

## بررسی پلی مورفیسم ژن D4 گیرنده دوپامین (DRD4) به عنوان فاکتور خطر در کودکان با اختلال نقص توجه بیش فعالی شمالغرب ایران

سید محمود طباطبائی، شاهرخ امیری، ..... فنغوری

### چکیده

**زمینه و هدف:** پلی مورفیسم ژن D4 گیرنده دوپامین (DRD4) در میان انسانها ممکن است تفاوت های فردی در استعداد ابتلا به بیماری های روانپزشکی ایجاد نماید. نشان داده شده است که اختلال عملکرد دوپامین با اختلال نقص توجه بیش فعالی (ADHD) ارتباط دارد. در این مطالعه سعی بر آن بود تا ارتباط بین فنوتیپ ADHD به عنوان اختلالی که با بی توجهی، بیش فعالی و تکانشگری همراه است، با تعداد تکرارهای ۴۸ جفت بازی اگزون ۳ ژن DRD4 مورد بررسی قرار گیرد.

**مواد و روشها:** تعداد ۱۳۰ کودک مبتلا به اختلال ADHD در محدوده سنی ۴ تا ۱۴ سال، به عنوان گروه تست و ۱۳۰ کودک سالم هم‌تاسازی شده از نظر بالینی و میانگین سنی مشابه به عنوان گروه کنترل از منطقه شمالغرب ایران در نظر گرفته شد. پلی مورفیسم ژن DRD4 با استفاده از تکنیک VNTR - PCR و با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه اگزون ۳ آن مورد بررسی و روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید.

**یافته ها:** با استفاده از قانون هاردی وینبرگ و آزمون مجذور کای مشاهده شد که تعداد تکرارهای 4R در گروه مبتلا ۷۶/۲٪ و گروه کنترل ۵۳/۸٪ بوده و از نظر آماری معنی دار می باشد ( $P=۰/۰۰۴$  و  $X^2=۱۷/۳۹$  و  $df=۵$ ). بقیه تکرارها از نظر آماری بین دو گروه معنی دار نبود. تعداد تکرارهای 2R در هر دو گروه کمترین درصد را دارا بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج حاصل می توان نتیجه گرفت که بین تکرارهای 4R از ژن DRD4 با اختلال ADHD در منطقه شمالغرب ایران ارتباط معنی داری داشته و می توان به عنوان بیومارکر تشخیصی در پیش آگهی این اختلال مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ژن DRD4، VNTR، PCR، اختلال ADHD

## مقدمه:

اختلال نقص توجه بیش فعالی (ADHD) سندرم روانی شایع دوران کودکی است که با علایم بیش فعالی، تکانشگری و اختلال توجه مستمر همراه است. این اختلال دارای شیوع ۸-۴٪ جهانی در جمعیت کودکان در سن مدرسه است که این علایم در ۸۰-۵۰٪ به دوران نوجوانی و بزرگسالی نیز ادامه می یابد(۱). میزان شیوع این اختلال در شهر تبریز در بین کودکان ۹/۷٪ و در بزرگسالان ۳/۸٪ برآورد شده است(۲ و ۳). اختلال در عملکرد و مهارت های اکتسابی اجتماعی مرتبط با ADHD ممکن است تاثیر قابل توجهی در کار و زندگی و تحصیلات دانشگاهی افراد مبتلا داشته باشد(۴ و ۵). این اختلال یک اختلال رفتاری عصبی ناهمگن با علل احتمالی متعددی از جمله عوامل ژنتیکی و محیطی و در واقع چند عاملی است که منجر به تغییرات مسیر های عصبی می شود(۶).

از سوئی کودکان مبتلا به ADHD ممکن است صفات کودکان مبتلا به اوتیسم را نشان دهند. مشخص شده است که ۵۰-۲۰٪ کودکان مبتلا به ADHD شاخص های اوتیسم را نشان دهند(۷۵). بررسی دوقلوها، فرزند خواندگی و مطالعات پیوستگی ژنتیکی نشان دهنده توارث پذیری بالای این اختلال است. به نحوی که برخی منابع این میزان را ۶۰ تا ۹۰٪ ذکر می کنند(۸).

مطالعات فارماکولوژیک، مدل های حیوانی و تصاویر مغزی همه نشان می دهند که مسیرهای عصبی کاتکول آمین برای درک اساس نوروبیولوژیک این اختلال درگیر هستند. از جمله نوروترانسمیترهای دوپامین و نوراپی نفرین که در عملکردهای عصبی و نیز تمرکز و آگاهی دخیل است(۹).

لازم است مدیریت لازم برای شناسایی نشانگرهای ژنتیکی درگیر در ADHD به منظور بهبود روند تشخیصی لحاظ گردد. مطالعه حذف شدگی ژنی در موشها نشان داده است که تغییرات ژنی و به تبع آن متابولیسمی دوپامین در ADHD دخیل است. چندین ژن در این راستا شناسایی شده اند که عبارتند از: DRD1، DAT1، DRD2، و DRD4(۱۰ و ۱۱).

ژن گیرنده دوپامین D4 یکی از ژنهای شایع مورد مطالعه در ارتباط با ADHD است. این ژن در مناطق متعددی از مغز بیان می شود و عقیده بر این است که در اختلال مغزی ADHD درگیر است(۱۲ و ۱۳). نقشه برداری ژنی، جایگاه لوکوسی این ژن گیرنده را روی کروموزوم 11p15.5 نشان می دهد(۱۴). این ژن دارای چند شکلی های متعددی در توالی نوکلئوتیدی آن است. تعداد متغیر 48 جفت از تکرارهای پشت سر هم (VNTR) در اگزون 3 شناخته شده ترین مورد پلی مورفیسمی مورد مطالعه به منظور بررسی ارتباط آن با ADHD است. مطالعات بیولوژی مولکولی نشان می دهد که این منطقه به پروتئین G چفت شده و تولید cAMP را تنظیم می کند(۱۵).

طول اگزون ۳ از تکرارهای VNTR ۲ بار تکرار ( 2R ) تا ۱۱ بار تکرار (11R) ۴۸ جفت بازی متغیر است که عموماً با نمادهای D4.2 تا D4.11 نمایش داده می شود(۱۶). عموماً این آلل های تکراری را به دو دسته تقسیم بندی می کنند: آلل های تکرار کوتاه( ۲ تا ۴ تکرار) و آلل های بلند تکرار( پنج تا هشت)(۱۷). بررسی مطالعات متاآنالیزی نشان می دهد که واریانت های ۷، ۴، ۲ بسیار شایع تر هستند(۱۸).

و اکثر مطالعات بر پلی مورفیسم های موجود در VNTR اگزون ۳ این ژن تمرکز داشته است زیرا مطالعات نشان داده اند یکی از واریانت های آن (7-repeat allele) پاسخ ضعیفی به دوپامین ایجاد می نماید (۱۹).

یکی از مطالعات متاآنالیزی که بر روی پلی مورفیسم های آلل های هفت تکراری اگزون ۳ ژن DRD4 صورت گرفته است رابطه معنی داری را با بیماری ADHD در هر دو مورد مطالعه مورد-شاهدی و مطالعه با پایه فامیلی گزارش کرده است (۲۰). تعدادی از مطالعات رابطه معنی داری را بین پلی مورفیسم های آلل های هفت تکراری اگزون ۳ DRD4 و بیماری ADHD گزارش کرده اند (۲۱-۲۳).

از سوی دیگر تعداد دیگری از مطالعات ارتباط ضعیفی بین DRD4 و ADHD گزارش نموده اند (۲۴-۲۷). اما هنوز به خوبی مشخص نیست که آیا نتایج منفی گزارش شده به دلیل اختلاف در گروه ها و جمعیت های با نژاد مختلف، ژنتیک و هتروژنیسیته یا ضعف در انجام و تفسیر تستهای آماری بوده است یا به واقع نمایانگر اختلافی واقعی بین جوامع مختلف می باشد. با این تفاسیر، هدف پژوهش حاضر بررسی ارتباط پلی مورفیسم های موجود در ژن DRD4 جمعیت شمالغرب ایران با بیماری ADHD بود.

## مواد و روشها:

### نمونه ها:

تعداد ۱۳۰ کودک مبتلا به اختلال ADHD از منطقه شمالغرب ایران، مراجعه کننده به کلینیک تخصصی روانپزشکی که بوسیله پزشک متخصص روانپزشک کودک با پروتکل تشخیصی و آماری بیماریهای روانی<sup>۱</sup> (DSM-5) تشخیص داده شده بودند به عنوان گروه آزمایش معرفی گردیدند. به عنوان گروه کنترل نیز تعداد ۱۳۰ کودک سالم از نظر روانی با میانگین سنی مشابه در نظر گرفته شد. محدوده سنی ۴ تا ۱۴ سال برای این کودکان مد نظر قرار گرفت. از جمله معیارهای خروج از مطالعه، وجود هر نوع بیماری و اختلال روانی دیگر به همراه اختلال ADHD بود. مصاحبه تشخیصی نیمه ساختاری K-SADS نیز به صورت مصاحبه با والدین و کودک توسط روانپزشک تکمیل گردید.

### تزاید ژن با استفاده از تکنیک PCR- VNTR

نمونه های خون محیطی به میزان ۲ میلی لیتر، تهیه شد و DNA ژنومی با استفاده از کیت تجاری (QIA amp DNA kit) طبق دستور العمل آن استخراج گردید. با استفاده از دستگاه نانودراپ و در محدوده ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر میزان خلوص DNA استخراجی تعیین گردید. در جدول ۱ جفت پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ناحیه اگزون ۳ ژن DRD4 ارائه شده است.

1. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorder-5

جدول ۱: جفت پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
Forward	5`-GGTCTGCGGTGGAGTCTG-3`
Reverse	5`-GCGACTACGTGGTCTACT-3`

تکثیر بوسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در محیط ۲۰ میکرو لیتر از محلول حاوی ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده ژنومی، در مستر میکس Ampliqon دانمارک بصورت تجاری و ۱ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرها، طبق برنامه دمائی جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲- برنامه دمائی مورد استفاده برای انجام تکثیر ژن

تعداد سیکل	مرحله	درجه حرارت	مدت زمان
۱ سیکل	First Denaturation	۹۵ درجه سانتیگراد	5 min
۳۵ سیکل	Denaturation	۹۳ درجه سانتیگراد	20 sec
	Annealing	۵۵ درجه سانتیگراد	20 sec
	Extention	۷۲ درجه سانتیگراد	30 sec
۱ سیکل	Final Extension	۷۲ درجه سانتیگراد	7 min

پس از تزاید ژن، محصولات PCR در ژل ۲ درصد آگارز با رنگ آمیزی اتیدیدوم بروماید و در زیر نور UV مشاهده گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری:

نتایج بدست آمده از شمارش محصولات ژنی در هر کدام از نمونه ها در برنامه آماری spss ورژن ۲۱ وارد شد. داده های موجود بر اساس تعداد و فراوانی محاسبه گردید و میانگین های بدست آمده با استفاده از آزمون  $\chi^2$  مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر  $p$  کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج:

از نظر اطلاعات دموگرافیکی تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشت اما درصد افراد مذکر مبتلا به اختلال (۸۳٪) در مقابل ( ۶۱٪) افراد مذکر گروه کنترل بود. تعداد پسران مبتلا در مقابل دختران مبتلا بیشتر بود و این با مطالعات قبلی نیز همراستا بود ( ۲ و ۲۸).

مطالعه روی شجره نامه افراد مبتلا بیانگر وجود ارتباط فAMILIاری درجه اول در بسیاری از نمونه ها بود. که در این میان پسر عمو- دختر عموهای درجه اول بیشترین مورد را به خود اختصاص می داد ( جدول شماره ۱).

جدول ۱- اطلاعات دموگرافیک افراد مبتلا و کنترل

شاخص	افراد مبتلا (۱۳۰ = تعداد)	افراد کنترل (۱۳۰ = تعداد)
سن (سال)	۶/۸۳ ± ۲/۲۷	۶/۹۸ ± ۲/۵۰
جنسیت (پسر / دختر)	۲۲/۱۰۸	۴۶/۸۴
تعداد مبتلایان پسر (درصد)	۸۳	۶۱
دارا بودن نسبت فAMILIاری درجه اول در والدین (درصد)	۵۶	-
میزان نمره K-SADS	???????	-

جدول شماره ۲ میزان فراوانی تکرارهای VNTR مربوط به ژن DRD4 در دو گروه مبتلا و کنترل را نشان می دهد:

جدول شماره ۲- فراوانی تکرارهای VNTR مربوط به ژن DRD4

تعداد تکرارها	گروه مبتلا		گروه کنترل		P value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
2R	۳	۲/۳	۹	۶/۹	
3R	۴	۳/۱	۱۶	۱۲/۳	
4R	۹۹	۷۶/۲	۷۰	۵۳/۸	۰/۰۰۴
5R	۹	۶/۹	۱۲	۹/۲	
6R	۸	۶/۲	۱۱	۸/۵	
7R	۷	۵/۴	۱۲	۹/۲	

با استفاده از قانون هاردی وینبرگ و آزمون مجذور کای مشاهده شد که تعداد تکرارهای 4R در گروه مبتلا ۷۶/۲٪ و گروه کنترل ۵۳/۸ بوده و از نظر آماری معنی دار می باشد ( $P=0/004$  و  $X^2=17/39$  و  $df=5$ ). بقیه تکرارها از نظر آماری بین دو گروه معنی دار نبود. تعداد تکرارهای 2R در هر دو گروه کمترین درصد را دارا بود.

### بحث:

اختلال ADHD به عنوان یکی از اختلالات عصبی رفتاری در کودکان مطرح است (۲۹). از بین ژنهای درگیر در ایجاد این اختلال، ژنهای درگیر در مسیر دوپامینرژیک و خصوصا ژن DRD4 با توجه به نتایج چندین مقاله متاآنالیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳۰-۳۳). از آنجائی که در زمینه ارتباط پلی مورفیسم این ژن و اختلال ADHD مطالعه ای حداقل در منطقه شمالغرب ایران انجام نیافته است بنابراین ضروری به نظر می رسد تا در این مورد تحقیقی صورت گیرد تا تعداد تکرارهای این ژن به عنوان بیومارکری در تشخیص این اختلال در کودکان مورد استناد واقع گردد.

در مطالعه حاضر، ژن DRD4 در تمامی افراد مورد مطالعه (کنترل و مبتلا) در یک بازه ۲ تا ۷ آلل تکراری کنترل وجود دارد؛ آلل غالب تشخیص داده شده در مطالعه ما 4R، 5R و 6R بود که از این بین تکرارهای 4R بیشترین میزان را به خود اختصاص داد که از نظر آماری بین دو گروه معنی دار بود. نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده Bidwell و همکاران (۳۴) و Shahin و همکاران در ۲۰۱۵ همراستاست. Cheuk و همکاران نیز نشان دادند که آلل 4R با ۸۴٪ فراوانی بیشترین میزان آللی را در جمعیت آنها داراست و از نظر ارتباط این ژن با ADHD کاملاً مرتبط است (۳۵ و ۳۶).

هر چند طبق مطالعات مذکور و نیز تحقیق حاضر، تکرارهای 4R یک نشانگر واضح برای ابتلا به ADHD است اما مطالعات در جمعیت های دیگر خصوصاً جمعیت های سفیدپوستان اروپائی و آمریکائی نشان می دهد که در آنها آلل 7R، دارای ارتباط معنی داری با اختلال نسبت به بقیه تکرارهاست (۳۵). در حالی که در مطالعه ما تکرارهای 7R دارای ارتباط معنی داری با اختلال ADHD نبود. به نحوی که ۹/۲ درصد در گروه کنترل و ۵/۴ درصد در گروه مبتلا بود. نتایج تحقیق Calahorro و همکاران در ۲۰۰۹ ارتباط مثبتی بین تکرارهای 7R ژن DRD4 و اوتیسم را نیز گزارش نمود (۳۸).

مطالعه متاآنالیزی دیگری تفاوت به شدت معنی داری بین ارتباط تکرارهای 7R در جمعیت سفید پوستان قفقازی در مقابل جمعیت های خاورمیانه نشان می دهد (۳۹). Leung و همکاران نیز گزارش نمودند که شیوع بسیار کمی از آلل 7R در جمعیت های آسیائی وجود دارد و در مقابل آلل 4R شیوع بیشتری دارد (۴۰). این گزارش با نتایج تحقیق ما مطابقت دارد.

با توجه به مطالعات جمعیت شناسی و قومیتی می توان اینگونه استدلال نمود که تبار زائی گونه ای را می توان با مطالعه پلی مورفیسم ژنهای مورد مطالعه در بیماری های خاصی مورد بررسی قرار داد. همانگونه که مشاهده می شود تکرارهای 4R در جمعیت آسیائی شیوع بیشتری نسبت به سفید پوستان قفقازی آمریکائی و اروپائی دارد. وجود شیوع بالای تکرارهای 4R در تحقیق Shahin و همکاران در مصر و تحقیق ما به عنوان مناطقی از جمعیت های خاور میانه ای مبین همین موضوع است.

هر چند بسیاری از مقالات نیز وجود تکرارهای 7R را در ارتباط با اختلال ADHD نفی می نمایند؛ Carrasco و همکاران در سال ۲۰۰۶ در جمعیتی از شیلی، ارتباط منفی بین تکرارهای 7R و ADHD گزارش نمودند(۴۱). نیز Brookes و همکارانش در ۲۰۰۵ نیز گزارش نمودند که بیومارکرهای DRD4 در تایوان ارتباطی با ADHD ندارد(۴۲).

تفاوت کارکردی در سیستم سیگنالینگ درون سلولی DRD4 برای آلل های تکراری 48 جفت بازی مورد مطالعه قرار گرفته است و نشان داده شده است که آلل 7R ممکن است حساسیت کمتری نسبت به دوپامین درون زا داشته باشد. همچنین آلل 7 تکراری به طور واضحی نسبت به دوپامین پاسخ کندی نشان می دهد(۴۳).

درمان با متیل فنیدیت، اثرات بهبود دهنده ای با افزایش سطوح دوپامینی سیناپسی داشته و سعی می کند پاسخ کند گیرنده را جبران نماید. مطالعات دیگر نشان می دهد که همه آلل های تکراری 2، 4 و 7 عملکردهای اتصالی مشابهی نشان می دهند. با این حال، چند گزارش دیگر، بیان می کنند که هیچ تاثیر قابل توجهی از واریانت های VNTR روی عملکرد گیرنده DRD4 وجود ندارد. Jovanovic و همکاران پیشنهاد می کنند که هیچ اختلاف عمده ای در ارائه داروها یا کارکردهای سلولی - فارماکولوژیکی بین انواع تکرارهای بلند و کوتاه وجود ندارد(۴۴ و ۴۵).

### نتیجه گیری:

برخلاف نتایج حاصل از مطالعات مربوط به جمعیت سفید پوستان اروپائی و آمریکائی که در آنها تکرارها از نوع 7R به عنوان نشانگر ژنتیکی در ارتباط با ADHD است، مطالعه ما نشان می دهد که تکرارهای 4R به عنوان واریانت های این اختلال در منطقه شمالغرب ایران است. به عبارتی حضور تکرارهای 4R به صورت تک آللی (هتروزیگوت) و یا دو آللی (هموزیگوت) هر دو می تواند پیش آگهی خوبی برای ADHD در منطقه مورد مطالعه ما باشد.

### سپاسگزاری:

نویسندگان مقاله از تمامی افرادی که در انجام این تحقیق همکاری شایسته ای داشته اند تقدیر و تشکر می نمایند.

### References:

1. Stefanatos G.A., Baron I.S., Attention-deficit/hyperactivity disorder: a neuropsychological perspective towards DSM-V, *Neuropsychol. Rev.* 17 (1) (2007) 5–38.
2. Amiri S, Fakhari A, Maheri M, Mohammadpoor Asl A. Attention deficit/hyperactivity disorder in primary school children of Tabriz, North-West Iran. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2010 Nov;24(6):597-601. doi: 10.1111/j.1365-3016.2010.01145.

3. Amiri S, Ghoreishizadeh MA, Sadeghi-Bazargani H, Jonggoo M, Golmirzaei J, Abdi S, Safikhanlo S, Asadollahi A. Prevalence of Adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder (Adult ADHD): Tabriz. Iran J Psychiatry. 2014 Apr;9(2):83-8.
4. Biederman J., Arnsten A.F., Faraone S.V., Doyle A.E., Spencer T.J., Wilens T.E., Weiss M.D., Safren S.A., Culpepper L., New developments in the treatment of ADHD, J. Clin. Psychiatry 67 (1) (2006) 148–159.
5. Acosta M. T., Aspectos genéticos y moleculares en el trastorno por Déficit de Atención/Hiperactividad: Búsqueda de los genes implicados en el diagnóstico clínico, Rev. Neurol. 44(Suppl. 2) (2007) S37–S41.
6. Gordon JM. Attention Deficit Hyperactivity Disorder Handbook. Second ed. Springer; 2010. New York.
7. Rommelse NJ, Franke B, Geurts HM, Hartman CA, Buitelaar JK. Shared heritability of attention- deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2010;19:281–95.
8. Waldman I, Rhee S (2002) Behavioral and molecular genetic studies. In: Sandberg S (ed) Hyperactivity and Attention Disorders of childhood, 2nd edn. Wiley, New York, 290–335.
9. Reiersen A, Todorov A. Association between DRD4 genotype and autistic symptoms in DSM-IV ADHD. J Can Acad Child Adolesc Psychiatry. 2011;20:15–21.
10. 8. Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. J Neurosci. 1999;19(21):9550–6.
11. Wallis D, Russell HF, Muenke M. Review: genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. J Pediatr Psychol. 2008;33(10):1085–99.
12. 10. Floresco SB, Tse MT. Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. J Neurosci. 2007;27(8):2045–57.
13. Noaín D, Avale ME, Wedemeyer C, Calvo D, Peper M, Rubinstein M. Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. Eur J Neurosci. 2006;24(9):2429–38.
14. Gelernter J, Kennedy J, Van Tol H, Civelli O, Kidd K. The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRA. Genomics. 1992;13(1):208–10.
15. Oak J, Oldenhof J, Van Tol H. The dopamine D(4) receptor: one decade of research. Eur J Pharmacol. 2000;405(1–3):303–27.



16. Wu J, Xiao H, Sun H, Zou L, Zhu L-Q. Role of dopamine receptors in ADHD: a systematic meta-analysis. *Mol Neurobiol.* 2012;45(3):605–20.
17. Hawi Z, McCarron M, Kirley A, Daly G, Fitzgerald M, Gill M. No association of the dopamine DRD4 receptor (DRD4) gene polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the Irish population. *Am J Med Genet.* 2000;96(3):268–72.
18. Van Tol HH WC, Guan HC. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature.* 1992;(385)149-152
19. Asghari V., Sanyal S., Buchwaldt S., Paterson A., Jovanovic V., Van Tol HH. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem.* 1995 Sep; 65(3):1157-65.
20. 18. Faraone SV., Mick E. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *psychiatr Clin North Am.* 2010 Mar;33(1):159-80. doi: 10.1016/j.psc.2009.12.004.
21. Tahir E YY, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson PJ. Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol Psychiatry.* 2000;5:396-404.
22. Curran S MJ, Sham P, Rijdsdijk F, Marusic K, Taylor E, Asherson P. QTL association analysis of the DRD4 exon 3 VNTR polymorphism in a population sample of children screened with a parent rating scale for ADHD symptoms. *Am J Med Genet.* 2001;105:387-93.
23. Roman T SM, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH Attention-deficit hyperactivity disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet.* 2001;105:471-8.
24. Castellanos FX LE, Tayebi N, Lee P, Long RE, Giedd JN, Sharp W, Marsh WL, Walter JM, Hamburger SD, Ginns EI, Rapoport JL, Sidransky E. Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention- deficit/hyperactivity disorder: Genetic and brain morphometric analyses. *Mol Psychiatry.* 1998;3:431-4.
25. Marino C GR, Vanzin L, Molteni M, Lorusso ML, Nobile M, Baschiroto C, Alda M, Battaglia M. No evidence for association and linkage disequilibrium between dyslexia and markers of four dopamine-related genes. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2003;12:198-202.
26. Johansson S HH, Halmøy A, Jacobsen KK, Landaas ET, Dramsdahl M, Fasmer OB, Bergsholm P, Lundervold AJ, Gillberg C. Genetic analyses of dopamine related genes in adult ADHD patients suggest an association with the DRD5-microsatellite repeat but not

- with DRD4 or SLC6A3 VNTRs. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(1470-1475).
27. Ji HS PK, Park WS, Lim MH. No association between the response to methylphenidate and DRD4 gene polymorphism in Korean attention deficit hyperactivity disorder: A case control study. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2013;11:13-7.
  28. Pastor PN, Reuben CA. Diagnosed attention deficit hyperactivity disorder and learning disability: United States, 2004–6. *Vital Health Stat Series.* 2008;10(237):1–14.
  29. Wolraich M, Brown L, Brown RT, et al. ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Pediatrics.* 2011;128(5):1007–22.
  30. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet.* 2009;126(1):51–90.
  31. Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet.* 2006;15(14):2276–84.
  32. Faraone S, Perlis R, Doyle A, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2005;57(11):1313–23.
  33. Nikolaidis A, Gray JR. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2010;5(2–3):188–93.
  34. Bidwell LC, Willcutt EG, McQueen MB, et al. A family based association study of DRD4, DAT1, and 5HTT and continuous traits of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Genet.* 2011;41(1):165–74.
  35. Shahin O, Meguid NA, Raafat O, Dawood RM, Doss M, Bader El Din NG, El Awady MK. Polymorphism in variable number of tandem repeats of dopamine d4 gene is a genetic risk factor in attention deficit hyperactive egyptian children: pilot study. *Biomark Insights.* 2015 May 5;10:33-8. doi: 10.4137/BMLS18519. eCollection 2015.
  36. Cheuk DK, Li SY, Wong V. Exon 3 polymorphisms of dopamine D4 receptor (DRD4) gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141B(8):907–11.
  37. Nikolaidis A, Gray JR. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2010;5(2–3):188–93.
  38. Calahorro F, Alejandre E, Anaya N, et al. A preliminary study of gene polymorphisms involved in the neurotransmitters metabolism of a homogeneous Spanish autistic group. *Res Autism Spectr Disord.* 2009;3:438–43.

39. Nikolaidis A, Gray JR. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2010 Jun;5(2-3):188-93. doi: 10.1093/scan/nsp049.
40. Leung, P.W., Lee, C.C., Hung, S.F., Ho, T.P., Tang, C.P., Kwong, S.L., et al. Dopamine receptor D4 (DRD4) gene in Han Chinese children with attention-deficit/ hyperactivity disorder (ADHD): increased prevalence of the 2-repeat allele. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2005;133B, 54–56.
41. Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, et al. Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141(1):51–4.
42. Brookes KJ, Xu X, Chen CK, Huang YS, Wu Y, Asherson PH. No evidence for the association of DRD4 with ADHD in a Taiwanese population within-family study. *BMC Med Genet*. 2005;6:31.
43. Oak J, Oldenhof J, Van Tol H. The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol*. 2000;405(1–3):303–27.
44. Jovanovic V, Guan HC, Van Tol HH. Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D4.2 and D4.10 receptor variants. *Pharmacogenetics*. 1999;9(5):561–8.
45. King AP, Muzik M, Hamilton L, Taylor AB, Rosenblum KL, Liberzon I. Dopamine Receptor Gene DRD4 7-Repeat Allele X Maternal Sensitivity Interaction on Child Externalizing Behavior Problems: Independent Replication of Effects at 18 Months. *PLoS One*. 2016 Aug 5;11(8):e0160473. doi: 10.1371/journal.pone.0160473.