

Utjecaj volatiliziranog metamfetamina na razvojni ciklus *Drosophila melanogaster*

Maslač, Ante

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:438337>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-25**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Ante Maslač

**Utjecaj volatiliziranog metamfetamina na razvojni ciklus
Drosophile melanogaster**

Završni rad

Rijeka, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Ante Maslač

**Utjecaj volatiliziranog metamfetamina na razvojni ciklus
Drosophile melanogaster**

Završni rad

Rijeka, srpanj 2022.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate programme
"Biotechnology and drug research"

Ante Maslač

Effects of volatilized methamphetamine on *Drosophila melanogaster* development cycle

Undergraduate thesis

Rijeka, July 2022.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Rozi Andretić Waldovski

Završni rad obranjen je dana 26. srpnja 2022. pred povjerenstvom:

1. izv.prof.dr.sc. Rozi Andretić Waldovski, mentor
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Munitić
3. prof.dr.sc. Anđelka Radojčić Badovinac

Rad ima 28 stranica, 11 slika i 25 literaturnih navoda.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> kao modelni organizam	1
1.2. Razvojni ciklus <i>Drosophile melanogaster</i>	2
1.3. Utjecaj psihostimulansa na dopaminergički sustav	3
1.4. Epigenetski utjecaj opojnih droga.....	4
1.5. Multigeneracijski i trangueracijski učinak izloženosti psihostimulansima	6
2. CILJ RADA	8
3. Metode i materijali	9
3.1. Priprema uzoraka	9
3.2. <i>FlyBong</i> sustav	9
3.3. Dizajn eksperimenta.....	11
3.4. Prikaz, obrada i statistička analiza podataka	12
4. Rezultati.....	13
4.1. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na razvojni ciklus u 1. generaciji	13
4.2. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na razvojni ciklus u 2. generaciji	17
5. Rasprava	20
6. Zaključak	24
Literatura	25
Životopis	27

SAŽETAK

Mehanizmi obiteljskog nasljeđivanja različitih fenotipova, uzrokovanih roditeljskom konzumacijom droga, odnose se na kombinacije genetskih i okolišnih čimbenika. Epigenetski faktori mogu upravljati aktivacijom i utišavanjem genske ekspresije, a povezani su s dugotrajnim neuroplastičnim promjenama povezanih s uzimanjem droga u ljudskim i životinjskim modelima. Takve promjene mogu perzistirati unutar više generacija, iako je prekinuto izlaganje izvornom podražaju. Stoga epigenetsko transgeneracijsko nasljeđe sugerira mehanizam utjecaja roditeljske upotrebe droga na nekoliko generacija potomaka.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako volatilizirani metamfetamin (vMETH) utječe na razvojni ciklus *Drosophila melanogaster*. Pomoću *FlyBong* metode izvršili smo administraciju vMETH-a velikoj grupi mužjaka, iz koje smo potom izdvojili 10% mužjaka koji su pokazali najveći lokomotorni odgovor i parili ih s djevicama koje nisu bile izložene vMETH-u. Praćen je utjecaj izloženosti F0 očeva na brzinu razvoja i broj potomaka F1 i F2 generacije.

Rezultati su pokazali trend povećanog broja čahura te povećani broj muških i ženskih potomaka F1 generacije u skupini koja je bila izložena vMETH-u. Dok je u F2 generaciji vidljiv trend povećanog broja čahura i ženskih potomaka, taj trend nije prisutan kod muških potomaka. Stoga rezultati sugeriraju da postoji mogući utjecaj vMETH-a na razvojni ciklus *Drosophila melanogaster* te da takav efekt ima potencijalne transgeneracijske karakteristike.

Kako bi se ovakve hipoteze potvrdile, ove preliminarne rezultate potrebno je potvrditi preciznijim istraživanjima utjecaja vMETH-a na razvojni ciklus. Potrebno je utvrditi konkretne mehanizme i nasljedna svojstva ovog efekta.

Ključne riječi: *Drosophila melanogaster*, volatilizirani metamfetamin, razvojni ciklus, epigenetika.

SUMMARY

The familial inheritance mechanism of different phenotypes caused by parental drug use consists of genetic and environmental factors. Epigenetic factors can govern the activation and silencing of gene expression and have been associated with long-term neuroplastic changes related to drug use in humans and animal models. Such changes may persist over several generations even though exposure to the original stimulus has been discontinued. Therefore, epigenetic transgenerational inheritance suggests a mechanism for the influence of parental drug use on several generations of offspring.

This research aimed to examine how volatilized methamphetamine (vMETH) affects the developmental cycle of *Drosophila melanogaster*. Using the *FlyBong* method, we administered vMETH to a large group of males, from which we then selected 10% that showed the highest locomotor response and mated them with virgins that were not exposed to vMETH. The impact of exposure of F0 fathers on the development speed and the number of F1 and F2 generation offspring was monitored.

In the F1 generation, the results showed a trend of an increased number of pupae and both male and female offspring in the group exposed to vMETH. While in the F2 generation, there is a visible trend of an increased number of pupae and female offspring, this trend is not present in male offspring. Therefore, the results suggest a possible influence of vMETH on the developmental cycle of *Drosophila melanogaster*, and such an effect has potential transgenerational characteristics.

In order to confirm these hypotheses, these preliminary results need to be validated by more detailed studies of the influence of vMETH on the development cycle. It is necessary to determine this effect's specific mechanisms and hereditary properties.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, volatilized methamphetamine, developmental cycle, epigenetics.

1. Uvod

1.1. *Drosophila melanogaster* kao modelni organizam

Drosophila melanogaster (vinska mušica) prepoznata je još početkom 20. stoljeća kao odličan modelni organizam za razna biološka istraživanja. Glavne osobine koje su poželjne za svaki modelni organizam predstavljaju brzo generacijsko vrijeme, jeftin uzgoj, sekvencionirani genom i jednostavnost održavanja. Vinska mušica posjeduje sve te osobine te ima oko 70% gena koji su slični ljudskim [1]. Zbog genske homologije i konzerviranih bioloških puteva između vinske mušice i ljudi, rezultati dobiveni u pokusima na vinskoj mušici se lako mogu translirati i primijeniti na sisavcima [2].

Upravo zbog sličnosti u fiziologiji živčanog sustava, vinska mušica je poželjni modelni organizam u neuroznanosti. Iako imaju primitivniji živčani sustav i fiziološke funkcije, na osnovnim razinama se ukazuju sličnosti kao što su: signalni putevi, neurotransmiteri, receptori, neuroni i funkcionalni centri u mozgu [3]. Vinska mušica također posjeduje dopaminergički sustav kao sustav neurotransmisije. Upravo ta karakteristika potaknula je brojna istraživanja utjecaja psihostimulansa na dopaminsku transmisiju.

1.2. Razvojni ciklus *Drosophila melanogaster*

Duljina razvojnog ciklusa vinske mušice ovisi o različitim faktorima kao što su temperatura, vlaga i hrana. Standardni uvjeti pri kojima se mušice uzgajaju u laboratoriju su 25°C , 70% vlažnosti zraka te hrana na bazi kukurznog brašna, agra ili melase. Pri standardnim laboratorijskim uvjetima razvojni ciklus vinske mušice traje oko 10 dana. Ženke, nakon parenja s mužjacima, polažu jajašca na hranjivi medij. Na površini hrane nalaze se embriji, koji se u roku od 24 sata pretvore u ličinke 1. stadija a one se nalaze na površini hranjivog medija i ondje se hrane. Nakon 24 sata dolazi do prvog presvlačenja ličinke, koja prelazi u 2. stadij gdje se ukopava u hranu. Kroz narednih 5 dana ličinke se neprestano hrane i rastu te dolazi do zadnjeg presvlačenja kada izlaze iz hrane i traže mjesto gdje će se začahuriti. Razdoblje čahure traje oko 4 dana, kada tijelo mušice prolazi kroz potpunu metamorfozu i razvija se u odraslu jedinku (Slika 1). Ženke postaju spolno aktivne već 8 sati nakon izlaska iz čahure [4]. Prosječni životni vijek odrasle jedinke je oko mjesec dana. Udio preživljenja od embrija do odrasle mušice je oko 70-80% [1].



Slika 1. Ilustracijski prikaz razvojnog ciklusa *D.melanogaster*. Prikazani su embrij, tri stadija ličinke, čahura i odrasla mušica.

Ženke *D.melanogaster* nisu spolno aktivne narednih 8 sati nakon izlaska iz čahure. Stoga ih nazivamo djevicama i možemo ih razlikovati od spolno aktivnih mušica. Takva karakteristika je od velikog značaja jer je kasnije nemoguće razlikovati oplođenu i neoplođenu ženku. Za svog životnog ciklusa, ženke se pare se s nekoliko različitih mužjaka i mogu proizvesti do 3000 jajašaca. Ženke *D.melanogaster* pohranjuju spermumu te oplođuju i polažu jajašca tijekom nekoliko dana. Također, mogu položiti do 100 jajašaca dnevno u vrhuncu svoje plodnosti. Ona se obično postiže 3-5 dana nakon potpune metamorfoze. Plodnost može biti varijabilna te ovisi o pojedinačnim ženkama i laboratorijskim sojevima. U optimalnim uvjetima laboratorija, prosječan broj potomaka jedne ženke je 600 jedinki [1].

1.3. Utjecaj psihostimulansa na dopaminergički sustav

Poznato je da psihostimulansi uzrokuju povećanu lokomotornu aktivnost te dovode do razvoja ovisnosti, radi nagrađujućeg utjecaja na živčani sustav. Karakteristike ovisnosti o psihostimulansima kao što su metamfetamin (METH) i kokain temelje se na njihovoj sposobnosti povećavanja dopaminergičke neurotransmisije u sustavu nagrađivanja. Krajem 90-ih otkriveno je da *Drosophila melanogaster*, nakon što se izloži psihostimulansima, ima slične promjene u ponašanju poput sisavaca. Također je pokazano da neuroni vinske mušice, koji sintetiziraju i oslobađaju dopamin (DA), koriste transportere i enzime koji su evolucijski slični čovjeku [5]. Stoga *Drosophila melanogaster* predstavlja idealan translacijski modelni organizam za proučavanje utjecaja psihostimulansa na živčani sustav.

DA je poznati neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu mnogih kralježnjaka i beskralježnjaka. Ima nekoliko uloga u živčanom sustavu, od modulacije lokomotornog ponašanja do učenja, spavanja, motivacije i sl. DA se sintetizira unutar presinaptičkog neurona, te se pohranjuje u unutarstaničnim vezikulama. Okidanjem akcijskog potencijala dolazi do oslobađanja DA iz vezikula procesom egzocitoze. Kada se DA nađe u

sinaptičkoj pukotini, dolazi do vezanja za receptore postsinaptičkog neurona ili na presinaptičke dopaminske receptore. Ostatak DA u sinaptičkoj pukotini se uklanja transportom pomoću dopaminskog transportera u presinaptički neuron [6].

Droge poput METH-a i kokaina, koje direktno djeluju na dopaminske sustave, ciljano utječu na transportere i na taj način mogu spriječiti ponovnu pohranu DA ili pojačati njegovu sekreciju iz presinaptičkog neurona. METH djeluje na presinaptički neuron gdje sprječava pohranjivanje DA u vezikule i time povećava njegovu koncentraciju u citoplazmi. Istovremeno potiče sekreciju DA iz citoplazme u sinaptičku pukotinu, na način da promijeni smjer djelovanja dopaminskih transportera [7].

1.4. Epigenetski utjecaj opojnih droga

Epigenetika je relativno nova grana znanosti, koja nam je otvorila nove spoznaje o mogućnostima nasljeđivanja. Utjecaji okoliša na fenotip često nisu izravno posredovani klasičnim genetskim mehanizmima. Postižu se putem epigenetskih mehanizama koji mogu utjecati na fenotip izložene jedinke, a mogu se i prenositi iz jedne generacije na drugu. Stanične epigenetske modifikacije kao odgovor na okoliš uključuju remodeliranje kromatina, modifikacije histona, nekodirajuće RNA i metilaciju DNA. Histonski kompleksi sadržavaju N-terminalni rep, koji može biti podvrgnut modifikacijama kao što su metilacija, acetilacija, fosforilacija, ubikvitilacija i sl. Kromatin se otpušta acetilacijom histonskog repa i tako se omogućuje transkripcija gena. Metilacija histona može uzrokovati aktivaciju ili supresiju gena [8].

Okolišni faktori mogu izravno utjecati na ove epigenetske procese. Variraju od prehrane, temperature i stresa do raznih toksina iz okoliša [9]. Takvi utjecaji većinom rezultiraju djelovanjem na somatske stanice određenih tkiva tijekom kritičnih perioda razvoja, što posljedično povećava

rizik od pojave bolesti u odrasloj dobi. Ovakve posljedice su štetne samo za određenog pojedinca, dok su epigenetske modifikacije na zametnim stanicama zaslužne za prijenos informacije slijedećoj generaciji. Prije se smatralo da takve promjene nestaju tijekom faza gametogeneze i rane embriogeneze. No, sada znamo da epigenetske modifikacije mogu ostati trajno zabilježene, što je rezultiralo u perzistiranju određenih fenotipova kroz iduće generacije [10].

Mnoga klinička istraživanja su prepoznala obiteljske obrasce ovisnosti o drogama, te su studije asocijacije na cijelom genomu (GWAS) identificirale gene koji su zaslužni u stvaranju ovisnosti [11]. Međutim, poznato je da nisu sve nasljedne informacije prisutne samo u sekvenci DNA. Otkriveno je da nakon izlaganja drogama dolazi do epigenetskih modifikacija, koje mogu doprinijeti prijenosu ovisničkih obrazaca kroz generacije [12]. Fenotipske posljedice izloženosti drogama pojavljuju se u nekoliko idućih generacija, unatoč tome što potomci nisu bili izloženi niti su pronađene alelne ili kromosomske varijacije [13]. Stoga kemijske izmjene genoma, kao što su epigenetske modifikacije, mogu u konačnici promijeniti funkcionalnu ekspresiju gena. Otkrivanje točnih mehanizama epigenetskog utjecaja je vrlo složeno, no epigenetika bi mogla predstavljati ključ u razumijevanju dugovječnosti nasljednih posljedica koje se pojavljuju među više generacija.

Administracijom psihostimulansa postiže se djelovanje na kritične regije mozga, što rezultira modulacijom neuralne plastičnosti. Epigenetske modifikacije predstavljaju jedan od načina na koji se postiže regulacija genske ekspresije u neuronima, što posljedično uzrokuje različite neuralne adaptacije. Takva modulacija neuralne plastičnosti značajno doprinosi procesu ovisnosti [14, 15]. Kronične doze METH-a mogu izazvati ozbiljnu staničnu toksičnost, što rezultira oštećenjem mozga i oksidativnim stresom [16]. METH također uništava dopaminske receptore u neuronima čineći kronične korisnike neosjetljivima na emocije ili zadovoljstvo zbog trajnih nedostataka u sustavu nagrađivanja. Prema tome, dugoročnu konzumaciju

METH-a karakterizira disfunkcija i ireverzibilne promjene u središnjem i perifernom živčanom sustavu koje mogu biti i epigenetskog karaktera [17].

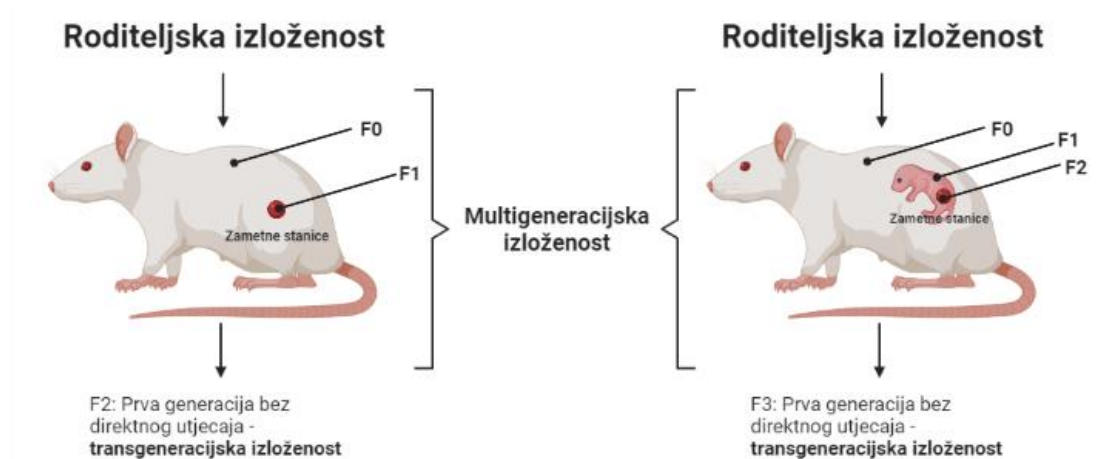
Izloženost psihostimulansima povećava razine acetilacije histona u nucleus accumbens (NAc), ključnom području mozga za stvaranje ovisnosti. Kratkotrajna povećanja acetilacije histona potiču bihevioralne reakcije na kokain, dok se dugotrajna povećanja općenito suprotstavljaju učincima kokaina. Promijenjena acetilacija histona dokazana je na nekoliko gena kandidata u NAc kao odgovor na psihostimulanse. Metilacija histona također je uključena u ovisnost o drogama. Dvije histonske metiltransferaze, koje kataliziraju dimetilirano stanje Lys9 od H3, smanjene su u NAc kroničnom primjenom kokaina ili opijata. Razine DNA metiltransferaze, povećane su u NAc nakon produljenog prekida administracije kokaina. Zabilježeno je da višestruke miRNA imaju povećanu ili smanjenu ekspresiju tijekom izloženosti drogama. Tako kokain povećava razine miR-181a i smanjuje miR-124 u striatumu štakora [18].

1.5. Multigeneracijski i trangeneracijski učinak izloženosti psihostimulansima

Posljedice roditeljskog konzumiranja droga mogu biti naslijeđene posredovanjem genetskih i okolišnih čimbenika. Pokazano je da nekoliko fenotipskih posljedica izloženosti drogama mogu biti pronađene u više generacija potomaka unatoč tome što potomci nisu bili prethodno izloženi takvim supstancama [8]. Provedena su mnoga pretklinička istraživanja koja su ispitala razvojne učinke prenatalne izloženosti psihostimulansima. Za potrebe istraživanja korišteni su mužjaci glodavaca, te se pratio utjecaj na razvoj potomaka. Rezultati dosljedno pokazuju poremećeni razvoj kortikalnog i hipokampalnog dijela mozga, te potomci izražavaju oslabljene kognitivne funkcije [19]. Nadalje, muški potomci čiji su očevi bili izloženi psihostimulansu, imali su smanjen promjer glave. Nakon što su muški potomci dosegli odraslu dob, pokazali su poremećaje u pažnji i pamćenju, tako što su bili testirani pomoću paradigme labirinta. Ženski potomci su

također pokazali poremećaje u pažnji i pamćenju te su ti defekti bili čak i izraženiji. Rezultati su pokazali da očevo konzumiranje psihostimulansa prije parenja ima utjecaj na razvoj potomaka, osobito ženskih [20].

Mehanizmi putem kojih psihostimulansi postižu utjecaj na iduću generaciju nazivamo multigeneracijskim i transgeneracijskim nasljeđivanjem. Razlika između te dvije vrste nasljeđivanja proizlazi iz toga što su multigeneracijski fenotipovi izravno izloženi podražaju, dok kod transgeneracijskih fenotipova ne postoji direktna izloženost. Stoga ako je F0 generacija prenatalno izložena psihostimulansu, njihove zametne stanice su također direktno izložene. Prema tome i F1 generacija pripada multigeneracijskom fenotipu, dok se F2 smatra transgeneracijskim fenotipom budući da je to prva generacija kod koje nema direktne izloženosti. Još jedna mogućnost je izloženost majki F0 generacije tijekom trudnoće. Zametne stanice F1 potomaka su također izravno izložene *in utero* i stoga će i potomci F2 poticati od izravno izloženih zametnih stanica. U ovom slučaju su F0 roditelji, F1 i F2 potomci svi izloženi te su svi fenotipovi multigeneracijski. F3 potomci će tek pokazati transgeneracijski fenotip (Slika 2) [8].



Slika 2. Ilustracijski prikaz multigeneracijskog i transgeneracijskog učinka.

2. CILJ RADA

Osnovna svrha ovog istraživačkog rada je ispitati postoji li utjecaj vMETH-a na razvojni ciklus *Drosophila melanogaster* te očituje li se takav utjecaj na idućim generacijama. Cilj provedenih pokusa je uočiti razliku u razvojnem ciklusu, skupine tretirane vMETH-om i kontrola, kroz kvantifikaciju broja čahura i potomaka.

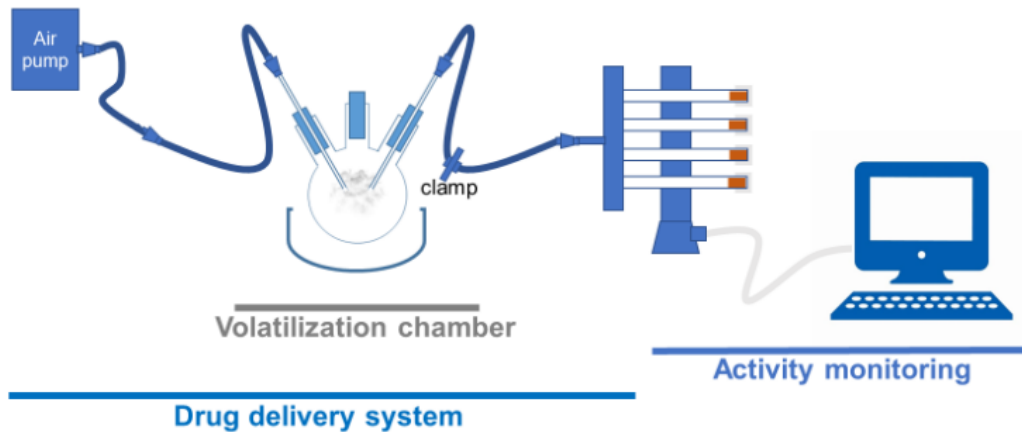
3. Metode i materijali

3.1. Priprema uzoraka

U eksperimentima su korišteni mužjaci i ženke divljeg tipa *Drosophila melanogaster*, *Canton S* soja. Mušice su uzgajane na standardnom hranjivom mediju koji je napravljen na bazi kukuruznog brašna. Držane su u inkubatoru na temperaturi od 25°C i 70% vlažnosti, u ciklusu svjetlo/mrak (12:12). Mušice su anestezirane pomoću ugljikovog dioksida i sakupljene na prvi dan pokusa.

3.2. FlyBong sustav

FlyBong je visokopropusna metoda za kvantifikaciju podataka o lokomotornoj aktivnosti izazvane izlaganjem volatiliziranim psihostimulansima. Sastoji se od tikvice s trostrukim vratom, monitora za praćenje lokomotorne aktivnosti *DAMS* (eng. *Drosophila Activity Monitoring System*) te sustava za isporuku psihostimulansa (Slika 3). Jednu dozu droge čini 75µg METH-a otopljenog u etanolu. Kako bi se spriječio mogući utjecaj etanola na ponašanje mušica, doza se stavlja u staklenu tikvicu 4-6 sati prije administracije. Volatilizacija se postiže grijanjem tikvice pomoću grijaćih kapa 8 minuta na temperaturi 185-200°C. Zračna pumpa, staklena tikvica i *DAMS* monitori su povezani pomoću gumenih cijevi koje posjeduju ventile za kontrolu protoka. Zatim se uključuje protok zraka s brzinom od 2,5 L/min i otvaraju se ventili na jednu minutu kako bi se vMETH isporučio.



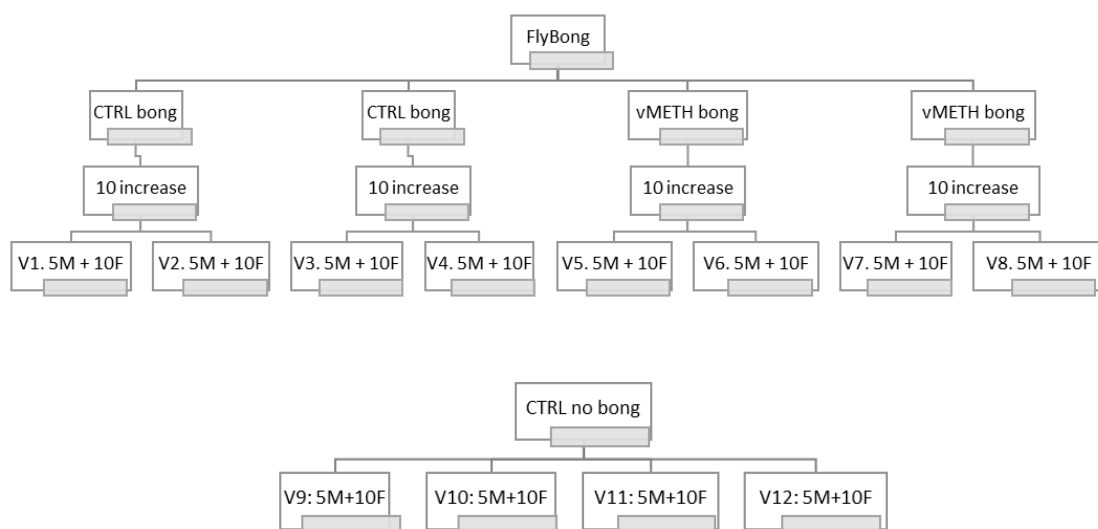
Slika 3. Shematski prikaz *FlyBong* sustava za mjerenje promjena u lokomotornoj aktivnosti *Drosophila melanogaster* nakon administracije *vMETH-a*. U volatilizacijsku komoru je stavljen METH otopljen u etanolu. Komora se zagrijava do temperature isparavanja nakon čega je uključen protok zraka. Na taj način je *vMETH* dostavljen do monitora gdje se nalaze mušice u individualnim cjevčicama. Lokomotorna aktivnost se mjeri prema broju prelazaka mušice kroz središte cjevčice po minuti. Mjerenje započinje 30 minuta prije administracije *vMETH-a* i traje 30 minuta nakon [21].

DAMS monitor može bilježiti razinu lokomotorne aktivnosti 32 mušice istovremeno, koje se nalaze u polikarbonatnim cjevčicama. Na jednoj strani cjevčice se nalazi hrana, dok je druga strana spojena s dispencerom psihostimulansa. Odgovor na dozu prati se pomoću infracrvene zrake, koja prolazi sredinom svake cjevčice. Mjeri se broj prijelaza pojedinačne mušice u intervalu od jedne minute. Pomoću softvera *DAMFileScan* povlače se i analiziraju pohranjeni podaci koje su prikupili *DAMS* monitori. Tako se mogu izdvojiti mušice s najvećim odgovorom na dozu.

3.3. Dizajn eksperimenta

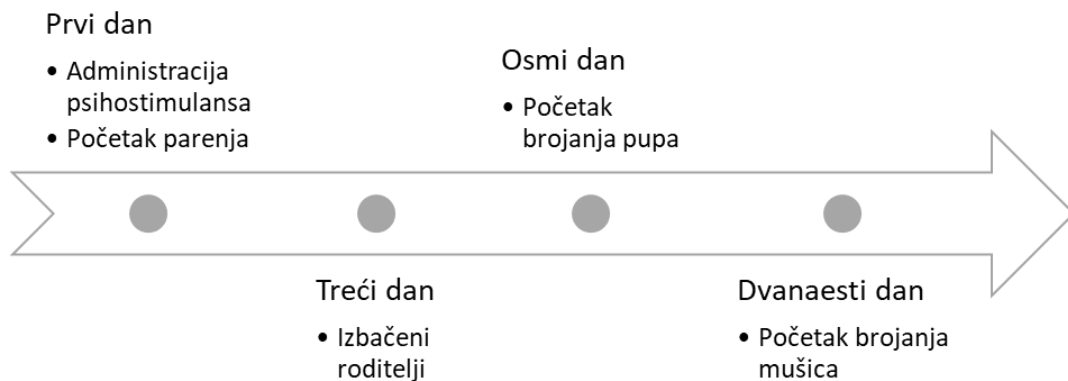
U eksperimentu su korištena četiri *DAMS* monitora za praćenje aktivnosti. Dva *DAMS* monitora su korištena za kontrolnu skupinu gdje su mušice izložene zraku. U ostala dva monitora mušice su bile izložene *vMETH*-u. Koristila se dodatna kontrolna skupina koja se nalazila izvan *FlyBong*-a. Nakon administracije droge, iz svakog monitora su izdvojeni mužjaci s najvećim odgovorom u zasebne kultivacijske tubice. U svaku tubicu je bilo dodano 10 djevice (Slika 4). Promatrane su tri skupine mušica, a to su:

1. 4 tubice predstavljaju kontrolnu skupinu koja je bila izložena vrućem zraku (*CTRL*)
2. 4 tubice predstavljaju pokusnu skupinu koja je izložena volatiliziranom metamfetaminu (*vMETH*)
3. 4 tubice predstavljaju kontrolnu skupinu koja se nalazila pri standardnim uvjetima izvan *FlyBong*-a (*CTRL no bong*)



Slika 4. Dizajn eksperimenta. Eksperimentalnu skupinu činili su mužjaci koji su bili tretirani jednom dozom ($75\mu\text{g}$) volatiliziranog metamfetamina (*vMETH* skupina, $n=64$). U kontrolnoj skupini nalazili su se mužjaci tretirani vrućim zrakom (*CTRL* skupina, $n=64$). Druga kontrolna skupina uzgajana je u kultivacijskim tubicama pri normalnim uvjetima izvan *FlyBong*-a (*CTRL no bong* skupina, $n=20$). Nakon administracije *vMETH*-a i vrućeg zraka, izdvojeno je 10 mužjaka s najvećim porastom u lokomotornoj aktivnosti. Mužjaci su stavljeni u kultivacijske tubice tako da je svaka tubica sadržavala 5 mužjaka i 10 netretiranih djevice.

Mužjaci i ženke su ostavljeni 3 dana u tubicama te su nakon toga izbačeni. Pratio se broj živućih ženki u svakoj tubici tijekom parenja, kako bi se podaci na kraju mogli normalizirati. Čahure i nove mušice su bile prebrojavane svaki dan kroz razdoblje od 9 dana. Kod prebrojavanja novih mušica, dodatno su se razdvajali mužjaci i ženke i bilježio se njihov broj.



Slika 5. Kronološki tijek eksperimenta.

Istraživan je i utjecaj METH-a na razvojni ciklus druge generacije. Odvojena su po 3 mužjaka i 3 ženke iz prve generacije. Mušice su premještene u nove kultivacijske tubice, te je proces opažanja razvojnog ciklusa ponovljen.

3.4. Prikaz, obrada i statistička analiza podataka

Za preliminarnu obradu podataka koristio se program MS Excel pomoću kojeg je vršena i analiza lokomotorne aktivnosti, nakon prve administracije METH-a. Napravljena su dva ponavljanja pokusa te su podaci iz oba pokusa objedinjeni. Rezultati su prikazani u obliku linijskih krivulja u dvije vrste grafova. Jedan graf prikazuje kumulativni prinos jedne djevice u razdoblju od 10 dana, dok drugi graf prikazuje srednju vrijednost prinosa jedne djevice po danima. Statistička analiza podataka provedena je pomoću softvera GraphPad Prism verzija 9.4.0. Korišten je test *One way ANOVA (post hoc: Tukey multiple comparison test)* koji se koristi za usporedbu dvije ili više grupa.

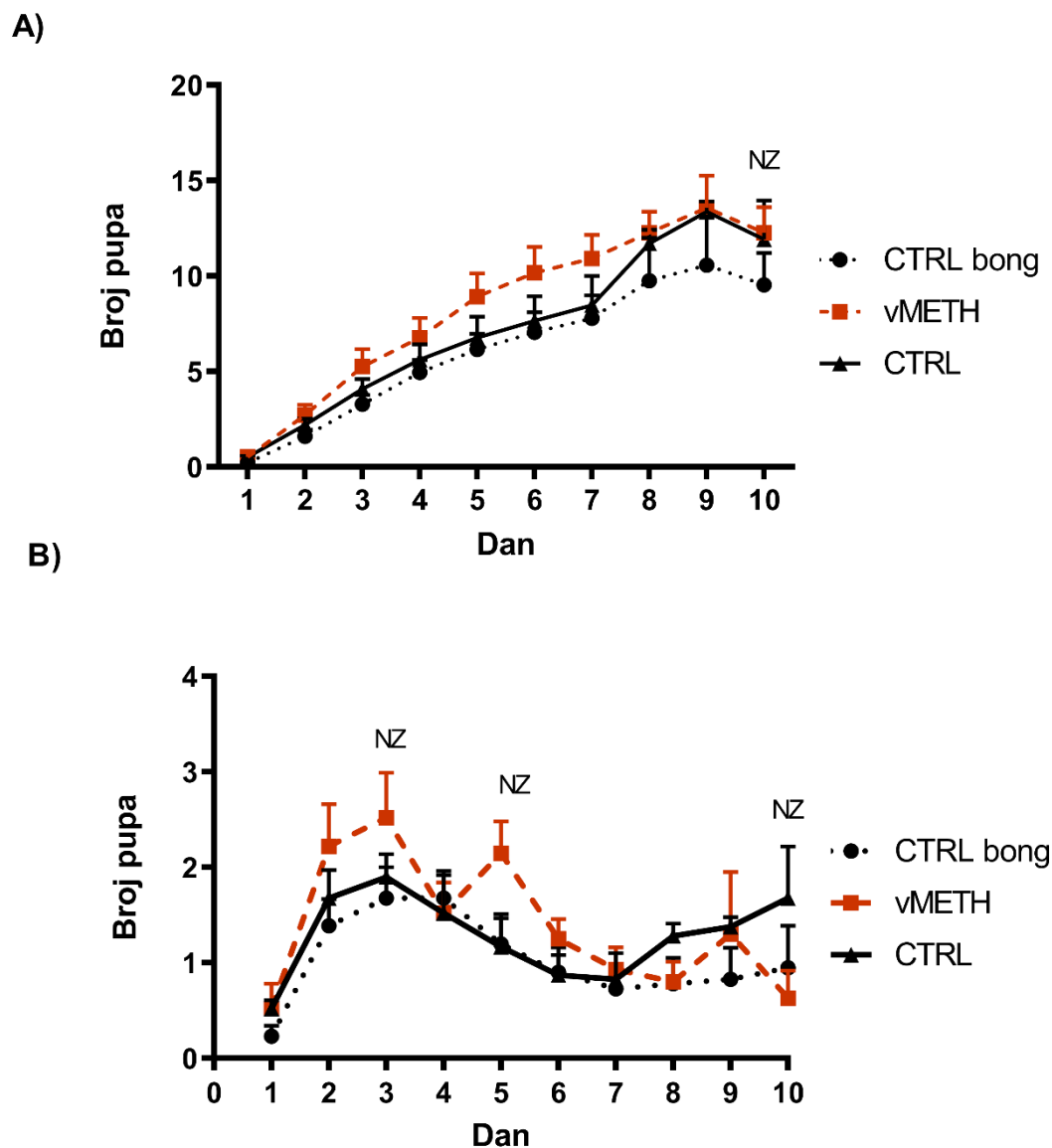
4. Rezultati

Ovim pokusom htjeli smo ispitati utjecaj vMETH-a na razvojni ciklus *Drosophila melanogaster*. METH je bio administriran 4x32 mužjaka koristeći *FlyBong* metodu. Izloženost METH-u izaziva povećanje lokomotorne aktivnosti inhibirajući ponovnu pohranu i olakšavajući oslobađanje DA. Prema tome se mjerila lokomotorna aktivnost kako bi se na temelju kvantificiranih podataka mogli izdvojiti mužjaci s najvećim odgovorom na dozu. Pojam „netretirane djevice“ označuje ženke koje nisu bile tretirane drogom niti vrućim zrakom, te su bile izdvojene u stadiju djevica. Nakon toga su stavljene na parenje s mužjacima koji su pokazali najveći odgovor na METH. Svakodnevno su bilježeni brojevi novih čahura i mušica. Pokus se provodio na tri skupine: CTRL, vMETH i CTRL no bong. Praćen je efekt i na drugu generaciju. Niti u jednom rezultatu nije dobivena statistički značajna razlika radi malog broj uzoraka, ali je vidljiv trend povećanog broja u usporedbi s kontrolama.

4.1. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na razvojni ciklus u 1. generaciji

Nakon parenja tretiranih mužjaka i netretiranih djevica, ženke su položile embrije u hranu. U razdoblju od 24 sata iz embrija su se razvile ličinke. Za njih je teško utvrditi točno vrijeme pojavljivanja zbog toga što je dio ličinki bio ukopan u hranu. Tokom šestog i sedmog dana ličinke su počele puzati po stijenkama tubice gdje su se začahurile i prešle u stadij čahure. Osmi dan uočena je prva čahura i započelo je svakodnevno brojanje novih čahura.

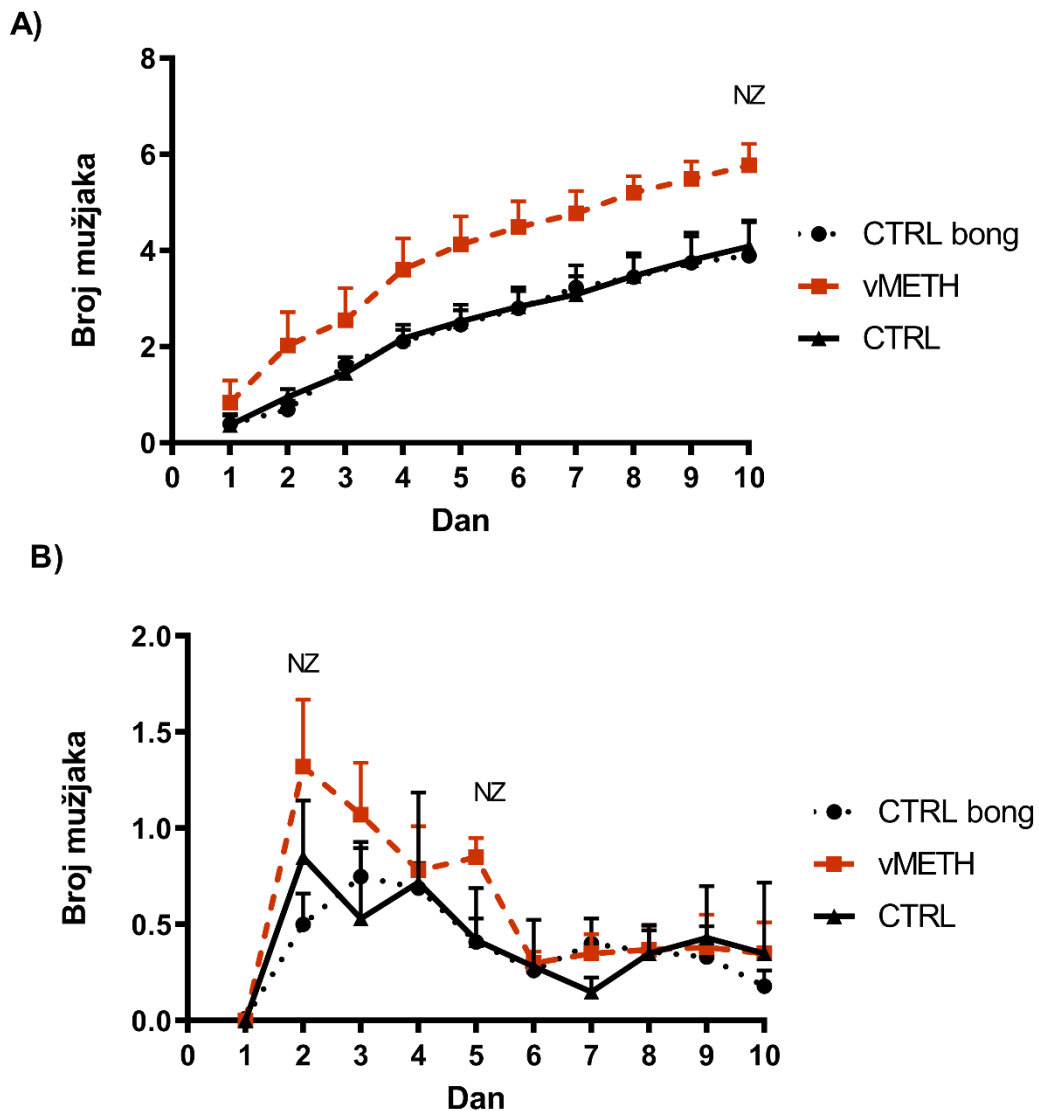
Pokus je pokazao da postoji trend povećanog broja čahura između vMETH skupine i kontrolnih skupina CTRL i CTRL no bong za pojedine dane (Slika 6.A). Najveći broj čahura za sve tri skupine uočen je na trećem danu brojanja. Petog dana uočeno je još jedno povećanje broja čahura za vMETH skupinu (Slika 6.B).



Slika 6. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na broj čahura. Čahure su brojane svaki dan tijekom 10 dana. **A)** Kumulativni prikaz broja čahura. **B)** Prikaz broja čahura za pojedinačne dane. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. NZ-nema statističke značajnosti.

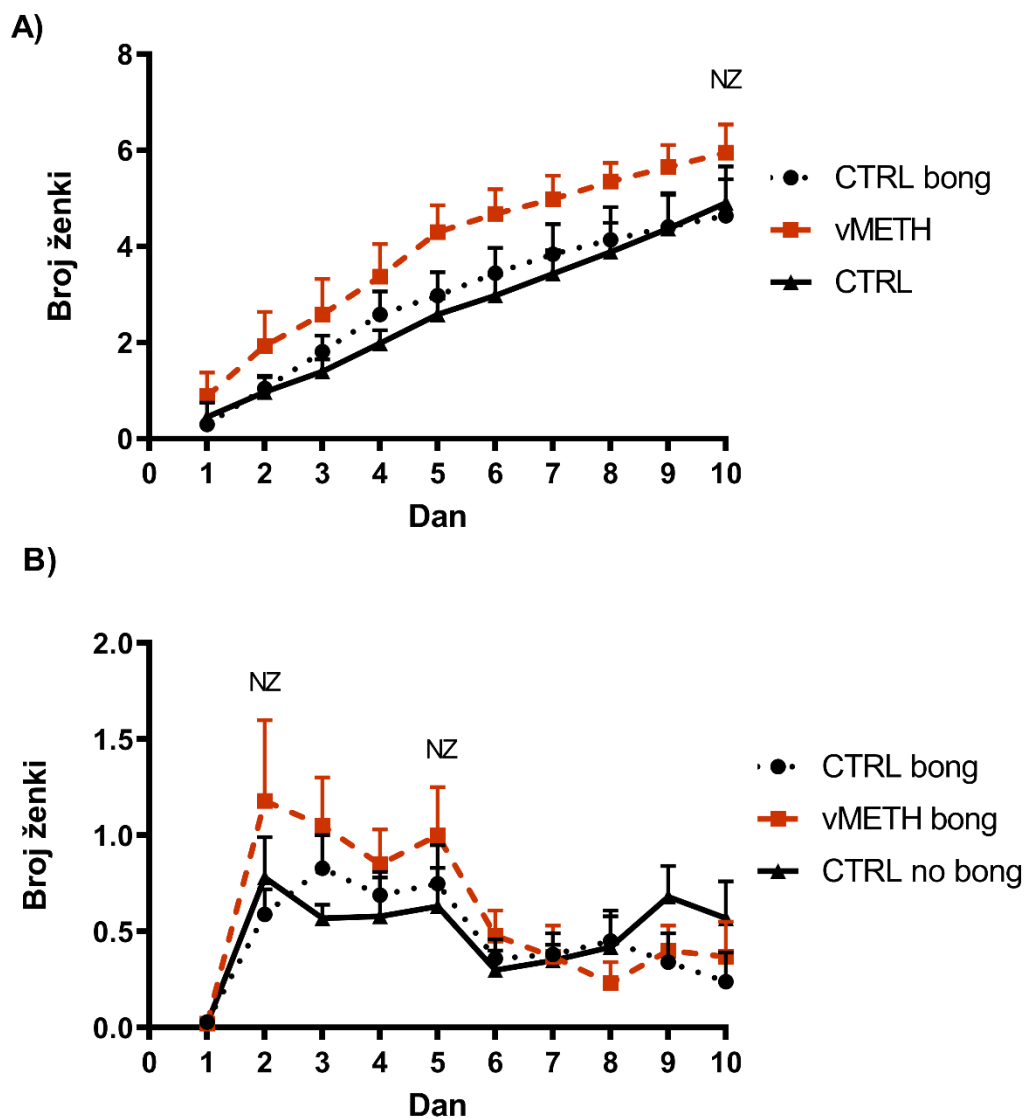
Tijekom stadija čahure, koji je trajao 4 dana odvijao se proces metamorfoze i 12. dana razvile su se nove odrasle mušice koje su počele izlaziti iz čahura. Kako bi utvrdili postoji li različit utjecaj METH-a na spolove kvantificirali smo broj mužjaka i ženki.

Uočili smo trend povećanja broja muških potomaka iz skupine tretirane vMETH u usporedbi s kontrolnim skupinama CTRL i CTRL no bong (Slika 7.A). Drugog dana bio je najveći broj potomaka za vMETH skupinu. Te nešto manji porast petog dana (Slika 7.B).



Slika 7. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na broj muških potomaka. Potomci mužjaka koji su bili izloženi 75 μ g vMETH su prebrojavani svaki dan kroz razdoblje od 10 dana. A) Kumulativni prikaz broja muških potomaka. B) Prikaz broja muških potomaka za pojedinačne dane. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. NZ-nema statističke značajnosti.

U broju ženskih potomaka također je vidljiv trend povećanog broja između tretirane skupine vMETH i kontrolnih skupina CTRL i CTRL no bong, no razlike nisu statistički značajne (Slika 8.A). Slično kao i kod mužjaka, najveći broj ženskih potomaka bio je drugog dana brojanja za vMETH skupinu. Na petom danu je također vidljiv manji porast za vMETH skupinu (Slika 8.B).

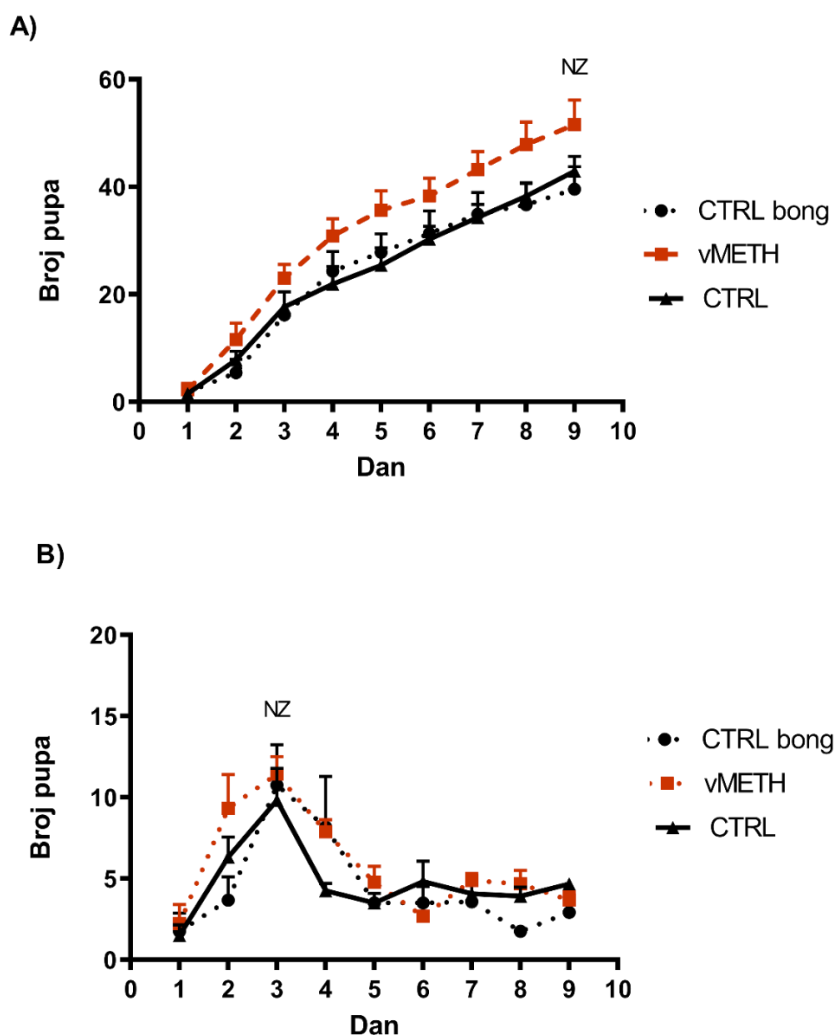


Slika 8. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na broj ženskih potomaka. Potomci mužjaka koji su bili izloženi 75 μ g vMETH su prebrojavani svaki dan kroz razdoblje od 10 dana. A) Kumulativni prikaz broja ženskih potomaka. B) Prikaz broja ženskih potomaka za pojedinačne dane. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. NZ-nema statističke značajnosti.

4.2. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na razvojni ciklus u 2. generaciji

Kako bi se ispitalo postoji li utjecaj vMETH-a nulte generacije na drugu generaciju, nasumično je izdvojeno 3 mužjaka i 3 ženke iz svih skupina prve generacije te je ponovno praćen razvojni ciklus. Kao i u prvoj generaciji, prva čahura se pojavila osmi dan pokusa.

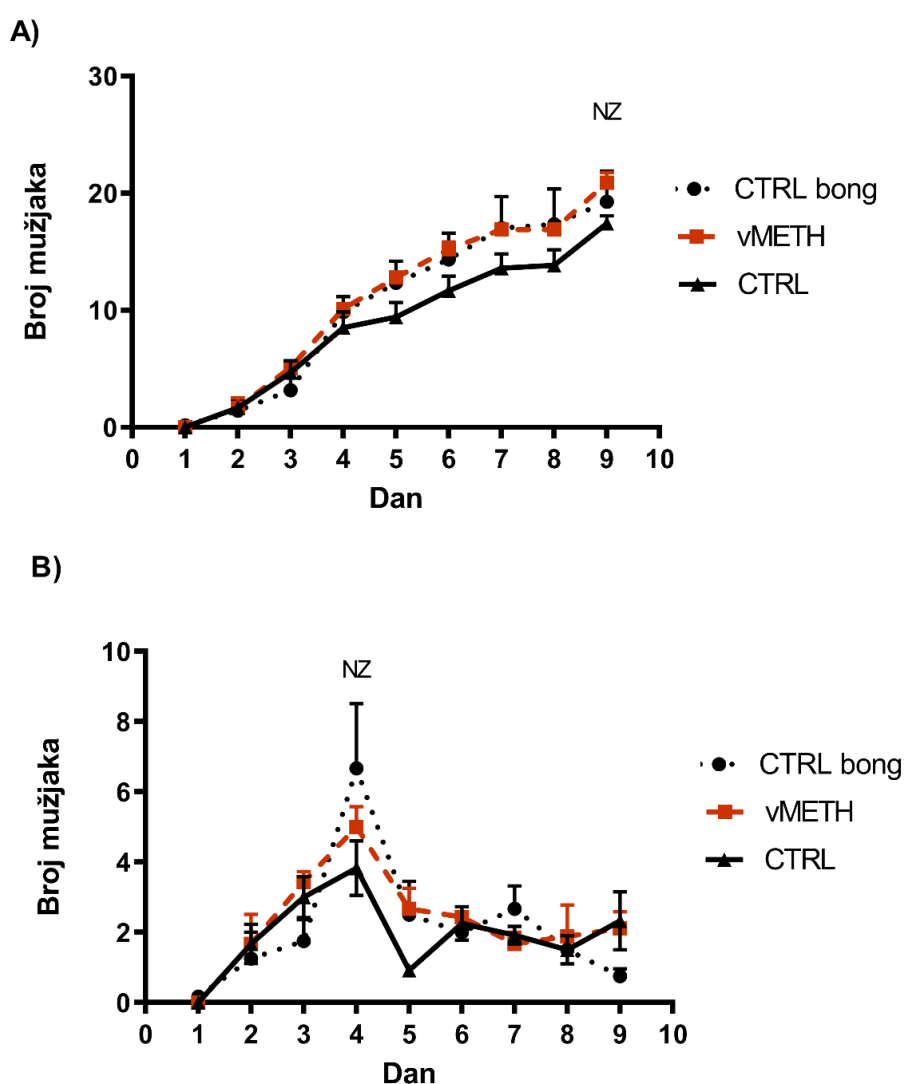
U drugoj generaciji je također uočen trend povećanog broja čahura vMETH skupine naspram kontrolnih skupina CTRL i CTRL no bong (Slika 9.A). Najveći broj čahura je trećeg dana za sve tri skupine (Slika 9.B).



Slika 9. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na broj čahura druge generacije. Čahure su prebrojavane svaki dan kroz razdoblje od 10 dana. **A)** Kumulativni prikaz broja čahura. **B)** Prikaz broja čahura za pojedinačne dane. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. NZ-nema statističke značajnosti.

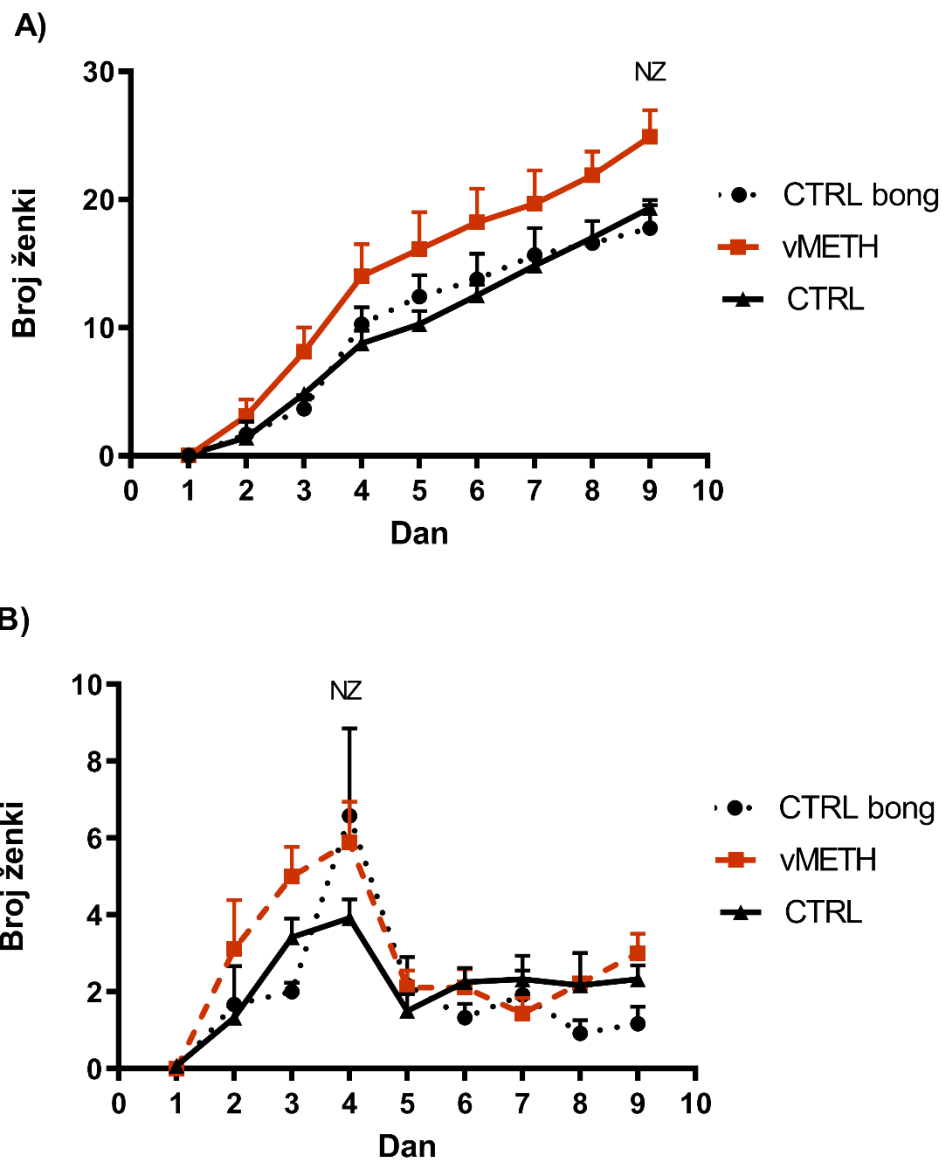
Mušice su počele izlaziti iz čahura dvanaestog dana pokusa. Prebrojavane su svaki dan te su razdvajani mužjaci i ženke. Dobiveni rezultati nisu pokazali utjecaj vMETH-a na muške potomke druge generacije.

Uspoređujući sve tri skupine, nije uočena statistički značajna razlika niti trend povećanog broja muških potomaka vMETH skupine (Slika 10.A). Najveći broj potomaka nalazi se na četvrtom danu brojanja za sve tri skupine (Slika 10.B).



Slika 10. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na broj muških potomaka druge generacije. Potomci su prebrojavani svaki dan kroz razdoblje od 10 dana. **A)** Kumulativni prikaz broja muških potomaka. **B)** Prikaz broja muških potomaka za pojedinačne dane. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. NZ-nema statističke značajnosti.

Za razliku od muških potomaka, vMETH pokazuje efekt na drugu generaciju ženskih potomaka. Ponovno je vidljiv trend povećanja broja potomaka vMETH skupine u usporedbi s CTRL i CTRL no bong skupinama (Slika 11.A). Najveći broj ženskih potomaka, za sve skupine, je na četvrtom danu pokusa (Slika 11.B).



Slika 11. Utjecaj izlaganja mužjaka vMETH-u na broj ženskih potomaka druge generacije. Potomci su prebrojavani svaki dan kroz razdoblje od 10 dana. **A)** Kumulativni prikaz broja ženskih potomaka. **B)** Prikaz broja ženskih potomaka za pojedinačne dane. Rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. NZ-nema statističke značajnosti.

5. Rasprava

Cilj ovog pokusa bio je ispitati utjecaj vMETH-a na razvojni ciklus vinske mušice. Pretpostavljeno je da bi METH mogao ubrzati razvojni ciklus te utjecati na broj potomaka. Dobiveni rezultati nisu prikazali ubrzanje razvojnog ciklusa, ali je uočen trend povećanog broja čahura i potomaka u pokusnoj skupini vMETH naspram kontrolnih skupina CTRL i CTRL no bong. U prvog generaciji je vidljiv trend povećanog broja potomaka vMETH skupine u oba spola potomaka, dok se u drugoj generaciji svojstvo povećanog broja muških potomaka gubi. Efekt povećanog broja ženskih potomaka vMETH skupine u drugoj generaciji je i dalje prisutan. Zbog malog broja uzoraka i ponavljanja nije bilo opravdano koristiti statističke testove, te ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima. Stoga se govori o vidljivom trendu povećanog broja čahura i potomaka. Uočili smo mogući utjecaj METH-a prenio na drugu generaciju, ali samo po ženskoj liniji. Prema tome jedna doza METH-a, dana mužjacima vinske mušice prije parenja, postiže potencijalni multigeneracijski i transgeneracijski utjecaj.

Ovisnosti su nasljedni poremećaji gdje procjena nasljednosti može varirati čak do 72%. Nekoliko različitih istraživanja povezano je očevu ovisnost s ovisnosti njihovih potomaka [22]. Međutim još uvijek nije potpuno jasno na koje sve točno načine se mogu nasljeđivati fenotipovi povezani s konzumacijom droge poput METH-a. U ovom pokusu METH je pokazao potencijalni multigeneracijski i transgeneracijski utjecaj. Prema pregledanoj literaturi i rezultatima ovog pokusa, epigenetsko transgeneracijsko nasljeđivanje bi se moglo navesti kao jedan od mogućih mehanizama nasljeđivanja. Epigenetsko transgeneracijsko nasljeđivanje definirano je kao "nasljeđivanje epigenetskih informacija između generacija posredovano zametnom linijom u odsutnosti izravnih utjecaja okoline koje dovodi do fenotipske varijacije" [23]. Posljedice koje se mogu pojaviti u budućim generacijama su promjene u ponašanju, biokemijske ili fiziološke disfunkcije [8].

Istraživanja transgeneracijskih i multigeneracijskih utjecaja psihostimulansa na štakorima su također ukazala na mogućnost epigenetskog nasljeđivanja. Proveden je pokus koji je pokazao da izloženost očeva F0 generacije kokainu ukazuju na promjene u ponašanju F1 potomaka. Rezultati su također ukazali na različito nasljeđivanje između muških i ženskih potomaka. Tako su F1 muški potomci pokazali smanjenu preferenciju prema kokainu, dok ženski F1 potomci nisu [8]. Nekoliko fizioloških razlika moglo bi biti u pozadini različitih reakcija na kokain između mužjaka i ženki štakora. Naime, mužjaci izlučuju testosteron tijekom kasne gestacije i ranih neonatalnih razdoblja, što rezultira spolno dimorfnim karakteristikama u reproduktivnoj endokrinologiji, moždanoj jezgri i osobinama ponašanja odraslih jedinki. Ciklus gonadnih hormona kod ženki štakora također može igrati ulogu u tome da estrogen pojačava učinke kokaina, dok progesteron ima suprotan učinak.

Utjecaj kokaina na transkripciju gena i naknadni hormonalni utjecaji vjerojatno doprinose fenotipovima različitog ponašanja mužjaka i ženki štakora. Istraživanja ukazuju na to da spermatozoidi nisu samo pasivni nositelji očevog genoma s malim epigenetskim utjecajem na potomstvo. Spermatozoidni histoni visoko su acetilirani i ti se epigenetski tragovi prenose u oocite gdje utječu na početak zigotske ekspresije gena i reguliraju ekspresiju gena tijekom rane embriogeneze. Stoga, kokainom izazvane promjene u acetilaciji histona sperme predstavljaju vjerojatan mehanizam za međugeneracijsko nasljeđivanje promatranog fenotipa otpornosti na kokain [24]. Ovakvi rezultati ukazuju da izloženost oca psihostimulansima rezultira epigenetskim modifikacijama na zametnoj liniji, što utječe na gensku ekspresiju te se fenotip može različito očitovati u spolovima potomaka.

Prema glavnim rezultatima pokusa može se primijetiti kako je efekt METH-a vidljiv u oba spola F1 generacije, dok se u F2 generaciji očituje samo na ženskim potomcima. Obzirom na epigenetske transgeneracijske mehanizme nasljeđivanja, mogli bismo postaviti hipotezu o utjecaju epigenetskih modifikacija na očeve autosomne i spolne kromosome. Takva kombinacija epigenetskih modifikacija bi mogla objasniti izgubljen utjecaj METH-a na muškim potomcima druge generacije, ako pretpostavimo da se epigenetska modifikacija pojavila samo na očevom X kromosomu. Hipoteza postavljena na taj način bi potencijalno mogla objasniti zašto je efekt METH-a vidljiv na samo jednom spolu druge generacije. Za daljnje istraživanje ovog svojstva moglo bi se postaviti pitanje koliko je reverzibilna ili ireverzibilna takva epigenetska modifikacija te do koje generacije može perzistirati. Još jedno moguće objašnjenje različite ekspresije fenotipa između muških i ženskih potomaka su funkcionalne i morfološke razlike u endokrinom sustavu *Drosophila melanogaster* [25]. U istraživanjima provedenim na sisavcima, pokazano je kako muški i ženski spolni hormoni postižu različit utjecaj na djelovanje psihostimulansa u roditelja te se prema tome ispoljavaju različiti fenotipovi kod potomaka [24].

Provedeni pokusi su pokazali preliminarne rezultate, ali zbog malog broja ispitivanih uzoraka i ponavljanja nema statistički značajnih razlika, iako smo uočili određene trendove. Stoga je u budućnosti potrebno ponoviti pokuse s naglaskom na određene metodološke modifikacije. Prvo, potrebno je koristiti veći broj uzoraka u pokusu, te napraviti veći broj ponavljanja kako bi se u idućim pokusima mogla uočiti statistička značajnost. Drugo, problem koji je bio prisutan je velik broj čahura i potomaka što je moglo rezultirati u nepreciznosti tijekom prebrojavanja. Uzorci su sadržavali 5 mužjaka i 10 djevoja koje su stavljeni na parenje tijekom 3 dana. Treće, problem koji se javljao tijekom parenja je pomor djevoja u većini tubica te kompletan pomor mušica u pojedinim tubicama. Zbog velikog broja roditelja bilo je problematično zamijetiti u kojem točno trenutku je došlo do pomora i koji broj mušica je bio zahvaćen. Kako bi se olakšalo praćenje

procesa parenja i razvojnog ciklusa, vrijeme parenja trebalo bi se skratiti na 24 sata te staviti jedan par roditelja. Nakon izbacivanja roditelja bilo bi potrebno prebrojati položene embrije. Prema tome bi se moglo usporediti broj embrija koji je bio položen s ukupnim brojem odraslih jedinki, što bi dalo podatak o postotku preživljenja tijekom razvojnih faza.

Za daljnja istraživanja bilo bi zanimljivo ispitati dolazi li do epigenetskih modifikacija i gdje se one pojavljuju tijekom izlaganja mužjaka METH-u. Također bi bilo potrebno istražiti utječe li METH na duljinu i kvalitetu života idućih generacija, te napraviti pokus preživljenja potomaka čiji je roditelj bio izložen METH-u. Još jedan pokus koji bi pomogao u boljem razumijevanju transgeneracijskog nasljeđivanja, je ispitati do koje generacije se prenosi određeno svojstvo i perzistira li ta osobina u nasljeđivanju ili je takva promjena na genomu reverzibilna.

6. Zaključak

Ideja o utjecaju roditeljske izloženosti drogama na razvojni ciklus potomaka nije nova. Izuzetan naglasak je stavljan na štetne utjecaje majčinske izloženosti drogama, pogotovo tijekom razdoblja trudnoće. Međutim, nekoliko studija je pokazalo kako očeva izloženost drogama rezultira u promjenama na razini epigenoma. Takve promjene posljedično ostvaruju prijenos štetnih fenotipova na potomke. Stoga je ključno produbiti razumijevanje epigenetskih modifikacija na genomu, kako bi se identificirali potencijalni mehanizmi multigeneracijskog i transgeneracijskog nasljeđivanja.

Za potrebe ovog pokusa koristili smo mužjake *Drosophila melanogaster*, kojima smo administrirali vMETH pomoću *FlyBong* metode. Nakon izlaganja mužjaka psihostimulansu, stavili smo ih na parenje s ženkama djevicama u kultivacijske tubice. Pratili smo utjecaj METH-a na dvije generacije. Vršili smo svakodnevna promatranja razvojnog ciklusa vinske mušice te smo bilježili i kvantificirali svaku promjenu.

Rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku između pokusne skupine i kontrolnih skupina zbog malog broja uzoraka. Međutim uočen je trend povećanog broja čahura i potomaka F1 generacije vMETH skupine. U drugoj generaciji, trend povećanog broja čahura i jedinki očitovan je samo u ženskih potomaka vMETH skupine. Prema tome, možemo govoriti o trendu koji ukazuje na mogući utjecaj METH-a na razvojni ciklus *Drosophila melanogaster*.

Ovi preliminarni rezultati ukazuju da čak i ako se inducirajući podražaj ukloni, epigenetski transgeneracijski fenotip se i dalje može prenijeti. Zabilježeno je nekoliko slučajeva transgeneracijskog nasljeđivanja kod izloženosti drogama. Međutim, postoji manjak studija koje ispituju transgeneracijsko nasljeđivanje fenotipova nakon izloženosti drogama F0 očeva. Stoga bi buduće studije trebale biti usmjerene na identifikaciju

funkcionalnih epigenetskih modifikacija u somatskim i zametnim stanicama F0, F1 i F2 generacije, koje nastaju nakon izloženosti F0 generacije.

Literatura

1. Thomas Flatt. Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2020 Jan;214(1):3-48.
2. Alfonso Martinez Arias. *Drosophila melanogaster* and the Development of Biology in the 20th Century. *Methods Mol Biol.* 2008;420:1-25.
3. Rozi Andretić Waldowski. *Drosophila melanogaster* modelni organizam za bazična i medicinska istraživanja. Istraživanja na modelima laboratorijskih životinja/Rukavina Danijel;Pavelić Krešimir (ur.). Zagreb: HAZU, 2017. str. 95-105
4. Musiceunastavi.wordpress.com [Internet]. Dostupno na: <https://musiceunastavi.wordpress.com/zasto-musica/>
5. Yamamoto S, Seto ES. Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Exp Anim.* 2014;63(2):107-19.
6. Greer CL, Grygoruk A, Patton DE, Ley B, Romero-Calderon R, Chang H-Y, et al. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *J Neurobiol.* 05. rujan 2005.;64(3):239–58.
7. Richard B Rothman, Michael H Baumann. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol.* 2003 Oct 31;479(1-3):23-40
8. Nicole L. Yohn, Marisa S. Bartolomei, Julie A. Blendy. Multigenerational and Transgenerational Inheritance of Drug Exposure: The effects of alcohol, opiates, cocaine, marijuana, and nicotine. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015 Jul; 118(0): 21–33.
9. Mark A. Hanson and Michael K. Skinner. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environ Epigenet.* 2016 Jan; 2(1): dvw002.
- 10.Vardhman Rakyan and Emma Whitelaw. Transgenerational epigenetic inheritance. *Curr Biol.* 2003 Jan 8;13(1):R6.

11. David A Nielsen, Amol Utrankar, Jennifer A Reyes, Daniel D Simons & Thomas R Kosten. Epigenetics of drug abuse: predisposition or response. *Pharmacogenomics*. 2012 Jul; 13(10): 1149–1160.
12. Virginia Hughes. Epigenetics: The sins of the father. *Nature*. 2014 Mar 6;507(7490):22-4.
13. Michael K. Skinner. What is an epigenetic transgenerational phenotype?: F3 or F2. *Reprod Toxicol*. 2008 Jan; 25(1): 2–6.
14. Robison, A., Nestler, E. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12, 623–637 (2011).
15. Emiliana Borrelli, Eric J. Nestler, C. David Allis, Paolo Sassone-Corsi. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. *Neuron*, Volume 60, Issue 6, 2008, Pages 961-974, ISSN 0896-6273.
16. Cruickshank CC and Dyer KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction* 104:1085–1099.
17. Douglas R Miller, Mengfei Bu, Adithya Gopinath, Luis R Martinez, Habibeh Khoshbouei. Methamphetamine Dysregulation of the Central Nervous System and Peripheral Immunity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2021 Dec;379(3):372-385.
18. Jian Feng, Eric J Nestler. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology*. Volume 23, Issue 4, 2013, Pages 521-528, ISSN 0959-4388.
19. Diana Dow-Edwards. Translational issues for prenatal cocaine studies and the role of environment. *Neurotoxicol Teratol*. Jan-Feb 2011;33(1):9-16.
20. Fang He, Irina A. Lidow, Michael S. Lidow. Consequences of paternal cocaine exposure in mice. *Neurotoxicol Teratol*. Mar-Apr 2006;28(2):198-209.
21. Ana Filošević Vujnović. Behavioral and genetic characteristics of psychostimulant-induced neuronal plasticity in *Drosophila melanogaster*. Rijeka: Odjel za biotehnologiju, 2018., PhD thesis.
22. Lisa R. Goldberg and Thomas J. Gould. Multigenerational and transgenerational effects of paternal exposure to drugs of abuse on behavioral and neural function. *Eur J Neurosci*. 2019 Aug;50(3):2453-2466.
23. Michael K. Skinner. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*. 2011 Jul; 6(7): 838–842.

24. Fair M Vassoler, Samantha L White, Heath D Schmidt, Ghazaleh Sadri-Vakili & R Christopher Pierce. Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. Nat Neurosci. 2013 Jan; 16(1): 42–47.

25. Matthew Meiselman, Sang Soo Lee, Raymond-Tan Tran, Hongjiu Dai, Yike Ding, Crisalejandra Rivera-Perez et al. Endocrine network essential for reproductive success in Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci USA. 2017 May 9; 114(19): E3849-E3858.

Životopis

Osobne informacije

Ime i prezime:	Ante Maslač
Datum rođenja:	22.5.2000.
e-mail:	ante.maslac2205@gmail.com

Obrazovanje

2019. - danas	Preddiplomski studij "Biotehnologija i istraživanje lijekova", Sveučilište u Rijeci
2015.- 2019.	Zdravstveno učilište Zagreb

Osobne vještine i kompetencije

- Iskustvo u radu s ljudima
- Organizacijske vještine stečene organizacijom različitih društveno-korisnih projekata
- Izražene komunikacijske i prezentacijske vještine

Jezične vještine

- MATERINSKI JEZIK: hrvatski
- Engleski: Slušanje C1; Čitanje C1; Govorna Produkcija C1; Govorna Interakcija C1; Pisanje C1

Digitalne vještine

- Korištenje MS Office paketa
- Pretraživanje baza znanstvenih radova

Vozačka dozvola

- B

Radno iskustvo

- Stručna praksa u laboratorijima In vitro farmakologije u Fidelti
- Promotor prodaje za Huawei technologies
- Učenička praksa u ljekarnama Tripolski

- Ostali studentski i učenički poslovi (ugostiteljstvo, maloprodaja, promocije i sl.)

Volontiranje:

- Predsjednik Studentskog zbora Odjela za biotehnologiju
- Član Povjerenstva za nastavu Odjela za biotehnologiju
- Član Odjelskog vijeća
- Zamjenik studentskog predstavnika za Skupštinu Studentskog zbora Sveučilišta u Rijeci
- Volontiranje u sklopu projekata Udruge studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (Putujući znanstvenici, Časopis Biotech, Konferencija budućnost i perspektiva, Otvoreni sportski dan, Simpozij studenata biotehnologije 'PosteRi' i sl.)
- Suvoditelj projekta Konferencija budućnost i perspektiva (akademske godine 2020.-2021.; 2021-2022.)
- Voditelj projekta Simpozij studenata biotehnologije 'PosteRi' (akademska godina 2021.-2022.)