami, které zahrnují např. hipokampus a prefrontální kortex a strukturami přímo ovlivňujícími limbický systém, tedy striatem (obr. 4) (Druga et al., 2011; Rolls et al., 1998).



Obr. 4: Mediální řez lidským mozkiem. Modře naznačena hlavní dráha domaminové distribuce. Převzato a upraveno [cit. 8.3.2017]: *What-when-how*, dostupné online

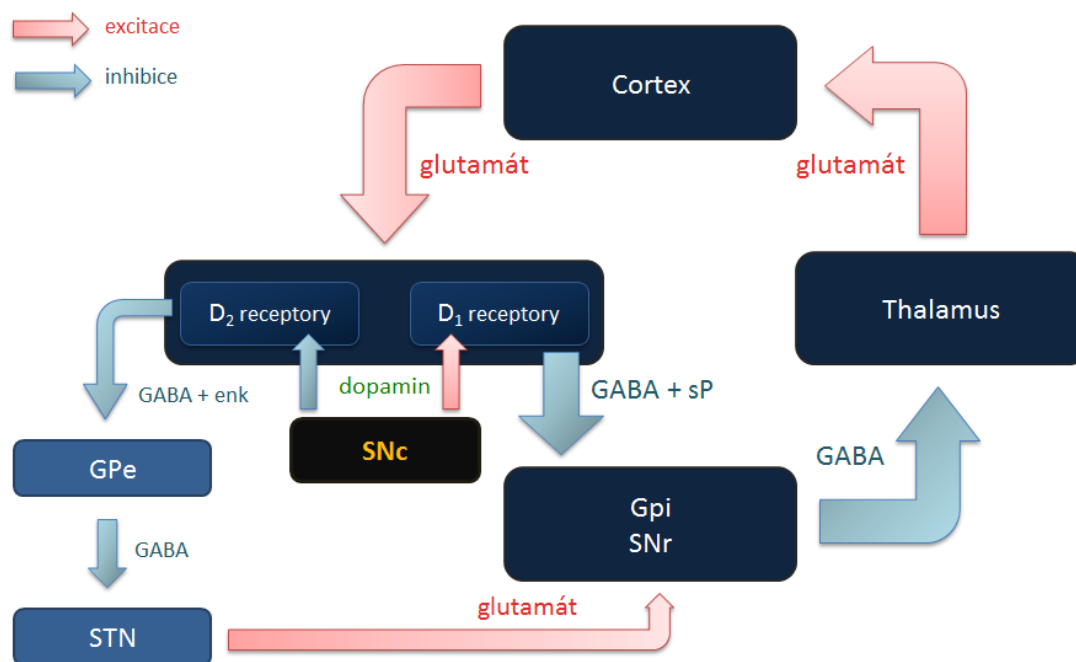
Kontrolní oblasti v mozku vysílají signály, které konfigurují zpracování příchozích vjemů od jednoho okamžiku k druhému (Bullmore et al., 2009; Bechara et al., 2004). Lidé mají unikátní kognitivní flexibilitu. Systém kontroly mozku se skládá z funkčně rozmanitých oblastí, které jsou anatomicky odděleny 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 neurotransmiter 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. 5).



Obr. 5: 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).

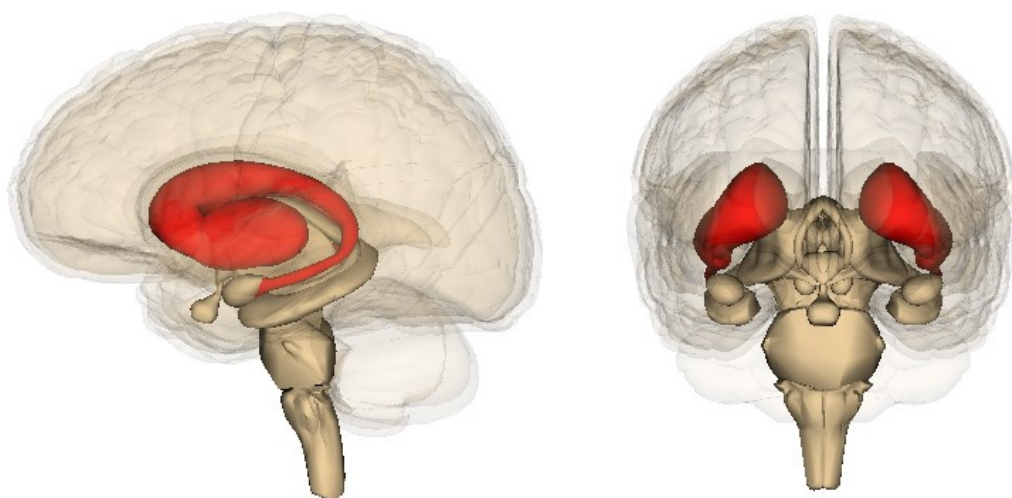
II. Serotoninergní systém

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_{1-7R}, 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 mozkovém 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).

3.4.1 Striatum

Striatum (též *corpus striatum*) je hluboká oblast šedé hmoty uvnitř hemisfér koncového mozku (*telencephalon*) (obr. 6). Je to zřejmě rozsahem nejvýznamnější součást 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. 6: Řez lidským mozkiem: striatum. Zvýrazněno červeně, pohled ze strany a zepředu. Převzato [cit. 8.3.2017] : *Neurosciencenews*, 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.

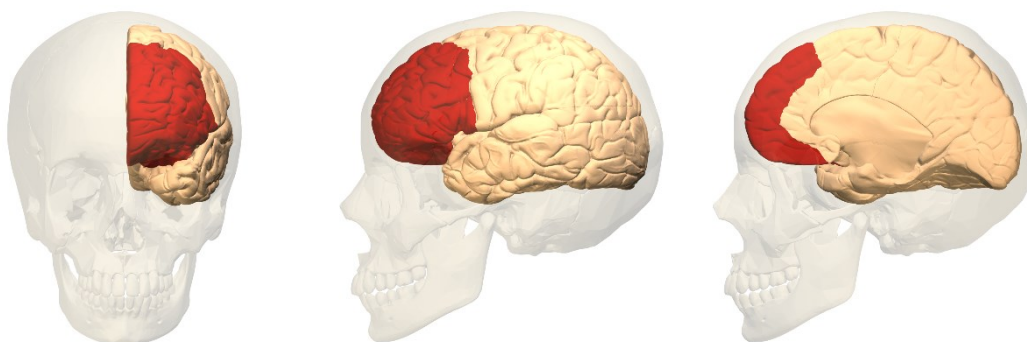
Popisujeme 4 kličky bazálních ganglií, a to senzomotorickou, okulomotorickou, limbickou a asociální. Při popisu záleží, z jaké korové oblasti přicházejí podněty do okruhu bazálních ganglií, dále pak záleží na jádrech, která se uplatňují jako vstupní či výstupní, a do jaké funkční korové oblasti směřuje 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).

3.4.2 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. 7), 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).

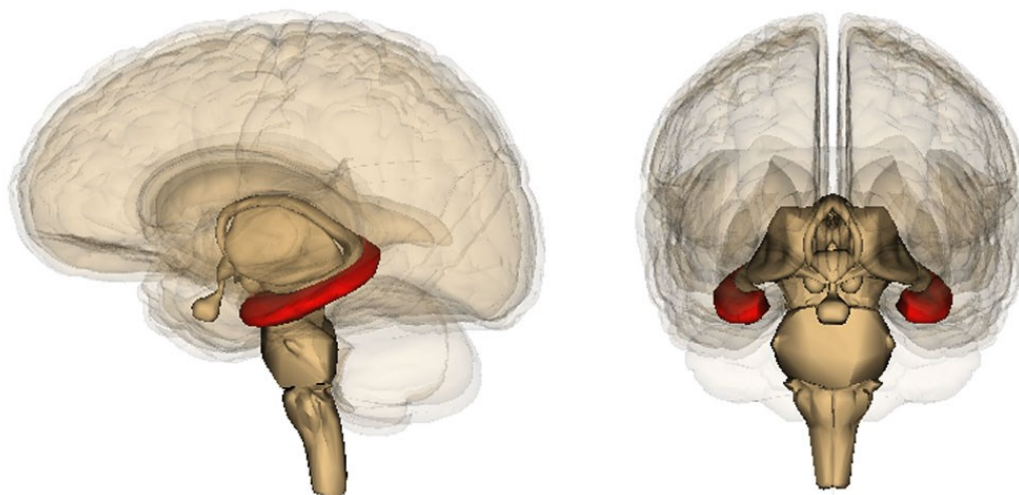


Obr. 7: Řez lidským mozkem: prefrontální kortex. Zvýrazněno červeně, pohled zředu, ze strany a mediálně. Převzato [cit. 8.3.2017]: *Neurosciencenews*, dostupné online

3.4.3 Hipokampus

Hipokampus je párový útvar *telencephalonu*. Leží v pravé (resp. levé) hemisféře ve střední části spánkového laloku (obr. 8). 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 projevovat jak poruchami učení (ukládání informace do dlouhodobé paměti), tak poruchami krátkodobé paměti i třeba úplnou amnézií (Smøes et al., 2007).



Obr. 8: Řez lidským mozkiem: hipokampus. Zvýrazněno červeně, pohled ze strany a zředu. Převzato [cit. 8.3.2017]: *Psypost*, dostupné online

V mozku je řada buněk kódujících vnímání prostoru. 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 buněk lze provádět v experimentu 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, objevil Taube et al., 1990. 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).

3.5 Testované geny a endogenní kontroly

V rámci výzkumu prováděném na Ústavu lékařské genetiky 3.If UK (grantový projekt GA ČR: 14-03708S) byla testována exprese 13 genů (tab. 3) 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. 4). Vybrány byly na podkladě jejich stálé a vyrovnané exprese ve všech 3 odebíraných částech mozku potkana.

Tab. 3: Seznam testovaných genů v rámci projektu GA ČR: 14-03708S

Geny	Celý název	Funkce
<i>BDNF</i>	Brain derived neurotrophic factor	Kóduje proteiny růstového faktoru nervů (Joyce et al., 2004)
<i>CARTPT</i>	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)
<i>DRD3</i>	Dopamine Receptor D ₃	Kóduje receptor lokalizovaný v limbických oblastech mozku, které jsou spojeny s kognitivními, emocionálními a endokrinními funkcemi (Birbaumer et al., 2005; Szekeres et al., 2004 Xu et al., 1997).
<i>ESR1</i>	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)
<i>FOXP2</i>	Forkhead Box P ₂	Gen kódující transkripční faktor z rodiny forkhead/winged-helix transkripčních faktorů. Gen nezbytný pro správný vývoj řečových a jazykových oblastí mozku během embryogeneze (Lai et al., 2003)

GRIN1	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 1	Tyto geny kódují protein je N-metyl-D-aspartátová (NMDA) receptorová podjednotka. NMDA receptory jsou ligandově a napěťově 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).
GRIN2	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2	
GRIN2a	Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A	
IGF1R	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor	Gen pro receptor, který váže IGF s vysokou afinitou a má tyrosinkinázovou aktivitu. Receptor IGF1 hraje rozhodující roli při růstu (Dluzen et al., 2011).
OLR522	Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor	Gen kódující receptor pro protein, jenž se podílí na regulaci apoptózy indukované Fas receptorem (Ma et al., 2005).
NR3	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)
RPS6KA3	Ribosomal Protein S ₆ Kinase A ₃	Aktivita tohoto proteinu souvisí s řízením růstu a diferenciací buněk (Tang et al., 2011).
TACR3	Tachykinin Receptor 3	Tento gen kóduje receptor pro tachykininový neurokinin 3, označovaný také jako neurokinin B (Barros et al., 2013; Topaloglu et al., 2009)

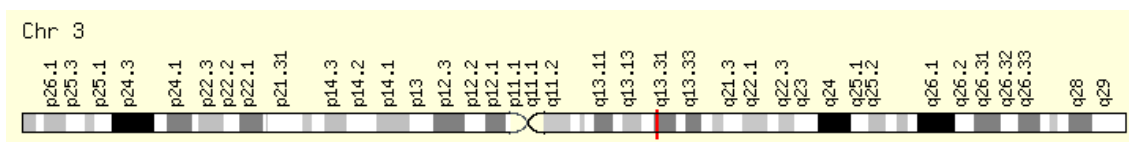
Tab. 4: Testované endogenní kontroly v rámci projektu GA ČR: 14-03708S Endogenní kontroly byly testované na stálou expresi ve 3 vybraných částech mozku. Křížkem jsou označeny endogenní kontroly bez stálé exprese.

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 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 poruch, 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. 9).



Obr. 9: Umístění genu *DRD3* na lidském chromosomu 3. Naznačeno červeně. Převzato [cit. 2017-11-30]: GeneCards: Human gene database, *ostupné online*.

Známe 5 dopaminových receptorů, tzv. D_{1-5} , které jsou spřaženy s G-proteinem ovlivňujícím aktivitu adenylátcyklázy. Dělíme je do dvou skupin podle toho, zda adenylátcyklázu stimulují prostřednictvím G_S -proteinu (D_1 , D_5), nebo inhibují prostřednictvím G_I -proteinu (D_2 , D_3 , D_4) (Jönsson et al., 2003). Jednotlivé struktury CNS se liší denzitou a zastoupením jednotlivých receptorů. Např. motorické korové oblasti jsou bohaté na D_2 , na rozdíl od limbického systému, kde převládají receptory D_3 a D_4 .

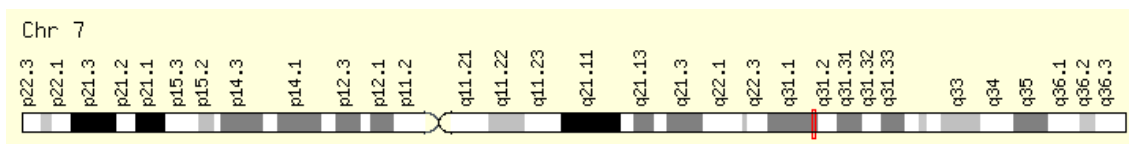
Předpokládá se, že genetické varianty dopaminergních receptorů ovlivňují individuální citlivost na MA a čas nástupu psychózy. MA se v CNS přímo váže na dopaminergní receptory všech podtypů ($D_1 - 5$) (Ujike et al., 2009; Utsunomiya et al., 2008). Primárním účinkem MA je zvýšení koncentrace dopaminu 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 mutací v tomto genu trpí tzv. apraxií řeči, což ztěžuje vytváření sekvencí zvuků, slabik a slov (obr. 10). 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.

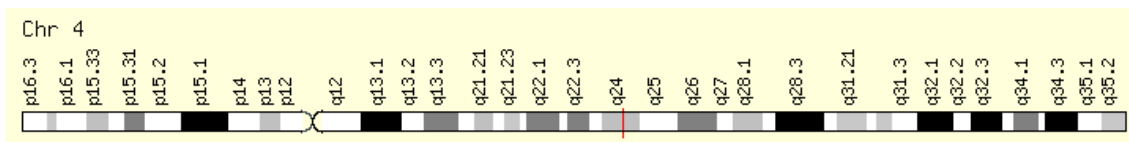
Objevují se problémy se čtením, psaním, pravopisem a gramatikou. Často také dochází ke zpomalení vývoje motorických dovedností, jako jsou chůze či jemná motorika a k poruchám autistického spektra, které je charakterizováno narušením komunikace a sociální interakce (Lai et al., 2003).



Obr. 10: Umístění genu FOXP2 na lidském chromosomu 7. Naznačeno červeně. Převzato [cit. 2017-11-30]: GeneCards: Human gene database, dostupné online.

III. Gen TACR3

Gen TAC3 kóduje neurokinin B a gen TACR3 (obr. 11) 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).



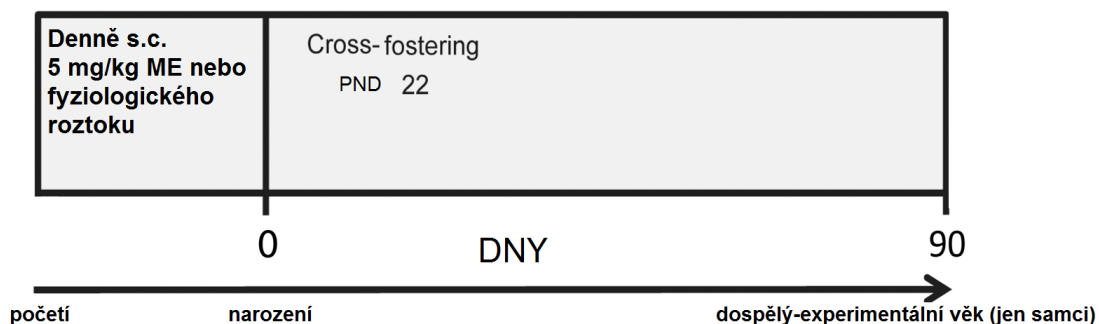
Obr. 11: Umístění genu TACR3 na lidském chromosomu 4. Naznačeno červeně. Převzato [cit. 2017-11-30]: GeneCards: Human gene database, dostupné online.

4 Materiál

Pro pokus bylo použito 8 samic METH a 8 samic SAL, od každé byl do pokusu zařazen právě jeden dospělý samec. Tito potkani byli následně testováni na změnu genové exprese ve vybraných částech mozku a výsledky byly mezi sebou srovnány.

4.1 Zvířata a chov

Schéma celého experimentu je znázorněno na obr. 12. Dospělých 8 samic potkana kmene Wistar (Charles River Laboratories International, Inc., váha 250-300 g) bylo umístěno při konstantní teplotě (21 ± 2 °C) a relativní vlhkosti (60 %) v místnosti se standardním denním cyklem 12 hodin světla (rozsvítí se v 06:00). Po uplynutí doby aklimatizace, jídlo a voda ad libitum, byla každá samice na počátku estrálního cyklu (testováno vaginálním stěrem) individuálně na noc umístěna do speciální klece se sexuálně zralým samcem. Sexuální kontakt byl zjišťován pomocí vaginálních stěrů testovaných na přítomnost spermií. Pokud byly ve vaginálním stěru zjištěny spermie, byl zaznamenán první den gestace a samice byla vrácena do své domácí klece. Březím samicím byl podáván denně D-metamfetamin s HCl - hydrochloridem (Sigma Aldrich) v dávce 5 mg/kg/den subkutánně (s.c.) (v objemu 1 ml/kg) po celou dobu gestace, která trvala 22 ± 1 den; kontrolním samicím byl injikován fyziologický roztok (99% NaCl – chlorid sodný, v objemu 1 ml/kg). Dávka 5 mg/kg byla zvolena proto, že indukuje koncentrace MA v mozku plodů a změny v chování podobné těm, které se vyskytují u lidí (Acuff-Smith et al., 1996). Navíc tato dávka nevyvolává potraty či předávkování (smrt) březích samic (Šlamberová et al., 2005) a neovlivňuje délku gestace, přírůstek hmotnosti ani míru úmrtnosti mláďat časně po narození (Hrubá et al., 2009, Malinová-Ševčíková et al., 2014).



Obr. 12: Schéma experimentu. Březím samicím byl denně s.c. injektován ME v dávce 5 mg/kg/den nebo fyziologický roztok. Upraveno podle Fujáková-Lipsky et al., 2017.

I. Aplikace MA

Samice byly náhodně rozřazeny do metamfetaminové skupiny (METH) a kontrolní skupiny (SAL). METH samicím byl podáván MA s.c. denně v dávce 5 mg/kg/den po celou dobu gestace. Každé zvíře dostalo množství 1 ml/kg roztoku. Dávka 5 mg/kg/den byla stejná jako u předchozích prací (Šlamberová et al., 2005, 2006). Rostok byl samicím podáván s.c. vždy ve stejný čas a ve stejném objemu. Kontrolním samicím ze SAL skupiny byl stejným způsobem injektován fyziologický roztok.

II. Porod

V 21. den gestace byly samice odebrány ze skupinových klecí a umístěny do mateřských klecí. Očekávaný den porodu v naší kolonii činil 22. den. Nebyly zaznamenány žádné samice s kratší délkou březosti než 22 dní. V obou skupinách bylo 8 matek. Datum porodu bylo zaznamenáno jako postnatální den (PND) 0.

III. Cross-fostering

V PND 1 byla mláďata křížově prohozena, takže každá matka ze skupiny pečovala jak o svá, tak o cizí mláďata. Počet mláďat v každé kleci byl upraven na 12. Pokud to bylo možné, bylo v každé kleci umístěno stejné množství samců a samic. V obou skupinách v každém vrhu byla mláďata rozložena tak, aby každá matka měla 6 mláďat vlastních a 6 mláďat od dvou dalších samic. Pro pokus bylo použito 8 samic METH a 8 samic SAL, od každé byl do pokusu zařazen právě jeden dospělý samec.

Vyhnutí jsme se tak testování sourozenců a jedinců pocházejících z jedné hierarchické skupiny. Pro identifikaci byl METH mláďatům intradermálně injikován černý inkoust India do levé tlapky a SAL mláďatům do pravé.

Během doby, kdy byla mláďata mimo klec, byla na vyhřívané podložce. V rámci tohoto pokusu nebyla mláďata nijak zkoumána. Potomci zůstali experimentálně naivní. Snažili jsme se tak vyvarovat jakékoli stresové zátěže, která by mohla interferovat s prenatálními účinky MA. V PND 21 byla mláďata odstavena a rozdělena podle pohlaví.

Všechny experimentální postupy pro zacházení se zvířaty byly přezkoumány a schváleny Ústřední komisí pro ochranu zvířat třetí lékařské fakulty Univerzity Karlovy 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 a respektovaly pokyny Rady Evropské unie (86/609/EU). V rámci tohoto pokusu nebyli potkani před dekapitací nijak testováni. Jednak se zabránilo interferenci MA zvířat se stresem a jednak tým prof. Šlamberové testoval nejrůznější parametry v rámci předchozích studií a pozorování a pokus tedy přímo vychází z předchozích závěrů a zjištění.

4.2 Přístrojová technika, pomůcky a programy

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

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

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

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

Centrifuga Z 300 (Hermle)

Centrifuga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Hlubokomrazící 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)

4.3 Chemikálie, reaktanty 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 ponořena do zkumavky s roztokem 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 v množství 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 2 ml ependorfe. 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 odebrán 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 odebrán a peleta byla sušena 5-10 minut v laminárním boxu.
17. K peletě bylo přidáno 200-300 μ l (v závislosti na velikosti pelety) RNase free vody.
18. Celková RNA byla vysrážena přidáním 60 μ 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. V tomto stavu mohl vzorek zůstat několik dní až týdnů, v tom případě byl uložen do -80 °C.
20. Po rozmražení byl vzorek stočen při 180000 x g po dobu 20-30 minut při 4 °C.
21. Supernatant byl odeberán.
22. Pelety byly promývány 500 μ 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 μ g/ μ l.
25. Vzorky byly stočeny, po dobu 5-7 minut zahřívány při 65 °C a třepány.
26. Na spektrofotometru bylo změřeno množství RNA ve vzorku. Na měření optické hustoty A260 byl použit 1 μ 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 DNázou 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 μ l, bylo přeneseno 100 μ g nebo méně RNA.
2. Celková RNA byla vysrážena přidáním 60 μ 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 μ 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 μ g/ μ 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 μ l vzorku, poměr nastaven na A260/A280.
11. Takto upravené vzorky byly buďto dále zpracovány pomocí reverzní transkripce nebo 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. DNáza je senzitivní k fyzické denaturaci, tudíž se nevortexuje. Mícháme opatrně protřepáním zkumavky či pipetováním a krátce stáčíme.
2. Pro přečištění vzorku byl použit 1 μ l DNázy na 8 μ l vzorku.
3. Vzorky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě.
4. Poté byl ke každému vzorku přidán 1 μ 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 μ 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. 5) na 20 μ l reakce.
2. Bylo přidáno tolik RNA, aby její celkové množství v reakci bylo do 2 μ g.
3. Reakční směs byla doplněna DNase free vodou do 20 μ l, promíchána a krátce stočena.
4. Vzorky byly umístěny do termocykleru s nastaveným programem pro reverzní transkripci (tab. 6).

Tab. 5: Příprava reakční směsi pro reverzní transkripci

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

Tab. 6: Nastavení termocykleru pro reverzní transkripci.

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

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 milionkrát s použitím sekvence 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 vzorku - 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 hledanou sekvenci, nakonec se vytvoří dostatečně silný signál překračující fluorescenční práh.

5.4.1 Postup real-time PCR amplifikace

Pro každý sledovaný gen byla připravena reakční směs (tab. 7). Množství směsi bylo upraveno dle počtu měřených vzorků se započítanou negativní kontrolou a vše násobeno protože 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 μ l cDNA bylo přidáno 15 μ 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. 8).

Tab. 7: Reakční směs pro jednu reakci real-time PCR.

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

Tab. 8: 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 ΔC_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 kvantifikace genové exprese byla porovnávána relativní změna genové exprese ve více vzorcích. Jako kontrolní (tzv. endogenní) 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 ΔC_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 δ_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 byly statisticky vyhodnocovány výsledky celogenomového screeningu exprese genů metodou microarray hybridizace ze dvou částí mozku (striata a hipokampu) a výsledky exprese 13 genů testovaných ve třech částech mozku (striatu, prefrontálním kortexu a hipokampu) metodou real-time PCR. Ze statistického vyhodnocení microarray hybridizace nevyšla změněná exprese u žádného z testovaných genů signifikantně. V rámci testování genové exprese pomocí real-time PCR byla detekována signifikantně změněná genová exprese ve striatu a v prefrontálním kortexu. Statisticky byly srovnány hodnoty potkanů prenatalně vystavených MA s hodnotami kontrolních potkanů. Statistická významnost byla vytvořena pro každý z testovaných genů, *DRD3*, *TACR3*, *FOXP2*, vztažených ku dvěma endogenním kontrolám, *B2M* a *RPS6* (tab. 9). Po statistickém vyhodnocení real-time PCR byla ve striatu nalezena signifikantně zvýšená genová exprese u genů *DRD3* a *TACR3*, vztažena ku jedné z používaných endogenních kontrol. U genu *FOXP2* byly naměřeny hodnoty pro sníženou genovou expresi v prefrontálním kortexu. 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. 9: Tabulka p hodnot ze statistického vyhodnocení relativní exprese mRNA. Testovány byly 3 geny, *DRD3*, *TACR3*, *FOXP2*, vztažené ke 2 endogenním kontrolám, *B2M* a *RPS6*, ve třech částech mozku. MA potkani vs. kontrolní potkani. Zeleně zvýrazněny statisticky signifikantní změny: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$

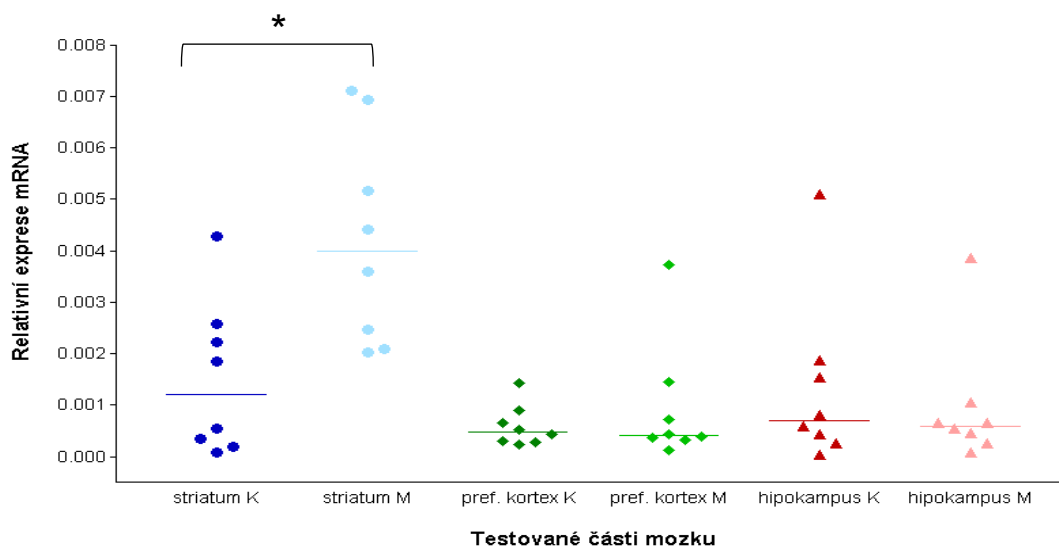
Část mozku/gen	<i>DRD3 ku</i>		<i>TACR3 ku</i>		<i>FOXP2 ku</i>	
	<i>B2M</i>	<i>RPS6</i>	<i>B2M</i>	<i>RPS6</i>	<i>B2M</i>	<i>RPS6</i>
Striatum	* 0,0148	0,879	** 0,0023	0,9497	0,5054	0,4418
Prefrontální kortex	0,8785	0,879	0,3823	0,9591	0,3282	* 0,0281
Hipokampus	0,7209	X	0,8785	0,1304	0,6454	0,7984

6.1 Výsledky testování genu *DRD3*

Výsledky celogenomového screeningu metodou microarray hybridizace naznačily hraniční zvýšení v expresi genu *DRD3*. Změna exprese tohoto genu byla následně testována ve třech vybraných částech mozku metodou real-time PCR, která odhalila hraniční zvýšení exprese. Bylo testováno 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených metamfetaminu, kontrolou bylo 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených fyziologickému roztoku. Na podkladě výsledků microarray hybridizace byl tento gen dále testován metodou real-time PCR. Měřená genové exprese pro gen *DRD3* byla vztažena k endogenní kontrole *B2M* (graf 2) a *RPS6* (graf 3). Grafy byly vytvořeny na podkladě statistického vyhodnocení výsledků real-time PCR přiložených níže (tab. 10).

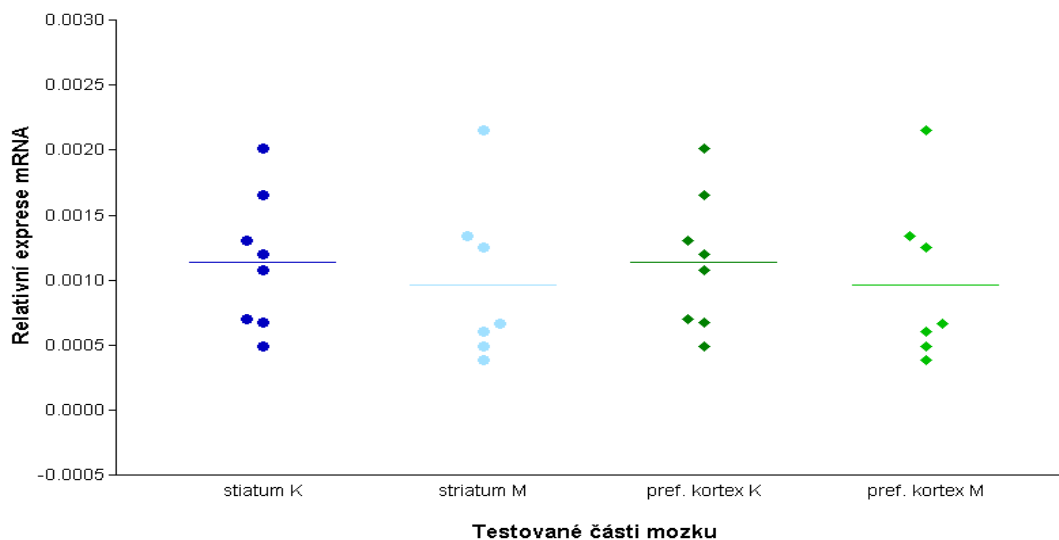
Změněná genová exprese ve smyslu signifikantního zvýšení exprese genu *DRD3* u MA potkanů oproti kontrolním byla nalezena ve striatu v porovnání s endogenní kontrolou *B2M*. Výsledky srovnání s endogenní kontrolou *RPS6* nebyly v této části mozku statisticky významné. V prefrontálním kortexu a v hipokampu nebyla nalezena žádná statisticky významná změna exprese. V hipokampu navíc došlo k chybě během real-time PCR a data pro endogenní kontrolu *RPS6* nebylo možno vyhodnotit. Danou metodu nebylo možno opakovat z důvodu malého množství testovaného vzorku.

Vztah relativní exprese mRNA DRD3 ku B2M



Graf 2: Srovnání relativní exprese mRNA genu DRD3 ku B2M ve striatu, prefrontálním kortexu a hipokampu. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu. * - $p \leq 0,05$

Vztah relativní exprese mRNA DRD3 ku RP6S



Graf 3: Srovnání relativní exprese mRNA genu DRD3 ku RPS6 ve striatu a prefrontálním kortexu. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu.

Tab. 10: Statistické vyhodnocení real-time PCR. Data pro statistiku: **A)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *DRD3* ve striatu; **B)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *DRD3* v hipokampu; **C)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *DRD3* v prefrontálním kortexu. **M** – metamphetamine; **K** – kontrola; **S** – striatum; **H** – hipokampus; **P** – prefrontální kortex; vlevo: hodnoty vztaženy k endogenní kontrole *B2M*, vpravo ku *RPS6*. * - $p \leq 0,05$

Statistické vyhodnocení real-time PCR pro gen *DRD3*

Vyhodnocení p-value (MA potkání vs. kontrolní potkání)

část mozku	<i>DRD3</i> ku <i>B2M</i>	<i>DRD3</i> ku <i>RP6S</i>
Striatum	* 0,0148	0,8785
Hipokampus	0,7209	X
Prefrontální kortex	0,8785	0,8785

A) *DRD3* - Striatum

ku <i>B2M</i>		ku <i>RPS6</i>	
Potkání kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkání kontrolní	relativní exprese mRNA
1KS	0,000196	1KS	0,000903
2KS	0,000074	2KS	0,000425
3KS	0,000334	3KS	0,001889
4KS	0,000553	4KS	0,003983
5KS	0,002220	5KS	0,005417
6KS	0,002570	6KS	0,014486
7KS	0,001840	7KS	0,007640
8KS	0,004268	8KS	0,019822
Potkání ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkání ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MS	0,006939	1MS	0,018695
2MS	0,004401	2MS	0,015680
3MS	0,003594	3MS	0,005839
4MS	0,007115	4MS	0,009215
5MS	0,005152	5MS	0,016948
6MS	0,002026	6MS	0,009709
7MS	0,002459	7MS	0,005294
8MS	0,002084	8MS	0,004240

B) DRD3 – Hipokampus

ku B2M		ku RPS6	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KH	0,000261	1KH	-
2KH	0,005094	2KH	-
3KH	0,001546	3KH	-
4KH	0,000034	4KH	-
5KH	0,000818	5KH	-
6KH	0,000429	6KH	-
7KH	0,000578	7KH	-
8KH	0,001876	8KH	-
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MH	0,000646	1MH	-
2MH	0,003855	2MH	-
3MH	0,000654	3MH	-
4MH	0,000068	4MH	-
5MH	0,000257	5MH	-
6MH	0,000539	6MH	-
7MH	0,000447	7MH	-
8MH	0,001055	8MH	-

C) DRD3 - Prefrontální kortex

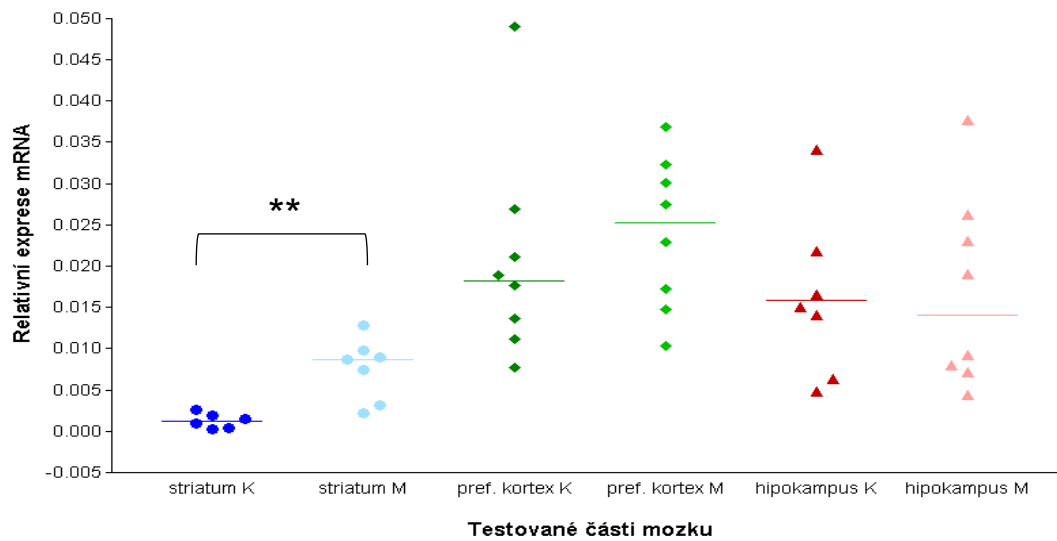
ku B2M		ku RPS6	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KP	0,0008962	1KP	0,002013
2KP	0,0004363	2KP	0,001203
3KP	0,0005110	3KP	0,000674
4KP	0,0002429	4KP	0,001657
5KP	0,0002784	5KP	0,000696
6KP	0,0002995	6KP	0,001075
7KP	0,0014170	7KP	0,000486
8KP	0,0006515	8KP	0,001304
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MP	0,000128	1MP	0,000384
2MP	0,000432	2MP	0,001253
3MP	0,000359	3MP	0,000492
4MP	0,000380	4MP	0,000605
5MP	0,001450	5MP	0,002152
6MP	0,000326	6MP	0,000668
7MP	0,000727	7MP	0,001335
8MP	0,003725	8MP	0,008293

6.2 Výsledky testování genu *TACR3*

Výsledky celogenomového screeningu metodou microarray hybridizace naznačily hraniční zvýšení v expresi genu *TACR3*. Bylo testováno 8 dospělých potkanů prenatálně vystavených metamfetaminu, kontrolou bylo 8 dospělých potkanů prenatálně vystavených fyziologickému roztoku. Na podkladě výsledků microarray hybridizace byl tento gen dále testován metodou real-time PCR. Měřená genové exprese pro gen *TACR3* byla vztažena k endogenní kontrole *B2M* (graf 4) a *RPS6* (graf 5). Grafy byly vytvořeny na podkladě statistického vyhodnocení výsledků real-time PCR přiložených níže (tab. 11).

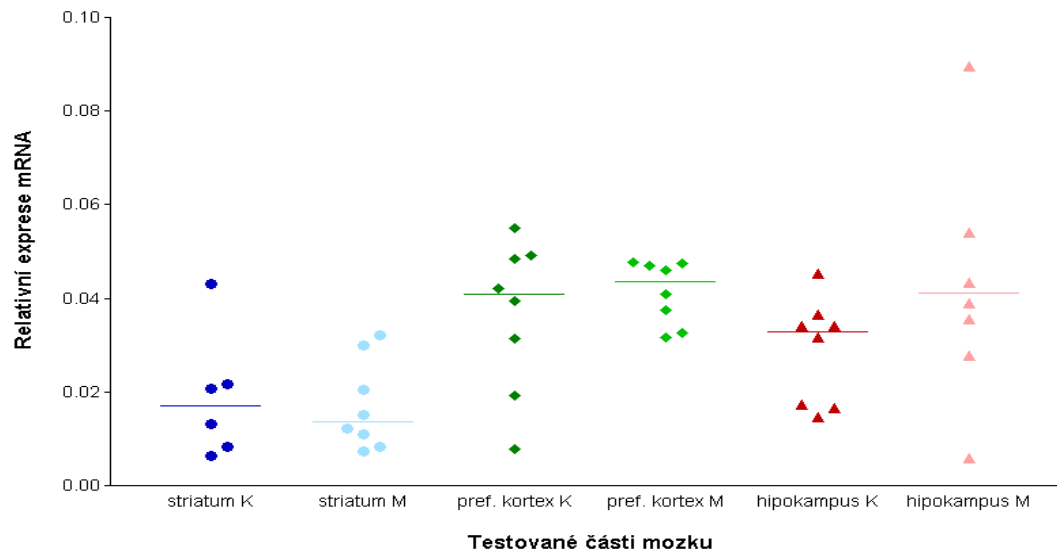
Změněná genová exprese ve smyslu signifikantního zvýšení exprese genu *TACR3* u MA potkanů oproti kontrolním byla nalezena ve striatu v porovnání s endogenní kontrolou *B2M*. Výsledky srovnání s endogenní kontrolou *RPS6* nebyly v této části mozku statisticky významné. Během přípravy real-time PCR došlo k chybě a pro malé množství vzorku již nebylo možné metodu opakovat. Proto hodnoty z real-time PCR ze striata pro kontrolní potkany 6 a 8 vztažené ku oběma endogenním kontrolám a pro potkana 6 prenatálně vystaveného metamfetaminu k endogenní kontrole *B2M* nemáme k dispozici. V prefrontálním kortexu a v hipokampu nebyla nalezena žádná statisticky významná změna exprese.

Vztah relativní exprese mRNA TACR3 ku B2M



Graf 4: Srovnání relativní exprese mRNA genu TACR3 ku B2M ve striatu, prefrontálním kortexu a hipokampu. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu. ** - $p \leq 0,01$

Vztah relativní exprese mRNA TACR3 ku RP6S



Graf 5: Srovnání relativní exprese mRNA genu TACR3 ku RPS6 ve striatu, prefrontálním kortexu a hipokampu. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu.

Tab. 11: Statistické vyhodnocení real-time PCR. Data pro statistiku: **A)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *TACR3* ve striatu; **B)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *TACR3* v hipokampu; **C)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *TACR3* v prefrontálním kortexu. **M** – metamfetamine; **K** – kontrola; **S** – striatum; **H** – hipokampus; **P** – prefrontální kortex; nalevo vztaženy k endogenní kontrole B2M, napravo ku RPS6. ** - $p \leq 0,01$

Statistické vyhodnocení real-time PCR pro gen *TACR3*

Vyhodnocení p-value (MA potkani vs. kontrolní potkani)

Část mozku	<i>TACR3</i> ku B2M	<i>TACR3</i> ku RPS6
Striatum	** 0,0023	0,9497
Hipokampus	0,8785	0,1304
Prefrontální kortex	0,3823	0,9591

Vyřazená hodnota

A) *TACR3* - Striatum

ku RPS6		ku B2M	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KS	0,000199	1KS	0,021725
2KS	0,000899	2KS	0,013112
3KS	0,001983	3KS	0,008266
4KS	0,000463	4KS	0,020767
5KS	0,001483	5KS	0,006352
6KS		6KS	
7KS	0,002549	7KS	0,04300035
8KS		8KS	
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MS	0,002140	1MS	0,007314
2MS	0,003171	2MS	0,011033056
3MS	0,008618	3MS	0,015117
4MS	0,012855	4MS	0,020386
5MS	0,009024	5MS	0,032148
6MS		6MS	0,029976
7MS	0,009774	7MS	0,012245
8MS	0,007400	8MS	0,008410

B) TACR3 - Hipokampus

ku RPS6		ku B2M	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KH	0,017389	1KH	0,004843
2KH	0,014707	2KH	0,006323
3KH	0,045290	3KH	0,021862
4KH	0,016587	4KH	0,016587
5KH	0,031545	5KH	0,014084
6KH	0,0364063	6KH	0,0150661
7KH	0,034165	7KH	0,140301
8KH	0,034034	8KH	0,034034
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MH	0,035489	1MH	0,007103
2MH	0,0058217	2MH	0,0044528
3MH	0,038831	3MH	0,026240
4MH	0,089357	4MH	0,037691
5MH	0,348527	5MH	0,008053
6MH	0,027633	6MH	0,009180
7MH	0,043267	7MH	0,019049
8MH	0,053980	8MH	0,023105

C) TACR3 – Prefrontální kortex

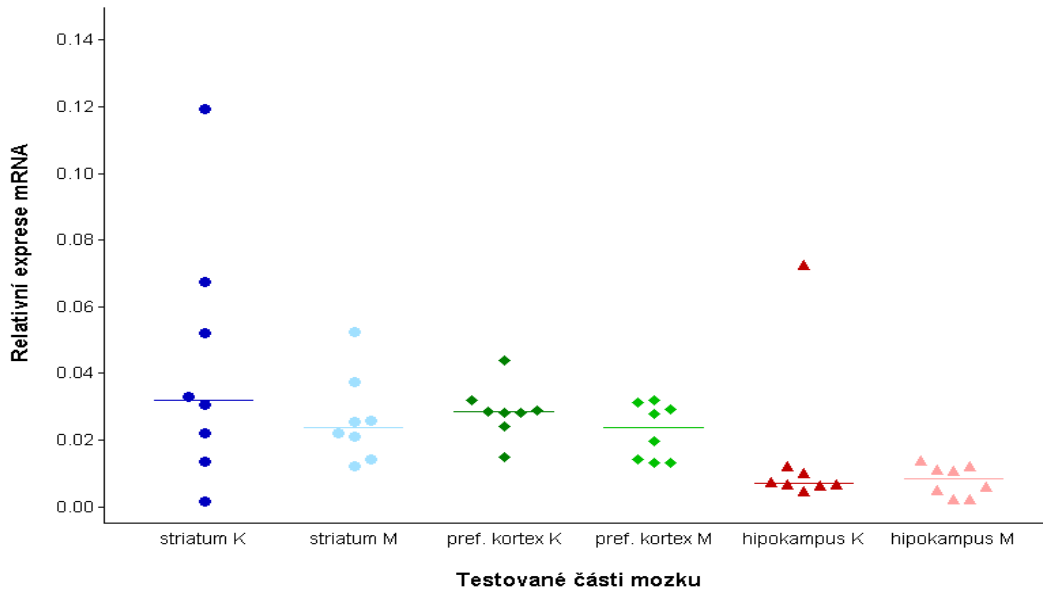
ku RPS6		ku B2M	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KP	0,042029	1KP	0,026902
2KP	0,048426	2KP	0,021153
3KP	0,019163	3KP	0,013624
4KP	0,007722	4KP	0,007722
5KP	0,039465	5KP	0,017640
6KP	0,0548668	6KP	0,0188647
7KP	0,031460	7KP	0,011187
8KP	0,049032	8KP	0,049032
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MP	0,031661	1MP	0,010299
2MP	0,046072	2MP	0,0172851
3MP	0,037380	3MP	0,030100
4MP	0,047693	4MP	0,036795
5MP	0,040817	5MP	0,027524
6MP	0,047384	6MP	0,022839
7MP	0,046922	7MP	0,032275
8MP	0,032525	8MP	0,014776

6.3 Výsledky testování genu *FOXP2*

Výsledky celogenomového screeningu metodou microarray hybridizace naznačily hraniční snížení v expresi genu *FOXP2*. Bylo testováno 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených metamfetaminu, kontrolou bylo 8 dospělých potkanů prenatalně vystavených fyziologickému roztoku. Na podkladě výsledků microarray hybridizace byl tento gen dále testován metodou real-time PCR. Měřená genová exprese pro gen *FOXP2* byla vztažena k endogenní kontrole *B2M* (graf 6) nebo *RPS6* (graf 7). Grafy byly vytvořeny na podkladě statistického vyhodnocení výsledků real-time PCR přiložených níže (tab. 12).

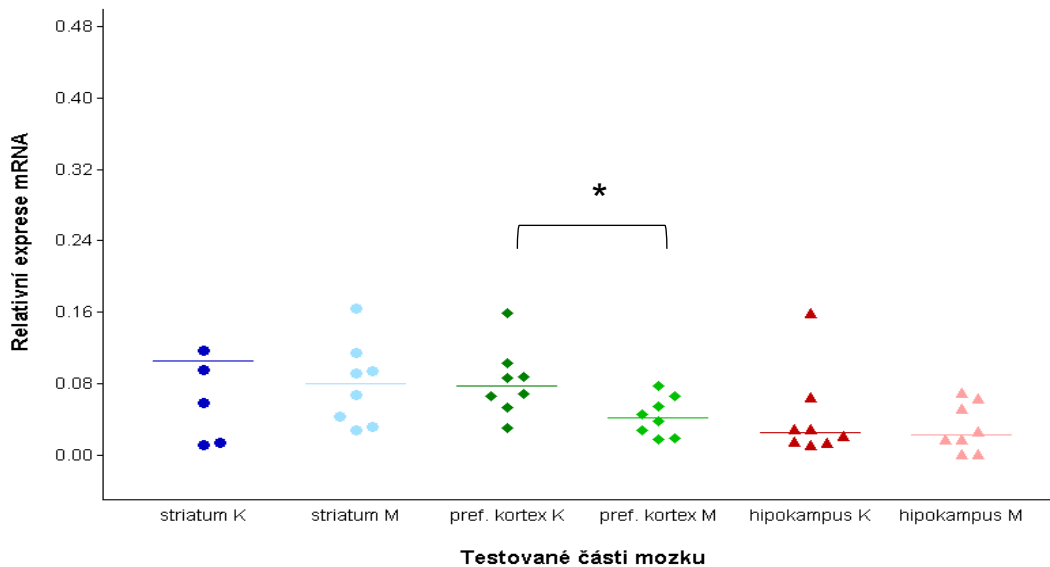
Změněná genová exprese ve smyslu snížení exprese genu *FOXP2* byla nalezena v prefrontálním kortexu v porovnání s endogenní kontrolou *RPS6*. Výsledky pro endogenní kontrolu *B2M* nebyly statisticky významné. Ve striatu a v hipokampu nebyla nalezena žádná statisticky významná změna exprese.

Vztah relativní exprese mRNA FOXP2 ku B2M



Graf 6: Srovnání relativní exprese mRNA genu FOXP2 ku B2M ve striatu, prefrontálním kortexu a hipokampu. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu.

Vztah relativní exprese mRNA FOXP2 ku RP6S



Graf 7: Srovnání relativní exprese mRNA genu FOXP2 ku RPS6 ve striatu, prefrontálním kortexu a hipokampu. Pref. kortex – prefrontální kortex; K – potkani kontrolní; M – potkani prenatálně vystavení metamfetaminu. * - $p \leq 0,05$

Tab. 12: Statistické vyhodnocení real-time PCR. Data pro statistiku: **A)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *FOXP2* ve striatu; **B)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *FOXP2* v hipokampu; **C)** ΔC_T z real-time PCR pro gen *FOXP2* v prefrontálním kortexu. **M** – metamfetamin; **K** – kontrola; **S** – striatum; **H** – hipokampus; **P** – prefrontální kortex; nalevo vztaženy k endogenní kontrole B2M, napravo ku RPS6. * - $p \leq 0,05$

Statistické vyhodnocení real-time PCR pro gen *FOXP2*

Vyhodnocení p-value (MA potkání vs kontrolní potkání)

Část mozku	<i>FOXP2</i> ku B2M	<i>FOXP2</i> ku RPS6
Striatum	0,5054	0,4418
Hipokampus	0,6454	0,7984
Prefrontální kortex	0,3282	* 0,0281

Vyřazená hodnota



A) *FOXP2* - Striatum

ku RPS6		ku B2M	
Potkání kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkání kontrolní	relativní exprese mRNA
1KS		1KS	0,052034
2KS	0,010687	2KS	0,001660
3KS	0,014154	3KS	0,013378
4KS	0,116967	4KS	0,021918
5KS	0,058878	5KS	0,033075
6KS	0,937371	6KS	0,067477
7KS	0,095301	7KS	0,030599
8KS	2,402490	8KS	0,119453
Potkání ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkání ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MS	0,163889	1MS	0,052341
2MS	0,093730	2MS	0,025278
3MS	0,027377	3MS	0,012275
4MS	0,031317	4MS	0,020928
5MS	0,091964	5MS	0,022113
6MS	0,115068	6MS	0,037304
7MS	0,067897	7MS	0,025760
8MS	0,042585	8MS	0,014135

B) FOXP2 - Hipokampus

ku RPS6		ku B2M	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KH	0,065081	1KP	0,012178
2KH	0,158814	2KP	0,072410
3KH	0,015178	3KP	0,006157
4KH	0,011403	4KP	0,004741
5KH	0,021837	5KP	0,006614
6KH	0,029386	6KP	0,007287
7KH	0,013450	7KP	0,006570
8KH	0,028895	8KP	0,009959
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MH	0,052462	1MH	0,010678
2MH	0,001648	2MH	0,002277
3MH	0,001710	3MH	0,002169
4MH	0,017065	4MH	0,004919
5MH	0,063938	5MH	0,012074
6MH	0,070163	6MH	0,013878
7MH	0,018256	7MH	0,005932
8MH	0,026506	8MH	0,010969

C) FOXP2 – Prefrontální kortex

ku RPS6		ku B2M	
Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA	Potkani kontrolní	relativní exprese mRNA
1KP	0,030212	1KP	0,014874
2KP	0,087309	2KP	0,028174
3KP	0,066024	3KP	0,028646
4KP	0,159017	4KP	0,028255
5KP	0,068256	5KP	0,024070
6KP	0,103481	6KP	0,043772
7KP	0,086637	7KP	0,028875
8KP	0,053837	8KP	0,031779
Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA	Potkani ovlivnění MA	relativní exprese mRNA
1MP	0,077812	1MP	0,032085
2MP	0,045157	2MP	0,013092
3MP	0,038487	3MP	0,031334
4MP	0,017076	4MP	0,014340
5MP	0,028261	5MP	0,019741
6MP	0,066585	6MP	0,029270
7MP	0,018623	7MP	0,013034
8MP	0,054044	8MP	0,027780

7 Diskuse

V této práci, na kterou bude plynule navazovat další výzkum naší laboratoře, jsme se u dospělého potkana zaměřili na hodnocení hladin exprese vybraných genů, které by mohly být ovlivněny prenatální expozicí MA, a porovnávali jsme ji ve vztahu k endogenní kontrole. Genovou expresi jsme studovali ve specifických částech mozku potkana, a to ve striatu, hipokampu a prefrontálním kortexu. Pro účely této diplomové práce byly ze všech testovaných genů vybrány geny *DRD3*, *TACR3* a *FOXP2*. Vycházeli jsme z předpokladu, že tyto geny mohou být asociovány s psychomotorickým vývojem a případným orgánovým postižením dětí. Dospělí potkani prenatálně vystavení MA byli porovnáváni ve vztahu ke kontrolní skupině. Cílem práce bylo popsat dlouhodobé účinky MA na genovou expresi v mozku dospělého potomstva matky, která během těhotenství požívala drogu.

Pro pochopení ovlivnění genetického pozadí bylo však nutné se nejprve široce seznámit s výstupy z klinických testů a pozorování dětí závislých matek na MA. Předpoklad, že rodičovská zkušenost může ovlivnit chování potomků, není ničím novým. Pochopení změn v genomu v důsledku užívání drogy nám může v budoucnu poskytnout východisko k pochopení transgeneračního přenosu drogové závislosti. Dosud se studie zkoumající prenatální (multi- a trans- generační) vliv užívání drog zaměřovaly především na kokain (Forman et al., 2017; Smith et al., 2016; Mentis et al., 1995), heroin (Vassoler et al., 2014; Vyssotski, 2011), alkohol (Govorko et al., 2012) a nikotin (Zhu et al., 2014). Ve spolupráci s týmem Šlamberové tento projekt poskytuje jedny z prvních dat k problematice prenatálního vlivu MA na genetický podklad vývoje mozku a systém neurotransmiterů v dospělém mozku potkana. Předpokládáme, že opakované podávání MA samicím potkana v období březosti má dlouhodobý dopad na expresi genové informace v mozku a tedy i na excitačně-inhibiční rovnováhu dospělého jedince. Naše data z exponovaných potomků jsou v souladu s dlouhodobou neurotoxicitou MA k dopaminergním a serotonergním neuronům. Takováto neurochemická nerovnováha může mít zásadní vliv na kognitivní a behaviorální funkce stejně jako může zvyšovat náchylnost k psychotickým záchvatům u lidí.

Jak již bylo řečeno dříve, po požití MA nastupuje zvýšená psychomotorická aktivita, potlačení únavy, vybuzenost, zvýšená sexuální aktivita, euforické stavy a v průběhu času se rozvíjí anorektický efekt a často také paranoia. V konečném důsledku to vše přispívá k tzv.: „drug-seeking behaviors“ - k vyhledávání drog – a nepřímo tak

zvyšuje všechny toxikologické aspekty zneužívání MA (Cadet et al., 2015). Tyto účinky jsou přisuzovány hlavně zvýšení centrální a periferní monoaminergní signalizace se silným vlivem na noradrenergní (NA) a dopaminergní (DA) systém (5-HT) (Carvalho et al., 2012). Opakované užívání způsobuje výrazné a dlouhodobé dysfunkce v monoaminergní signalizaci, které jsou charakterizovány poklesem hladin monoaminů a jejich metabolitů, snížením počtu vazebných míst pro monoamin transportéry, nižší expresí a / nebo aktivitou enzymů, které se podílejí na syntéze a metabolismu mozkových monoaminových neurotransmiterů a na neurodegeneraci (zejména na dopaminergních nervových terminálech) (Carvalho et al., 2012). Nepřímé akutní neurální účinky MA zahrnují uvolňování glutamátu v kortikálních a subkortikálních oblastech, stejně jako aktivaci gliových buněk (Carvalho et al., 2012; Rocher et al., 2001).

Všechny tyto účinky jsou již dlouho známy a dobře prostudovány. Doposud se však předpokládalo, že užívání MA ovlivňuje pouze samotného uživatele. Až novodobé studie na zvířecích modelech poukazují na multigenerační a transgenerační efekt užívání MA. Studie provedená kolektivem Fujákové-Lipski et al. (2017) mluví o neurotoxických účincích MA podávaného *in utero*. Ten u potkanů prenatalně vystavených MA ovlivňuje systémy neurotransmiterů. Výsledky ukazují, že expozice MA má za následek snížení bazální hladiny monoaminů a gama-aminokyseliny máselné (GABA), zároveň ale i zvýšení hladiny glutamátu a to ve všech měřených částech mozku (hipokampus, putamen a infralimbický kortex). Data ukazují, že prenatalní expozice MA má silné účinky na monoaminergní, GABAergní a glutamátergní systém, i přesto že expozice MA byla nepřímá, zprostředkovaná matkou přes placentu a omezená na prenatalní období.

V současnosti jsou především zkoumány dlouhodobé toxikologické účinky MA a ovlivnění dopaminergního systému. To má obrovský význam, neb dopaminergní systém hraje zásadní roli v mnoha kognitivních procesech, které se uplatňují v každodenním životě (Stock et al., 2017; Diamond, 2013). Koob (2000) předpokládá, že ovlivnění dopaminergní dráhy MA zahrnuje změnu v odpovědi na odměnu po podání drogy, což může představovat adaptační stav přispívající k nebezpečí relapsů. Byly pozorovány změny v prefrontální a limbické oblasti mozku člověka, které se běžně vyskytují u drogově závislých, nalezeny byly však i u jejich potomků (Okada et al., 2016; Bisagno et al., 2016; Salo et al., 2011; Chang et al., 2007). Kognitivní funkce zprostředkované prefrontálním kortexem silně zodpovídají za školní připravenost dítěte, jeho úspěšnost ve školním i pracovním životě a jeho fyzické i psychické zdraví (Diamond, 2013).

Zdá se, že multi- a trans- generační efekt závislosti má devastující účinky na následující generace potomků a vede k silným sociálním problémům. Poškození v jistých kognitivních drahách u dětí závislých matek pravděpodobně vede k vyšší ochotě stát se závislým na (jakékoli) návykové látce (Stock et al., 2017).

Experimentální studie zjistily, že dávka 5-10 mg/kg MA podávaná březím samicím potkana vytváří podobnou koncentraci drogy v mozku mláděte, jaká je v mozku dětí závislých matek (Acuff-Smith et al., 1996; Yamamoto et al., 1992; Cho et al., 1991). Tato dávka je tedy vhodná pro použití na zvířecím modelu pro objasnění rizika spojeného s prenatálním vystavením MA. Starší studie popisují, že opakované podkožní podávání MA březím samicím potkana vedlo k vyšší incidenci potratů a smrti matky oproti kontrole (Acuff-Smith et al., 1992). Samice vystavené MA měly kratší dobu gestace, menší hnízdo a v průběhu březosti nižší přírůstek hmotnosti (Martin et al., 1974). Prenatální podávání MA zvýšilo riziko úmrtí novorozeneckých mláďat a zmenšilo jejich délku, bylo pozorováno opoždění ve vývoji, v otevření očí a funkčních reflexech (Acuff-Smith et al., 1992; Yamamoto et al., 1992; Cho et al., 1991). Závěry těchto studií jsou však navzájem v rozporu. Zatímco Cho et al. (1991) prokázali negativní účinek prenatální expozice MA na obracecí reflex, Weissman et al. (1993) neprokázali v tomto směru žádný účinek. Podobně protichůdné jsou také údaje o účinku prenatální expozice MA na dobu otevírání očí. Weissman et al. (1993) nenašli žádný účinek, zatímco Martin (1974) zjistil opožděné otevírání očí. Bylo však prokázáno, že velmi vysoké dávky (50 mg/kg) MA podávaného prenatálně indukují těžké oční vady, jako je např. anoftalmie, mikroftalmie a oddělená sítnice (Acuff-Smith et al., 1996 a 1992; Vorhees et al., 1990). Tyto údaje naznačují, že opakované prenatální podání MA může mít dlouhodobě škodlivé účinky na potomstvo, účinek však závisí na dávce MA a na době jeho podání.

Náš projekt přímo navazuje na předchozí studie Šlamberové et al. (2011, 2010, 2006, 2005) zkoumající vliv MA (5 mg/kg/den), podávaného březím samicím potkanů v průběhu celého gestačního období, na morfologický a funkční vývoj mláďat analyzovaných v období laktace. Některá z protichůdných dat ostatních studií (Weissman et al., 1993; Cho et al., 1991; Martin, 1974), jako je obracecí reflex a čas otevírání očí byly v těchto studiích (Šlamberová et al., 2006 a 2005) přezkoumány, testovány byly však i další hodnoty. Podávání MA březím samicím potkana nijak neovlivnilo množství mláďat ve vrhu, počet mrtvě narozených mláďat ani procentuální rozložení pohlaví. Váha mláďat prenatálně ovlivněných MA byla však signifikantně nižší

oproti kontrolním bez ohledu na pohlaví. Samci byly pak v obou skupinách (METH i SAL) těžší než samice. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl v přírůstku hmotnosti mezi testovanými skupinami a zároveň samci přibrali v průběhu laktace více jak samice. Rozdíl v pohlavní maturaci nebyl zaznamenán.

Klinické studie dětí prenatalně ovlivněných MA popisují snížení váhy, délky a obvodu hlavičky, snížení ostražitosti, dotykovou dystonii a visuální a motorické obtíže (Little et al., 1988). Šlamberová et al. (2017 a 2006) zaznamenali, že počet mláďat s otevřenými očima 14. den po narození byl signifikantně menší u skupiny prenatalně vystavené MA, bez ohledu na pohlaví. Obraccí reflex byl na podložce testován od 1. do 12. dne po narození (Altman et al., 1975). Bylo zde zaznamenáno silné ovlivnění mláďat MA. Mláďata ze skupiny byla signifikantně pomalejší v nástupu obraccího reflexu. Navíc se zde objevil významný rozdíl mezi pohlavími ve vztahu ke dni testování. Přičemž samice vystavené prenatalně MA byly signifikantně pomalejší než samci. S postupujícím časem se rozdíl mezi skupinou kontrolní a skupinou vystavenou MA snižoval. Obraccí reflex byl také testován v letu (volném pádu) od 12. dne po narození (Altman et al., 1975), a to až do jeho úplného zvládnutí. Mláďata prenatalně vystavená MA měla v testu signifikantně slabší výkon oproti kontrolním, a to bez ohledu na pohlaví.

Tým Šlamberové et al. (2006) kromě testování již dříve zkoumaných parametrů zařadil navíc testy, jako je „homing“, „rotarod“ a „bar-holding“, které nebyly k vyšetření účinků prenatalní expozice MA dříve použity. Tzv. homing test byl prováděn 15. den po narození. Jde o jednoduchou metodu testování učení. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi METH a SAL skupinou. K podobnému závěru dospěla také skupina Schutové et al. (2013), která zaznamenala silnou změnu chování v neznámém prostředí u potkanů prenatalně vystavených MA. Učení však nebylo ovlivněno, protože potkani se po čase adaptovali a jejich chování odpovídalo kontrolní skupině. Tento trend byl pozorován i v dalších testech zaměřených právě na prostorovou orientaci ve vztahu k učení (Hřebíčková et al., 2016; Macúchová et al., 2013, Schutová et al., 2008). Postižení prostorového učení a změny v odpovědi na stres byly zaznamenány jen u potkanů s neonatálním podáváním MA (Williams et al., 2003).

Pro testování senso-motorické koordinace byl použit test rotarod měřený v PND 23. Po mláďatech byl vyžadován aktivní pohyb proti směru pohybu rovnoměrně rotujícího kotouče a byla sledována jejich schopnost balancovat. Signifikantně nižší počet vědomého seskočení z kotouče bylo nalezeno u samic prenatalně vystavených MA oproti kontrolním i oproti samcům obecně. Mezi samci tento trend nebyl

zaznamenán. Obecně pak mláďata prenatalně vystavená MA byla v testu horší oproti kontrolním. Dalším testem na senso-motorickou koordinaci je tzv.: bar-holding test. Jde o testování uchopovacího reflexu v PND 23. Mezi METH a SAL skupinami nebyl zaznamenán žádný rozdíl. V dřívějších studiích byla pozorována zvýšená aktivita mláďat, ale pomalejší přizpůsobivost ke změnám prostředí (Hřebíčková et al., 2017). Případně byl zjištěn rozdíl v míře zvýšené aktivity u samic a samců prenatalně vystavených MA, kdy samice mají nižší pohybovou aktivitu oproti samcům (Schutová et al., 2013; Hrubá et al., 2012). Schutová et al. (2008) také měřili změny po akutním podání MA samcům potkana prenatalně vystaveným MA. Pohybová aktivita zůstala signifikantně zvýšená, snížila se však úzkost z neznámého prostředí a chování MA potkanů se v tomto směru přiblížilo kontrolní skupině. Klinické studie pak poukazují na naměření zvýšeného svalového tonu a přítomnosti tremoru u novorozenců. V pozdějších měsících je pozorován nepravidelný spánkový rytmus a zhoršená adaptabilita na stres (Wouldes et al., 2004), dále pak nekvalitní spánky, tremor a hypertonie (Little et al., 1988).

Prenatálním podáváním MA byla také silně ovlivněna sociální interakce potkanů. Studie Šlamberové et al. (2014a/b, 2011 a 2010) zaznamenaly vyšší výskyt úzkostných stavů bez rozdílu pohlaví a sníženou sociální interakci samců. Zhoršená paměť, zvýšená citlivost k podávané droze a zvýšená pohybová aktivita, přetrvávající až do dospělosti, se objevila u potkanů prenatalně vystavených amfetaminu (Šlamberová et al., 2014a). Bez ohledu na typ testu však Šlamberová et al. (2014-2005) prokázali, že jak METH tak SAL potomci se v čase s přibývajícím zkušenostmi zlepšují. Dá se proto předpokládat, že MA vůbec nebo jen málo ovlivňuje schopnost učení, vliv však má na rychlost s jakou se jedinec je schopen učít a jeho startovní pozici.

Rozvoj závislosti je ovlivněn genetickou složkou s heritabilitou pohybující se mezi 45-79 % (Kendler et al., 2014). Jedinci s rodinnou zátěží pak mají osmkrát vyšší pravděpodobnost vzniku závislosti, což naznačuje přenos drogové závislosti mezi generacemi. Genetický polymorfismus ovlivňuje míru odolnosti nebo náchylnosti ke vzniku závislosti, projev dědičné závislosti však závisí především na typu užívané látky a na tom, co konkrétně tato látka v těle ovlivňuje (Leggio et al., 2016).

7.1 Gen *DRD3*

Z předchozích studií je známo, že dopaminové receptory D2, D3 a D4 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). Role dopaminového receptoru D2 byla rozsáhle zkoumána ve vztahu k mnoha psychiatrickým onemocněním. Avšak role D3 a D4 receptorů u Parkinsonovy nemoci a drogové závislosti je stejně důležitá.

D2 a D3 receptory si jsou velmi podobné (Sibley et al., 1992). D3 receptor ze 78 % sdílí sekvenci transmembránové domény, včetně vazebného místa, s D2 receptorem. D3 receptor je výrazně distribuován v mozku, především pak v limbickém systému, v nucleus accumbens a olfactory tubercles (Leggio et al., 2016). Tyto části mozku jsou kritické pro regulaci motivace, odpovědi na odměnu a pro kognitivní funkce (Trojan et al., 2011). Funkcí D3 receptoru je mimo jiné inhibiční efekt na impulsní tok dopaminu a obecně na jeho uvolňování. Je prokázáno, že D3-00 myši ($D3^{-/-}$) mají hladiny extracelulárního dopaminu dvakrát vyšší než wild-type myši (Xu et al., 1997). Údaje ze zvířecích modelů, získané za použití vysoce citlivých D3 receptorových ligandů, ukazují zapojení D3 receptoru nejen v odpovědi na podanou drogu a léky, ale také v behaviorální senzitivizaci zahrnující „drug-seeking behavior“ a případné relapsy v rámci abstinence (Heidbreder et al., 2005; Joyce et al., 2004).

V naší práci jsme prokázali statisticky signifikantní zvýšení genové exprese ve striatu u genu *DRD3*. Tyto výsledky odpovídají výsledkům z měření Fujáková-Lipski et al. (2017), kdy extracelulární množství dopaminu bylo signifikantně vyšší u dospělých potomků prenatalně vystavených MA ve srovnání s kontrolami a zároveň došlo i k signifikantnímu zvýšení hladiny dopaminu v hipokampu.

Naopak v rámci studia dlouhodobé závislosti na kokainu (self-administration model) naměřil Caine et al. (1993) pokles exprese D3 receptoru stejně jako Leggio et al. (2014) u dlouhodobého užívání alkoholu. Tato měření odpovídají preklinickým studiím na post-mortem odebraných lidských mozcích, kde dlouhodobé užívání kokainu (Segal et al., 1997/2014/) a MA (Boileau et al., 2012) provázela zvýšená regulace D3 receptoru.

Většina studií dostupných k tomuto roku sleduje změny v expresi D3 receptoru u uživatele návykové látky. Pro pochopení vlivu této změny na potomka je nutné provést více multi- a trans- generačních studií na zvířatech.

Co se poznatků z klinických studií týče, tak studie dětí mladšího školního věku prenatálně vystavených MA ukazují na problémy se sociálním začleněním a vycházením s okolím (Billing et al., 1994). Jejich psychický stav je asociován s depresemi, úzkostnými stavy a emocionální nestabilitou (Abar et al., 2013; Barkus et al., 2010). U těchto dětí se často rozvíjí poruchy chování spojené s agresivitou (Eze et al., 2016; Blair et al., 2001). Předpokládáme, že zásadní roli hraje právě prenatální ovlivnění dopaminových receptorů a změna jejich exprese v mozku.

7.2 Gen *TACR3*

Produkt genu je receptor, který je součástí neuro-peptidového systému, kterému bylo dosud věnováno jen málo pozornosti. Jde o rodinu tachykininů a jejich receptorů neurokininů (NK) s podtypy *NK1*, *NK2* a *NK3*. Tachykininy a jejich receptory jsou široce exprimovány v řadě buněčných typů v periferním a centrálním nervovém systému, kde regulují základní procesy, jako je nocicepce, odměna, motivace, náchylnost k záchvatům a reakce na stres.

Gen *TAC3* kóduje neurokinin B (*NK3*) a gen *TACR3* kóduje jeho receptor. *TACR3* je tachykininový peptidový neurotransmitter / neuromodulátorový receptor převážně exprimovaný v neuronech hipokampu (Smith et al., 2008). Bylo prokázáno, že hraje roli v přežití a funkčním zapojení dopaminergních neuronů (Salthun-Lassalle et al., 2005). Bylo zjištěno zvýšení *TACR3*-imunoreaktivních buněk v pyramidové buněčné vrstvě u potkanů s vývojovou hypotyreózou. Zvýšený výskyt buněk exprimujících *TACR3* byl sledován až do dospělosti (Saegusa et al., 2012).

Zvýšená hladina neurokininu B pak byla nalezena u těhotenství s preeklampií a intrauteriní růstovou retardací (IUGR). Zároveň v těchto rizikových těhotenstvích korelovala zvýšená hladina neurokininu B se zvýšenou hladinou oxidu dusnatého, což může být kompenzační mechanismus pro zlepšení průtoku krve do uteroplacentární jednotky (D'Anna et al., 2004). Tyto výzkumy jasně ukazují na zpětnovazebný charakter biologické odpovědi plodu na prenatální stres. Tuto teorii podporují i klinické studie, které prokázaly, 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). 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 (Vrajová et al., 2014). Proto předpokládáme, že námi naměřená zvýšená exprese genu *TACR3* souvisí s biologickou odpovědí plodu na IUGR způsobenou mateřským užíváním MA. Zvýšená exprese *TACR3* ve striatu byla naměřena také po self-administraci derivátu morfia (oxycodon) myším (Zhang et al., 2014).

V uplynulých letech byla vyvinuta řada antagonistů *NK1* receptoru s malými molekulami pro penetraci do mozku. Podle Zhang et al. (2014) existuje několik preklinických a klinických studií, naznačujících, že antagonistů *NK1* receptoru může být

potenciálně použito při léčbě poruch spojených s užíváním návykových látek, především pak psychostimulantů. Problémem zůstává známý mezidruhový rozdíl ve vazbě ligandu na NK1 receptor, který představuje významnou překážku pro použití standardních modelů hlodavců pro budoucí screening potenciálně účinných antagonistů NK1 receptoru (Olive, 2015; Zhang et al., 2014).

7.3 Gen *FOXP2*

Gen kódující správný vývoj řeči a jazyka, *FOXP2*, v našich testech měl hraničně sníženou expresi v prefrontálním kortexu. 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.

Klinické studie dětí prenatálně vystavených MA dokládají vliv na strukturu mozku. Prenatální expozice droze vede ke zmenšení objemu striata (putamen, globulus pallidus, nucleus caudatus) a hipokampu (Chang et al., 2004). Tyto děti však nemají snížené IQ a neprojevují se u nich jazykové problémy (Smith et al., 2008). Signifikantně slabší jsou však v kognitivních testech (Billing et al., 1994). Dá se předpokládat, že zmenšení objemu striata a hipokampu povede ke snížení exprese genu *FOXP2* v dalších částech mozku. Námi naměřená snížená exprese tohoto genu v prefrontálním kortexu tento předpoklad podporuje. Nicméně, kvůli malému vzorku testovaných subjektů nebylo možné tento trend s jistotou prokázat.

Co se dalších studií týče (zabývajících se prenatálním ovlivněním vývoje řeči užíváním návykových látek), existuje studie hodnotící vliv prenatální expozice kokainu. Tato předběžná studie porovnává vývoj řeči pěti dětí prenatálně vystavených kokainu s kontrolní skupinou. Analyzována byla foneticko-fonologická rovina, lexikálně-sémantická rovina, morfologicko-syntaktická rovina a pragmatická rovina jazyka. Hodnocení vývoje a míry poškození řeči bylo založeno na analýze 30 minutového testu. Výsledky naznačují rozdíly mezi skupinami, stejně jako rozdíly uvnitř skupiny vystavené kokainu. Hlavní rozdíl byl pozorován v pragmatické rovině jazyka, i když byly zjištěny výrazné rozdíly i v rovině syntaktické (Mentis et al., 1995).

Studie provedená Derauf et al. (2011) zase poukazuje na silný vliv sociálního zázemí při vývoji řeči. Děti, prenatálně vystavené MA, vyrůstající v nepříznivém sociálním prostředí, trpěly problémovým chováním a měly také zhoršený vývoj řeči. Naopak příznivé sociální prostředí podle Derauf et al. (2011) působí jako ochranný faktor na společensko-emoční vývoj takového dítěte a může být spojen s odolností vůči pozdějším nepříznivým vlivům okolí. Je nutné provést další studie pro potvrzení, či vyvrácení předpokladu, že prenatální vystavení MA ovlivňuje nejen strukturu jednotlivých částí mozku zodpovědných za tvorbu jazyka, ale také přímo jednotlivé geny podílející se na jeho vývoji.

V rámci testování metodou real-time PCR byla změněná exprese nalezena u tří výše zmiňovaných genů. Nezměněnou expresi jsme našli mimo jiné pro geny *GRIN1,2,2a* (Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 1, 2, 2a), kódující receptor glutamátu. Tento výsledek podporuje nález skupiny kolem Fujáková-Lipsky et al. (2017), která zaznamenala signifikantně snížené hladiny glutamátu v dospělém mozku potkana prenatálně vystaveného MA.

7.4 Nepřímé vlivy související s genovou expresí

Nalezení změny genové exprese u tří ze třinácti testovaných genů a hraniční výsledky screeningových testů naznačují, že prenatální ovlivnění není až tak silné, jak by se na první pohled mohlo zdát. Je hned několik vysvětlení, proč tomu tak je:

V testu byli použiti dospělí samci potkana. Dlouhodobé účinky na organismus se zdají být vždy slabší oproti měřením hned po narození. Samci ve všech předchozích studiích byli méně náchylní k prenatálním vlivům drogy (Hřebíčková et al., 2017; Ševčíková et al., 2017; Fujáková-Lipsky et al., 2017; Šlamberová et al., 2011 a 2006).

Kromě přímého účinku drogy na dítě je nutné vzít v potaz i účinky nepřímé. Předpokládáme, že MA silně násobí účinky stresu. Ženy závislé na MA jsou v 85 % případů nezaměstnané (Vavříková et al., 2001b). Tato socioekonomická situace není vhodná pro těhotnou ženu, natož pak pro vývoj dítěte. Životní styl těchto žen je vysoce rizikový. Kromě MA, ženy v těhotenství často užívají alkohol, díky anorektickému efektu MA nepřijímají dostatek živin a nemají pravidelný denní rytmus. Postnatální péče o dítě není dostatečná, ženy se mu nevěnují a často chybí potřebné zázemí. Sociální prostředí, ve kterém děti vyrůstají, je nevhodné. Děti pocházející z takovýchto rodin mají často posunutý žebříček hodnot a dostávají se velmi brzy do vlivu skupin starších dětí, které již drogu zkusily nebo jí i aktivně užívají.

Přímé působení drogy je proto jen těžko rozlišitelné od ostatních vnějších vlivů a má negativní dopad na vývoj dítěte (Běláčková et al., 2012; Matějovská et al., 2014; Šlamberová, 2006; Šlamberová et al., 2005b; Vavříková et al., 2001a; Kinsley et al., 1994). Všechny tyto aspekty se následně odrážejí v přenosu závislosti na MA na další generace. Nezaznamenání většího ovlivnění genové exprese se dá připisovat právě nepřítomnosti stresu. Březí samice potkana byly chovány v podmínkách s dostatkem vody a krmení, s pravidelným denním rytmem a byly experimentálně naivní a jejich potomci mužského pohlaví na tom byly stejně. Je proto důležité na dané problematice dále pracovat a objasnit roli MA ve spojitosti se stresem a učením. Pro pochopení a určení závažnosti těchto následků multi- a trans-generačního přenosu závislosti na MA je nezbytné v co nejbližší době zahájit kognitivně neurologický výzkum.

V neposlední řadě svůj podíl také sehrává dávka podávané drogy. Z předchozích pokusů (Acuff-Smith et al., 1996) je známo, že dávka 5-10 mg/kg vyvolává v mozku plodu koncentrace stejné, jako v mozku dětí závislých žen. Dávku 5 mg/kg/den použil tým Šlamberové ve všech svých dosavadních pokusech (Šlamberová et al., 2014a,

2010, 2006 a 2005a). Tato dávka nezkracuje dobu gestace a nevyvolává potraty ani malformace plodu. V tomto ohledu je poněkud problematické srovnání s klinickými poznatky. Z výzkumů vyplývá, že v době otěhotnění jsou ženy v průměru 3 roky závislé na drogách. Potkanům je však droga podávána až od 1. dne březosti. Dále je známo, že ženy v průběhu těhotenství dávku drogy zvyšují, na počátku tedy berou podstatně nižší dávky než na konci. Březím potkanům byla však podávána konstantní dávka 5 mg/kg/den po celou dobu březosti. Jde tedy o relativní průměr dávek závislé těhotné ženy. V námi prováděném typu pokusu testování F1 generace po prenatálním ovlivnění drogou se běžně používají dávky 10 -15 mg/kg (Smith et al., 2009; Dostálek et al., 2005), ale třeba i dávky 40 mg/kg (Dostálek et al., 2005). Dále pak, při srovnání dávky pevně stanovené, podávané vědcem, se self-administrací, je vidět nárůst v množství přijímané drogy v čase. Při self-administraci se jedna dávka pohybuje kolem 0,05 mg/kg. V průběhu času si ale potkan aplikuje až 8-9 mg/kg za 6 hodin (tzv. progressive ratio schedule). Potkan si dávku aplikuje několikrát za den a to často až do výše 25-48 mg/kg/den se značným intersexuálním rozdílem (Kitamura et al., 2005; Harrod et al. 2001).

8 Závěr

Tato práce si kladla za cíl vyhledat geny se změněnou expresí ve vybraných částech mozku dospělého potkana prenatalně vystaveného MA. Bylo zkoumáno, zda prenatalní expozice MA ovlivňuje generaci potomků exponovaných samic na úrovni exprese genů ve striatu, hipokampu a prefrontálním kortexu. Provedený obecný screening exprese genů pomocí metody microarray hybridizace neodhalil statisticky signifikantní změny v expresi. Nicméně geny s hraniční změnou exprese jsme dále testovali metodou real-time PCR. Těchto 13 genů se testovalo ve vybraných oblastech mozku dospělých potkanů F1 generace prenatalně ovlivněných MA. Naměřili jsme statisticky signifikantní zvýšení exprese genu *DRD3* a *TACR3* ve striatu. Ke snížení genové exprese podle naměřených dat došlo u genu *FOXP2* v prefrontálním kortexu. Tato data prokazují dlouhodobý vliv MA na genovou expresi v mozku potkana a zároveň podporují nálezy příbuzných i klinických studií.

Naměření zvýšené exprese genu *DRD3* ve striatu odpovídá dosavadním zjištěním a je v souladu s předpokladem, že MA má dlouhodobý a silný vliv na dopaminergní systém potomků prenatalně vystavených MA. Naměření zvýšené exprese genu *TACR3* ve striatu se dá přičítat biologické odpovědi plodu na intrauterinní růstovou retardaci. Tyto stresové podmínky v prenatalním období jsou podle všeho dostatečně silné, aby tato změna genové exprese přetrvala až do dospělosti. Snížení exprese genu *FOXP2* v prefrontálním kortexu lze přičítat zpětnovazebné reakci. Zmenšení objemu striata a hipokampu (Chang et al., 2004) vede ke snížení exprese genu *FOXP2* v dalších částech mozku. Nicméně, kvůli malému vzorku testovaných subjektů nebylo možné tento trend s jistotou prokázat.

V této souvislosti je důležité uvažovat o tom, že drtivá většina výzkumných prací o účincích MA se provádí buď na zvířatech, nebo vyhodnocením účinků zneužívání MA u závislých lidí. Studie zvířecích modelů umožňují podávání farmakologicky řízené dávky a několik histologických postupů, které se z evidentních etických důvodů nedají provádět na lidech. Přesto většina studií na zvířatech neumožňuje přímé závěry o procesech probíhajících u lidí z důvodu rozdílů ve farmakokinetice, fungování buněk, dávkách a chování. Studie na lidech naopak tyto závěry umožňují, ovšem u lidských vzorků je sotva možné kontrolovat nespočet faktorů a výsledky jsou poměrně často zkresleny komorbiditami nebo zneužíváním polysubstance. Vzhledem k tomu, že obě linie výzkumu mají své výhody i nevýhody, bylo by užitečné spojit výzkum na zvířatech a na

člověku tím, že by se sblížovaly přístupy. To by umožnilo prozkoumat stejné (nebo přinejmenším odpovídající) neurobiochemické, neurofyziologické, elektrofyziologické, behaviorální nebo kognitivní procesy u lidí a u zvířat tak, aby překonaly některá z omezení obou skupin a poskytly více kauzální, mechanistický pohled na účinky toxicity MA a jeho důsledky. Vše vyžaduje úzkou koordinaci, která může poskytnout nové užitečné poznatky a napomoci další integraci zjištění provedených v obou oblastech (van Thriel et al., 2012 a 2017). V rámci tohoto úsilí musí být věnována zvláštní pozornost zkoumání neurobiologických a neurofyziologických mechanismů, které jsou základem případných dysfunkcí v kognitivních procesech týkajících se výše zmíněných oblastí školní připravenosti dítěte, jeho úspěšnosti ve školním i pracovním životě a jeho fyzického i psychického zdraví (Diamond, 2013).

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; 27:662-673.
- 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, 2011. ISBN 978-80-7262-707-3.
- Amen DG, Stubblefield M, Carmicheal B, Thisted R. Brain SPECT findings and aggressiveness. *Annals of Clinical Psychiatry*. 1996; 8:129-137.
- Anckarsater H. Central nervous changes in social dysfunction: autism, aggression, and psychopathy. *Brain Research Bulletin*. 2006; 69:259-265.
- 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. 2016.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Barnard M. *Drogová závislost a rodina*. Praha: Triton, 2011. ISBN 978-80-7387-386-8.
- Barrett KE, Barman SM. *Ganong's Review of Medical Physiology, 23rd Edition*. 23. vydání. McGraw-Hill Medical, 2009. 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: 452-454.

- 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; 186:487–495.
- 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; 14:83.
- Bečková I, Višňovský P. *Farmakologie drogových závislostí. Ilustroval Martin BOHÁČ. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-864-6.*
- Behnke M, Eyer FD. *The Consequences of Prenatal Substance Use for the Developing Fetus, Newborn, and Young Child. International Journal of the Addictions.* 1993; 28: 1341-1391.
- 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, 131:1009-1024.
- Bechara A. *The role of emotion in decision making: evidence from neurological patients with orbitofrontal damage. Brain and Cognition.* 2004; 55:30–40.
- 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; 18:3-9.
- 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; 62:799–805.
- Bisagno V, Gonzáles B, Urbano FJ. *Cognitive enhancer versus addictive psychostimulants: the good and bad side of dopamine on prefrontal cortical circuits. Pharmacol. Res.* 2016; 109:108-118.
- Blair RJ. *Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy. Journal of Neurology, Neurosurgery, & Psychiatry.* 2001; 71:727–731.
- Boileau I, Payer D, Houle S, Behzadi A, Rusjan PM, Tong J, Furukawa Y. *Higher binding of the dopamine D3 receptor-preferring ligand [11C]-(+)-propyl-hexahydro-naphtho-oxazin in methamphetamine polydrug users: a positron emission tomography study. Journal of Neuroscience.* 2012; 32:1353-1359.
- Boileau I, Payer D, Houle S, Behzadi A, Rusjan PM, Tong J, Furukawa Y. *Higher binding of the dopamine D3 receptor-preferring ligand [11C]-(+)-propyl-hexahydro-naphtho-oxazin in methamphetamine polydrug users: a positron emission tomography study. Journal of Neuroscience.* 2012; 32:1353-1359.
- 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; 71:720–726.

- 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.
- Cadet JL, Bisagno V. *Neuropsychological consequences of chronic drug use: relevance to treatment approaches. Front Psychiatry.* 2015; 6:189.
- Caine SB, Koob GF. *Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. Science.* 1993; 260:1814-1816.
- Campbell TG. *The best of a bad bunch: the ventromedial prefrontal cortex and dorsal anterior cingulate cortex in decision-making. Journal of Neuroscience.* 2007; 27:447–448.
- 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.
- Carvalho M, Carmo H, Costa VM. *Toxicity of amphetamines: an update. Arch Toxicol.* 2012; 86:1167-1231.
- 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; 85:204-208.
- 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; 24:489-496.
- 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; 46:180-187.
- Čihák R a Grim M. *Anatomie. 2. upr. a dopl vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. sv. 3. ISBN 80-247-1132-2.*
- Čihák R. *Anatomie 3. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. 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; 111:1046-1050.
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL. *Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation - a possible prelude to violence. Science.* 2000; 289:591–594.
- Deacon RM, Bannerman DM, Rawlins JN. *Anxiolytic effects of cytotoxic hippocampal lesions in rats. Behav. Neurosci.* 2002; 116:494–497.
- Derauf C, LaGasse L, Smith L, Newman E, Shah R, Arria A, Dansereau L. *Infant temperament and high risk environment relate to behavior problems and language in toddlers. Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP.* 2011; 32:125.

- 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.
- Diamond A. Executive functions. *Annu Rev. Psychol.* 2013; 64:135-168.
- 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; 9:40-44.
- Dostalek M, Pistovčáková J, Minaříková V, Juřica J, Tomandl J, Hadašová E. Effect of acute and repeated administration of methamphetamine on the activity of CYP2D in isolated perfused rat liver. *Acta Veterinaria Brno.* 2005; 74:339-345.
- 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; 20:188-203.
- Druga R, Grim M. *Anatomie centrálního nervového systému. 1. vydání.* Praha: Galén; Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1895-1.
- 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; 81:318-322.
- 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.
- Forman LS, Liebschutz JM, Rose-Jacobs R, Richardson MA, Cabral HJ, Heeren TC, Frank DA. Urban Young Adults' Adaptive Functioning: Is There an Association With History of Prenatal Exposure to Cocaine and Other Substances?. *Journal of Drug Issues.* 2017; 47:261-276.
- 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 [11C] McN 5652. *American Journal of Psychiatry.* 2005; 162:915–923.
- Fujáková-Lipski M, Kaping D, Sirová J, Šlamberová R. Transgenerational neurobiochemical modulation of methamphetamine in the adult brain of the Wistar rat. *Arch Toxicol.* 2017; 1-12.
- 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. ISBN 978-1-58562-472-0.
- Ganong WF. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Praha: Galén, 2005. 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; 172:284-293.
- 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; 74:471-584.
- Govorko D, Bekdash RA, Zhang C, Sarkar DK. *Male germline transmits fetal alcohol adverse effect on hypothalamic proopiomelanocortin gene across generations*. *Biological psychiatry*. 2012; 72:378-388.
- Grim M a Druga R. *Základy anatomie: 5. Anatomie krajin těla*. 1. vydání. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-179-8.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 11. vydání. Elsevier, 2006. ISBN 978-0-7216-0240-0.
- Harrod SB, Dwoskin LP, Crooks PA, Klebaur JE, Bardo MT. *Lobeline attenuates d-methamphetamine self-administration in rats*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001; 298:172-179.
- Hebb DO. *Textbook of Psychology 3rd edn*, W. B. Saunders Company, 1972.
- Heidbreder CA, Gardner EL, Xi ZX, Thanos PK, Mugnaini M, Hagan JJ, Ashby CR. *The role of central dopamine D 3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence*. *Brain Research Reviews*. 2005; 49:77-105.
- 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.
- Hollerman JR, Schultz W. *Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning*. *Nature Neurosci*. 1998; 1:304-309.
- 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; 31:183-193.
- 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.
- Hrubá L, Schutová B, Šlamberová R. *Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following prenatal and postnatal methamphetamine exposure in adult rats*. *Physiol. Behav*. 2012; 105:364-370
- Hřebíčková I, Malinová-Ševčíková M, Macúchová E, Nohejlová K, Šlamberová R. *Exposure to methamphetamine during first and second half of prenatal period and its consequences on cognition after long-term application in adulthood*. *Physiol. Res*. 2014; 63:535-545

- Hřebíčková I, Ševčíková M, Macúchová E, Šlamberová R. How methamphetamine exposure during different neurodevelopmental stages affects social behavior of adult rats? *Physiology & Behavior*. 2017; 179:391-400.
- Hřebíčková I, Ševčíková M, Macúchová E, Šlamberová R. Does effect from developmental methamphetamine exposure on spatial learning and memory depend on stage of neuroontogeny? *Physiol. Res*. 2016; 65:577-589.
- Chakraborty A, Anstice NS, Jacobs RJ, LaGasse LL, Lester BM, Wouldes TA, Thompson B. Prenatal exposure to recreational drugs affects global motion perception in preschool children. *Scientific reports*. 2015; 5:16921.
- 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; 102:16–32.
- Chang L, Alicata D, Ernst T, Volkow N. Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addict Abingdon Engl*. 2007; 102:16-32.
- 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; 132:95-106.
- Cheung TH, Cardinal RN. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC neuroscience*. 2005; 6:36.
- Irner, TB. Substance exposure in utero and developmental consequences in adolescence: a systematic review. *Child Neuropsychology*. 2012; 18:521-549.
- 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; 108:131–141.
- 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;13:1-12.
- 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; 52:11-19.
- 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; 171:209-217.
- 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.
- Kinsley CH, Turco D, Bauer A, Beverly M, Wellman J, Graham AL. Cocaine alters the onset and maintenance of maternal behavior in lactating rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1994; 47:857-864.
- Kitamura O, Wee S, Specio SE, Koob GF, Pulvirenti L. Escalation of methamphetamine self-administration in rats: a dose–effect function. *Psychopharmacology.* 2006; 186:48-53.
- Koob GF. Neurobiology of addiction. Toward to development of new therapies. *Ann NY Acad. Sci.* 2000; 909:170-185.
- 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; 106:17951-17956.
- Kuczkowski KM. The effects of drug abuse on pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.* 2007; 19:578-585.
- 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; 126:2455-2462.
- Lampert SM, Kaye AD, Urman RD, Manchikanti L. Drug Testing and Adherence Monitoring in Substance Abuse Patients. In: Kaye A., Vadivelu N., Urman R. (eds) *Substance Abuse.* Springer, New York, NY. 2015; ISBN 978-1-4939-1951-2
- Leech SL, Richardson GA, Goldschmidt L, Day NL. Prenatal substance exposure: effects on attention and impulsivity of 6 – year – olds. *Neurotoxicology and teratology.* 1999; 21:109-118.
- Leggio GM, Bucolo C, Palatinia CBM, Salomone S, Drago F. Current drug treatments targeting dopamine D3 receptor. *Pharmacology & Therapeutics.* 2016; 165:164-177.
- Leggio GM, Camillieri G, Platania CBM, Castorina A, Marrasso G, Torrisi SA, Drago F, Salomone S. Dopamine D3 receptor is necessary for ethanol consumption: an approach with buspirone. *Neuropharmacology.* 2014; 39:2017-2028.
- 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; 40:3684-3692.
- Lindsay MK, Burnett E. The use of narcotics and street drugs during pregnancy. *Clinical obstetrics and gynecology.* 2013; 56:133-141.
- Little BB, Snell LM, Gilstrap LC. Methamphetamine abuse during pregnancy: outcome and fetal effects. *Obstetrics & Gynecology.* 1988; 72:541-544.

- 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; 1043:214-217.
- 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.
- 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; 10:2587-2600.
- 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.
- Martin JC, Ellinwood EH. Conditioned aversion in spatial paradigms following methamphetamine injection. *Psychopharmacology*. 1974; 36:323-335.
- 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.
- Matoušek O. a kol. *Sociální práce v praxi*. Praha: Portál, 2005, ISBN 80-7367-002-X.
- 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; 29:997-1014.
- Mena JC, Cuellar H, Vargas D, Riascos R. PET and SPECT in drug and substance abuse. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2005; 16:253-256.
- Mentis M, Lundgren K. Effects of Prenatal Exposure to Cocaine and Associated Risk Factors on Language Development. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research*. 1995; 38:1303-1318.
- Moore KL, Persaud TVN. *Zrození člověka: Embryologie s klinickým zaměřením*. 6. vydání. 2011. 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; 297:211-218.
- 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; 21:1358-1368.
- 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; 157:337-339.

- 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; 1:461-5.
- 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
- Okada N, Takahashi K, Nishimura Y, Koike S, Ishii-Takahashi A, Sakakibara E, Nakakita M. *Characterizing prefrontal cortical activity during inhibition task in methamphetamine-associated psychosis versus schizophrenia: a multi-channel near-infrared spectroscopy study. Addiction biology.* 2016; 21:489-503.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain research.* 1971; 34:171-175.
- O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford Univ. Press.* 1978. ISBN 0-19-857206-9
- Olive FM. *Neurokinin-1 (NK1) receptor antagonists as possible therapeutics for psychostimulant use disorders. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 2015; 14:700-707
- 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 vrozených 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:e45-e46.
- 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; 11:404-414.
- 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; 57:119–127.
- Raine A, Yang Y. *Neural foundations to moral reasoning and antisocial behavior. Soc Cognitive and Affective Neuroscience.* 2006; 1:203–213.

- 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.
- 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; 108:511–533.
- Riedl O. Vondráček V. *Praktická toxikologie*. Avicenum, Praha 1971
- Richards JB, Sabol KE, de Wit H. *Effects of methamphetamine on adjusting amount procedure, a model of impulsive behavior in rats*. *Psychopharmacology*. 1999; 146:432-439.
- Rocher C, Gardier AM. *Effects of repeated systemic administration of d-Fenfluramine on serotonin and glutamate release in rat ventral hippocampus: comparison with methamphetamine using in vivo microdialysis*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001; 363:422-428.
- 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; 29:1141-1152.
- Sadler TW. *Langmanova lékařská embryologie: Překlad 10. vydání. 1. vydání*. Praha: Grada Publishing, a. s, 2011. ISBN 978-80-247-2640-3.
- Saegusa Y, Fujimoto H, Woo GH, Ohishi T, Wang L, Mitsumori K, Shibutani M. *Transient aberration of neuronal development in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to brominated flame retardants in rats*. *Archives of toxicology*. 2012; 86:1431-1442.
- Salo R, Ravizza S, Fassbender C. *Overlapping cognitive patterns in schizophrenia and methamphetamine dependence*. *Cognitive and Behavioral Neurology*. 2011; 24:187.
- Salthun-Lassalle B, Traver S, Hirsch EC, Michel PP. *Substance P, neurokinins A and B, and synthetic tachykinin peptides protect mesencephalic dopaminergic neurons in culture via an activity-dependent mechanism*. *Molecular pharmacology*. 2005; 68:1214-1224.
- 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; 301:805-809.
- 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; 18:1613-1621.
- Segal B, Morral, AR, Stevens SJ. Adolescent substance abuse treatment in the United States: Exemplary models from a national evaluation study. Routledge. 2014.
- Segal DS, Kuczenski R. Behavioral pharmacology of amphetamine. *Amphetamine and its Analogs*. 1994; 115-150.
- Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, Koller D, Friedman N. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nature genetics*. 2003; 34:166-176.
- Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine*. 2013; 4:624.
- Shiba T, Yamato M, Kudo W, Watanabe T, Utsumi H, Yamada KI. In vivo imaging of mitochondrial function in methamphetamine-treated rats. *Neuroimage*. 2011; 57:866-872.
- 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.
- Schutová B, Hrubá L, Pometlová M, Deykun K, Šlamberová R. Impact of methamphetamine administered prenatally and in adulthood on cognitive functions of male rats tested in Morris water maze. *Prague Med Rep*. 2008; 109:62-70.
- 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. *Developmental psychobiology*. 2013; 55:232-242.
- Sibley DR, Monsma FJ. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in pharmacological sciences*. 1992; 13:61-69.
- 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, 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.
- 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.
- Smith AM, Chen A. Neonatal amphetamine exposure and hippocampus-mediated behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2009; 91:207–217.

- 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; 30:20-28.
- 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 118:1149-1156.
- 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; 108:142–146
- 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; 24:17-23.
- Sobell LC, Sobell MB, Ward E. *Evaluating alcohol and drug abuse treatment effectiveness: recent advances*. New York: Pergamon Press. 1980. ISBN 0-08-022997-2.
- 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; 81:24-28.
- Squire, LR. *Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans*. *Psychological review*, 1992; 99:195.
- Steiner E, Villen T, Hallberg M, Rane A. Amphetamine secretion in breast milk. *European journal of clinical pharmacology*. 1984; 27:123-124.
- Stock AK, Beste C. On the necessity of translational cognitive-neurotoxicological research in methamphetamine abuse and addiction. *Archives of Toxicology*. 2017; 91:1-3.
- 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; 58:133-139.
- 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; 366:162-166.
- Stuchlik A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014; 8:106.
- 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; 124:1-5.

- Ševčík M. *Praktická toxikologie: otravy chemickými přípravky s obchodními názvy. 3. dopln. a přeprac. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968.*
- Ševčíková M, Hřebíčková I, Macúchová E, Šlamberová R. *The influence of methamphetamine on maternal behavior and development of the pups during the neonatal period. International Journal of Developmental Neuroscience. 2017; 59:37-46.*
- Šlamberová R, Charousová P, Pometlová M. *Methamphetamine administration during gestation impairs maternal behavior. Wiley Periodicals, Inc. Dev. Psychobiology. 2005a; 46:57-65.*
- Šlamberová R, Charousová P, Pometlová M. *Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. Reprod. Toxicol. 2005b; 20:103-110.*
- Šlamberová R, Pometlová M, Charousová P. *Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. Elsevier - Progress in Neuro-Psychopharmacology A Biological Psychiatry. 2006; 30:82-88.*
- Šlamberová R, Mikulecká A, Pometlová M, Schutová B, Hrubá L, Deykun K. *The effect of methamphetamine on social interaction of adult male rats. Behav. Brain Res. 2010; 214:423-427.*
- Šlamberová R, Mikulecká A, Pometlová M, Schutová B, Hrubá L, Deykun K. *Sex differences in social interaction of methamphetamine-treated rats. Behav. Pharmacol. 2011; 22:617-623.*
- 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. 2014a; 115:43-59.*
- Šlamberová R, Vrajková M, Schutová B, Mertlová M, Macúchová E, Nohejlová K, Yamamotová A. *Prenatal methamphetamine exposure induces long-lasting alterations in memory and development of NMDA receptors in the hippocampus. Physiological research. 2014b; 63:547.*
- Šlamberová R, Mikulecká A, Macúchová E, Hřebíčková I, Ševčíková M, Nohejlová K, Pometlová M. *Effects of psychostimulants on social interaction in adult male rats. Behav. Pharmacol. 2015; 26:776-785.*
- Štefunková M. *Metamfetamin (pervitin): situace v EU a její globální kontext. Praha: Centrum adiktologie, Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN v Praze, 2010. ISBN 978-80-86620-24-4.*
- 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: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; 10:420-435.*

- 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; 41:354-358.
- van Thriel C, Quetscher C, Pesch B, Lotz A, Lehnert M, Casjens S, Beste, C. Are multitasking abilities impaired in welders exposed to manganese? Translating cognitive neuroscience to neurotoxicology. *Archives of Toxicology*. 2017; 91:2865–2877.
- van Thriel C, Westerink RHS, Beste C, Bale AS, Lein PJ, Leist M. Translating neurobehavioural endpoints of developmental neurotoxicity tests into in vitro assays and readouts. *Neurotoxicology*. 2012; 33:911-924.
- 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;33:625-629.
- 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; 444:161-165.
- 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; 12:131-139.
- 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;64:1575-1579.
- 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, Řípová 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; 39:2040-2046.
- Waberžinek G, Krajičková 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. Erlbaum. 1981. 5–47. ISBN 0-89859-157-0.

- 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.
- Weissman AD, Caldecott-Hazard S. Developmental neurotoxicity to methamphetamines. *Clinical and Experimental pharmacology and physiology*. 1995; 22:372-374.
- Wells PG, Bhatia S, Drake DM, Miller-Pinsler L. Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine. 2016; 108:108–130.
- Westerga J, Gramsbergen A. The development of locomotion in the rat. *Develop brain research*. 1990; 57:163-174.
- Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*. 2003; 80:1106-1122.
- Williams JH, Ross L. Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents. *European child & adolescent psychiatry*. 2007; 16:243-253.
- 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:e12818.
- Won L, Bubula N, McCoy H, Heller A. Methamphetamine concentrations in fetal and maternal brain following prenatal exposure. *Neurotoxicology and teratology*. 2001; 23:349-354.
- Wouldes T, LaGasse L, Sheridan J, Lester B. Maternal methamphetamine use during pregnancy and child outcome: what do we know. *NZ Med J*. 2004; 117:1-10.
- 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;19:837-848.
- Yamamotová A, Šlamberková R. Behavioral and antinociceptive effects of different psychostimulant drugs in parentally methamphetamine-exposed rats. *Physiol. Res*. 2012; 61:139-147.
- Yang Y, Raine A. Functional neuroanatomy of psychopathy. *Psychiatry*. 2008; 7:133–136.
- Zabaneh R, Smith LM, LaGasse LL, Derauf C, Newman E, Shah R, Della Grotta S. The effects of prenatal methamphetamine exposure on childhood growth patterns from birth to 3 years of age. *American journal of perinatology*. 2012; 29:203-210.
- Zhang Y, Mayer-Blackwell B, Schlussman SD, Randesi M, Butelman ER, Ho A, Kreek MJ. Extended access oxycodone self-administration and neurotransmitter receptor gene expression in the dorsal striatum of adult C57BL/6 J mice. *Psychopharmacology*. 2014; 231:1277-1287.
- Zhu J. Quantitative models for performance evaluation and benchmarking: data envelopment analysis with spreadsheets. 2014; 213.

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

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>

GeneCards: Human gene database [online]. Israel: Yeda research and development company, 2017 [cit. 2017-11-30]. Dostupné z:
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DRD3>

GeneCards: Human gene database [online]. Israel: Yeda research and development company, 2017 [cit. 2017-11-30]. Dostupné z:
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TACR3&keywords=TACR3>

GeneCards: Human gene database [online]. Israel: Yeda research and development company, 2017 [cit. 2017-11-30]. Dostupné z:
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXP2&keywords=FOXP2>

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-drogoва-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/Nelatkově-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*
- 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*
- Robinson SR. The Role of Dopamine and Norepinephrine in Depression [online]. Primary Psychiatry, ©2007. [cit. 2017-08-01]. Dostupné z: <http://www.primarypsychiatry.com/aspx/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>*
- 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/*