Povezanost dva oblika ponašanja inducirana metamfetaminom u Drosophili melanogaster : samoadministracije i lokomotorne senzitizacije

Osredečki, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:577736

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

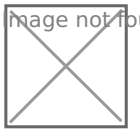


Repository / Repozitorij:

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“

Mia Osredečki

Povezanost dva oblika ponašanja inducirana metamfetaminom u *Drosophili melanogaster* : samoadministracije i lokomotorne senzitizacije

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Mia Osredečki

Povezanost dva oblika ponašanja inducirana metamfetaminom u *Drosophili melanogaster* : samoadministracije i lokomotorne senzitizacije

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada : doc.dr.sc. Rozi Andretić Waldowski

Završni rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom :

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima __ stranica, __ slika i __ literaturnih navoda.

SAŽETAK

Ovisnost o drogama definira se kao kompulzivno uzimanje droge s gubitkom kontrole u ograničavanju unosa. To je kompleksna bolest koju karakteriziraju različiti kognitivni, bihevioralni i fiziološki simptomi koji nastaju kao posljedica opetovane konzumacije droge. Zbog svoje kompleksnosti, ovisnost se u laboratoriju istražuje ispitivanjem jednostavnih ponašanja koja su karakteristična - npr. samoadministracija i lokomotorna senzitizacija. Za laboratorijska istraživanja neophodno je imati životinjske modele, a zbog genetičkih sličnosti između ljudi i životinja te brzog i jeftinog uzgoja, *Drosophila melanogaster* je vrlo često korišten životinjski model.

Cilj našeg istraživanja bio je ispitati postoji li korelacija između dva oblika ponašanja karakteristična za ovisnost da bismo saznali postoje li dijelovi mozga koji zajednički utječu na njihovu regulaciju. Preferencijalna konzumacija droge je oblik ponašanja u kojem jedinke svjesno i aktivno biraju hranu s dodatkom droge naspram one bez droge, a lokomotornu senzitizaciju definiramo kao povećanu lokomotornu aktivnost nakon administracije droge. Preferencijalna konzumacija metamfetamina ispitivana je pokusom samoadministracije (FlyCafe metodom), a lokomotorna senzitizacija ispitivana je FlyBong metodom. Mušice aktivno preferiraju hranu s dodatkom metamfetamina, unatoč gorkom okusu te povećavaju lokomotornu aktivnost uslijed opetovane administracije metamfetamina.

Rezultati ukazuju na to da postoji korelacija između ta dva oblika ponašanja, što otvara mogućnost novih istraživanja kako bi se ta korelacija bolje definirala i kako bi se potencijalno otkrili zajednički neuralni mehanizmi koji upravljaju tim ponašanjima.

Ključne riječi : ovisnost, samoadministracija, lokomotorna senzitizacija, *Drosophila melanogaster*

SUMMARY

Drug addiction is defined as compulsive drug use with a loss of control in restricting intake. It is a complex disease characterized by various cognitive, behavioral and physiological symptoms that result from repeated drug use. Due to its complexity, addiction is explored in the laboratory by examining the simple behaviors that are characteristic - for example self – administration and locomotor senzitization. For laboratory research it is necessary to have animal models, and because of genetic similarities between humans and animals and also fast and cheap cultivation, *Drosophila melanogaster* is a very often used animal model.

The goal of our study was to examine whether there is a correlation between two addictive behaviors to find out whether there are parts of brain that affect together on their regulation. Preferential drug consumption is a form of behavior in which species consciously and actively choose foods with drug additions versus those without drugs, and locomotor sensitization is increased locomotor activity after drug administration. The preferential consumption of methamphetamine was investigated by the self-administration experiment (FlyCafe method), and locomotor sensitization was investigated by the FlyBong method. Flies actively prefer methamphetamine-supplemented foods despite their bitter taste and increase locomotor activity due to repeated administration of methamphetamine.

The results indicate that there is correlation between the two types of behaviors, which opens up the possibility of new research to better define this correlation and to potentially reveal common neural mechanisms that govern these behaviors.

Keywords: addiction, self-administration, locomotor sensitization, Drosophila melanogaster

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Ovisnost i mehanizmi ovisnosti 1

1.1.1. Mehanizam djelovanja metamfetamina 1

1.2. Samoadministracija 3

1.3. Bihevioralna senzitizacija 3

1.4. Drosophila melanogaster kao modelni organizam za istraživanja u neuroznanosti ...4

1.5. Potencijalna povezanost samoadministracije i bihevioralne senzitizacije 5

2.CILJ RADA 6

3. MATERIJALI I METODE 6

3.1. Uzgoj mušica.....6

3.2. Kemikalije 7

3.3. Eksperimentalni dizajn 7

3.4. FlyCafe 7

3.5. FlyBong 8

3.6. Statistička obrada rezultata 9

4. REZULTATI 9

4.1. Utjecaj samoadministracije na lokomotornu senzitizaciju 9

4.1.1. FlyCafe 9

4.1.2. FlyBong 13

4.2. Utjecaj lokomotorne senzitizacije na samoadministraciju.....15

4.2.1. FlyBong 15

4.2.2. FlyCafe 16

5. RASPRAVA 18

6. ZAKLJUČAK 21

7. LITERATURA 22

8. ŽIVOTOPIS 24

1. UVOD

1.1. Ovisnost i mehanizmi ovisnosti

Ovisnost o drogama definirana je kao kompulzivno uzimanje droge s gubitkom kontrole u ograničavanju unosa. Definira se kao skup kognitivnih, bihevioralnih i fizioloških simptoma kao posljedice stalne uporabe tvari (1). Tri su glavna obrasca ponašanja karakteristična za ovisnost ; prisila za traženjem i uzimanjem droge, gubitak kontrole pri ograničavanju unosa i pojava negativnog emocionalnog stanja kada se spriječi pristup lijeku (npr. anksioznost, razdražljivost) (2). Ovisnost se smatra kroničnim poremećajem jer rizik od recidiva ostaje visok čak i nakon završetka liječenja i dugotrajne apstinencije(1) . Recidiv je pojam koji označava ponovnu pojavu bolesti, a očituje se kao povećana želja za drogom nakon apstinencije.

U istraživanjima ovisnosti na životinjskim modelima dokazano je da nastaju promjene u strukturi neurotransmiterskih sustava. Te promjene mogu biti temelj za osjećaje nagrade i motivacije koji se vežu uz konzumaciju droga, a promjene u signalizaciji posredovanoj neurotransmiterima i regulaciji transkripcijskih faktora smatraju se uzrokom pojave recidiva. Ponavljano i učestalo izlaganje drogama stvara određene trajne promjene u mozgu, od kojih neke dovode do razvoja ovisnosti o drogama. Važan cilj istraživanja ovisnosti je identificirati neuralne mehanizme koji su vezani uz pojavu zlouporabe droga, kako bi se na osnovu toga mogle definirati strategije liječenja ovisnosti (2).

1.1.1. Mehanizam djelovanja metamfetamina

Metamfetamin je kemijski srodnik amfetamina. Ima jači i brži učinak od amfetamina, a upotrebljava se u medicinske svrhe za liječenje prekomjerne tjelesne težine, ADHD –

a, narkolepsije, ali se i zloupotrebljava zbog svog psihostimulativnog djelovanja. Djeluje na način da povećava razinu monoaminskih neurotransmitera : dopamina, norepinefrina i serotonina, tako da potiče njihovo oslobađanje iz živčanih završetaka. Događa se redistribucija tih neurotransmitera iz sinaptičkih vezikula u citoplazmu neurona, kao i njihov transport kroz plazmatsku membranu u vanstanični prostor pomoću VMAT2 (vezikularnog monoaminskog transportera)(3) .Time se stimuliraju moždane stanice – daje osjećaj budnosti, poboljšava raspoloženje i podiže razina energije. Zbog svoje sposobnosti da ulazi u neurone, metamfetamin može izravno utjecati na vezanje CREB (CAMP response element binding protein) transkripcijski faktor (TF). CREB – TF je transkripcijski faktor koji se u normalnim uvjetima veže za tzv. CAMP response elemente čime se povećava ili smanjuje transkripcija nekog gena. Metamfetamin na taj način može direktno utjecati na regulaciju transkripcije niza gena poput c-fos (protoonkogen), BDNF gena, gena za tirozin hidroksilazu te gene uključene u cirkadijalni ritam sisavaca (PER1 i PER2) (4). Nakon višekratne konzumacije metamfetamin smanjuje oslobađanje dopamina uslijed aktiviranih mehanizama homeostatske regulacije radi čega dolazi do razdražljivosti, nesanice, povišene temperature, grčeva, tremora. Ostale posljedice konzumacije metamfetamina su razvoj tolerancije, agresivnog ponašanja, halucinacija, poremećaja pamćenja i paranoje (5). Metamfetamin također utječe na kardiovaskularni sustav - ubrzava rad srca i povisuje krvni tlak zbog čega pri velikim dozama može uzrokovati smrt (3).

Ovisnost je kompleksna bolest koja se u laboratorijskim istraživanjima ispituje istraživanjem jednostavnih ponašanja koja predstavljaju komponente ovisnosti, kao što je stimulativno djelovanje na motorički sustav ili samovoljna administracija opojne droge. Samoadministracija droge vodi do preferencijalne konzumacije (ponašanja u kojem modeli samovoljno izabiru drogu nad nekom drugom ponuđenom opcijom koja je za njih privlačna, npr. šećer, a lokomotorna senzitizacija je način mjerenja neuroplastičnih promjena koje se događaju uslijed višekratne administracije droge. Te promjene se bilježe kao pojačanje lokomotorne aktivnosti nakon uzastopnih doza droge. Životinjski modeli su neophodni za takve pokuse, a osim štakora koji su najčešće korišteni u laboratorijima, ovisnost se ispituje i na vinskim mušicama.

1.2. Samoadministracija

Samoadministracija u laboratorijskih životinja jedan je od najsličnijih obrazaca ponašanja onima u ljudi pa je zato bitno razviti dobre životinjske modele. Kod pokusa samoadministracije droge na životinjskim modelima, droge mogu biti administrirane intravenski , intramuskularno, inhalacijski i oralno. Intravenska administracija moguća je kod većih životinja, ali kod *Drosophile* se koriste oralna i inhalacijska metoda (1). Najčešća ispitivana supstanca kod svih životinjskih modela je etanol, ali provođena su i istraživanja s kokainom, metamfetaminom i ostalim psihoaktivnim drogama. Samoadministracija, odnosno preferencijalna konzumacija do koje vremenom dolazi je samo jedan od aspekata ovisnosti, ali vrlo bitan za razumijevanje njenih mehanizama.

1.3. Bihevioralna senzitizacija

Senzitizacija je pojačani bihevioralni odgovor na istu koncentraciju stimulansa nakon opetovanog izlaganja tom stimulansu. Bihevioralna senzitizacija je u životinjskih modela definirana pojačanim motoričkim reakcijama koji se javljaju kod opetovane povremene izloženosti određenoj opojnoj drogi, a mjeri se praćenjem motoričke aktivnosti. Brojni faktori kao što su broj tretmana, interval između tretmana, doza, spol, dob i genetika, mogu utjecati na jačinu bihevioralne senzitizacije (6). Bihevioralna senzitizacija do sad je zabilježena kao odgovor na kokain, amfetamin, morfij, etanol, nikotin i THC (Delta – 9 – tetrahidrokanabinol) (7,(8)9, 10, (11). Razvoj bihevioralne senzitizacije može se podijeliti u dvije faze: inicijacija i ekspresija. Inicijacija je neposredni neuronski događaj koji potiče bihevioralnu senzitizaciju, a ekspresija se odnosi na dugoročne posljedice inicijacijskih događaja.Na primjeru životinjskog modela vinske mušice, to bi značilo da opetovana administracija kokaina dovodi do povećanja

lokomotorne aktivnosti (12). Istraživanja su pokazala da i okolišni uvjeti imaju utjecaj na bihevioralnu senzitizaciju. Kod životinja koje su opetovano izložene drogama (kokain, amfetamin, morfij) tijekom faze inicijacije, izražena je snažnija senzitizacija tijekom faze ekspresije ako je okruženje ponovne administracije droge bilo jednako kao i kod prethodne administracije droge (13)(14)

1.4. *Drosophila melanogaster* kao modelni organizam za istraživanja u neuroznanosti

Laboratorijska istraživanja na životinjskim modelima su u znanosti neophodni za razumijevanje procesa koji se događaju na biološkoj, ali i psihološkoj razini pa tako i za ovisnost. Nije uvijek moguće provoditi istraživanja na ljudima zbog velikog rizika, mogućeg ugrožavanja ljudskog života i mnogobrojnih ostalih etičkih razloga . Zbog genetičkih sličnosti između ljudi i životinja, zaključci doneseni na temelju pokusa na životinjama se mogu primijeniti i na bolje razumijevanje istih ili sličnih procesa / situacija kod ljudi. Najčešće korištene životinje u biomedicinskim istraživanjima su miš, štakor, zamorac, kunić, hrčak, ali i veće životinje poput majmuna.

Drosophila melanogaster sve je češće korišten modelni organizam za istraživanja u neuroznanosti. Njezin kratki životni vijek, jednostavan uzgoj, poznati genom, genetička sličnost s čovjekom i jeftino održavanje doprinose praktičnosti korištenja u laboratorijima.

Pokusi za proučavanje zlouporabe tvari na životinjskim modelima uključuju nekontingentnu (eksperimentalnu) i kontingentnu (samostalnu) administraciju tvari. U prvom slučaju životinjski modeli nemaju mogućnost izbora jer način, koncentraciju i količinu administracije kontrolira eksperimentator, a u drugom životinjski modeli imaju izbor. Iako su pokusi s nekontingentnom administracijom lijekova dali mnoštvo

podataka o tome kako opetovana izloženost lijekovima mijenja funkciju neurona, ne daju podatke o tome žele li životinjski modeli konzumirati te tvari unatoč potencijalno negativnim posljedicama. Model pokusa s kontingentnom administracijom droge posebno je koristan za svrhu liječenja ovisnosti - kako bi se spriječio recidiv (6). Iako nijedan životinjski model ovisnosti u potpunosti ne oponaša ljudski, životinjski modeli omogućuju opažanje elemenata procesa ovisnosti o drogama i dobiveni podaci služe kao izvor za razumijevanje molekularnih osnova ovisnosti (2).

1.5. Potencijalna povezanost samoadministracije i biheviоralne senzitizacije

Prethodnim istraživanjima na modelnom organizmu vinske mušice utvrđeno je da preferiraju hranu s dodatkom etanola naspram obične hrane. Privlači ih miris etanola, a okus im je odbojan. Rezultati pokazuju da osim što samoadministriraju etanol i prebrode odbojan okus, nakon razdoblja apstinencije rapidno se vraćaju konzumaciji velike količine etanola (15). Osim preferencijalne konzumacije etanola, rađena su ispitivanja preferencijalne konzumacije kokaina i metamfetamina koja također pokazuju preferenciju mušica prema hrani s dodatkom droge naspram one bez (16).

U jednom od prvih istraživanja lokomotorne aktivnosti na mušicama, mušice su bile izložene kokainu 1 minutu, a nakon toga prebačene u komoru za gledanje gdje su snimane tijekom 5 minuta i potom analizirane. U ovom istraživanju rezultati pokazuju povećanje lokomotorne senzitizacije uslijed administracije droge, ali i veću razinu senzitizacije kod mužjaka nego kod ženki, vjerojatno zbog veće razine estrogena kod ženki (17). Razlika u lokomotornoj senzitizaciji među spolovima vidljiva je i u istraživanju na štakorima(18).

Naše istraživanje temelji se na povezivanju ta dva oblika ponašanja kako bi saznali jesu li povezana nekim zajedničkim elementima u mozgu. Npr. ako samoadministrirani kokain utječe na neki dio mozga, utječe li taj isti dio na neke promjene u lokomotornoj

senzitizaciji. Postoje li neki zajednički mehanizmi između ta dva ponašanja, odnosno postoji li njihov zajednički utjecaj na iste dijelove mozga (12).

2. CILJ RADA

Cilj ovog završnog rada je definirati i ispitati postoji li korelacija između preferencijalne konzumacije droge i lokomotorne senzitizacije na modelnom organizmu *Drosophile melanogaster*. Time bi se ukazalo na postojanje zajedničkih neuralnih mehanizama koji su uključeni u oba oblika modulacije ponašanja izazvanog metamfetaminom. Metode korištene za ispitivanje ove hipoteze su pokus preferencijalne konzumacije (samoadministracije) metamfetamina (FlyCafe) i pokus lokomotorne senzitizacije (FlyBong metoda).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj mušica

Eksperimenti su rađeni na *Drosophila melanogaster* Canton S wild type (wt) mužjacima. Kako bi bili sigurni da su mužjaci stari 3 – 5 dana, boce s mušicama su ispražnjene od odraslih jedinki 3 – 5 dana prije postavljanja eksperimenta. Mužjaci se

od ženki odvajaju nakon omamljivanja ugljičnim dioksidom na propusnoj podlozi koja se nalazi ispod mikroskopa.

3.2. Kemikalije

Za pokus FlyCafe korištena je 100mM otopina saharoze te 0,1 mg/mL metamfetamina sadržanog u 100 mM otopini saharoze. Za FlyBong je korišteno 75μL otopine 10mg/mL metamfetamina u 95% - tnoj otopini etanola.

3.3. Eksperimentalni dizajn

Eksperimenti su provođeni tijekom dva tjedna koji su se razlikovali po redosljedu pokusa FlyCafe i FlyBong. Prvi tjedan je proveden pokus samoadministracije FlyCafe koji je trajao tri dana, a nakon toga kod istih mušica mjerila se lokomotorna senzitizacija korištenjem FlyBong metode (Pokus 1 SA – LS). Drugi tjedan redosljed je promijenjen, tako da se u mušica najprije mjerila lokomotorna senzitizacija, a potom samoadministracija metamfetamina (Pokus 2 LS – SA).

3.4. FlyCafe

Esej za ispitivanje preferencijalne konzumacije droge sastoji se od 4 pločice na koje se postavljaju stakleni štapići unutar kojih će boraviti mušice. Na oba kraja štapića postavljena je pripremljena hrana. Izvagano je 4 g agara u staklenoj čaši i dodano vode do 100 mL. Nakon mućkanja čaša je zagrijana u mikrovalnoj pećnici dok nije nastala prozirna homogena tekućina. Agar je izliven u Petrijevu zdjelicu te ostavljen da se ohladi. Slijedila je priprema štapića u kojima su mušice boravile. Na šuplje staklene

štapiće postavljene su kapice koje služe kao fizička barijera da mušica ne pobjegne, ali i pomažu ostalim dijelovima (kapilarama, komadićima agara koji služe za davanje vlažnosti) da stoje na svom mjestu. Priprema kapica sastoji se od postavljanja tipseva na gumene nastavke, pripreme komadića agara pomoću velikog tipsa, umetanja agara u kapice, izoliranja krajeva kapica pomoću voska kako bi se spriječilo isušivanje agara. Kapice su nataknute na cjevčice s jedne strane, a nakon upuhivanja mušica i s druge.

Priprema kapilara provedena je na sljedeći način : na 3 male Petrijeve zdjelice stavljeno je mineralno ulje, otopina saharoze i otopina saharoze s drogom. Kapilare najprije napunimo mineralnim uljem, svega nekoliko mililitara, a ostatak kapilare napunimo s otopinom saharoze ili otopinom saharoze i droge.Mineralno ulje ne propušta kisik pa se koristi za sprečavanje evaporacije sadržaja kapilara. Izmjerimo visinu stupca hrane u kapilari (bez mineralnog ulja) te ih postavimo u žute nastavke okomito na pločicu. Dio kapilare s mineralnim uljem mora biti okrenut prema gore, a dio s otopinom mora ulaziti u stakleni štapić.

Visina se mjeri svaki dan te se izmjerene kapilare bacaju i zamjenjuju novima kojima se također prije stavljanja izmjeri visina stupca otopine. Promjer (R) jedne kapilare iznosi 0,44 mm pa se volumen otopine u kapilari računa formulom R^2 π*h, gdje je h izmjerena visina stupca. Vrijednost popijenog volumena otopine je potreban za izračunavanje preferencijskog indeksa. Preferencijski indeks (PI) je veličina koja pokazuje preferenciju mušica prema otopini saharoze s drogom spram otopine čiste saharoze. Računa se prema formuli (količina popijene otopine s drogom – količina popijene otopine šećera) / (ukupna količina popijene hrane). Što je preferencijski indeks veći, to su mušice više konzumirale otopinu s drogom nego otopinu čiste saharoze, i obrnuto.

Prikupljeno je oko 50 mužjaka, a 26 ih je potrebno za eksperiment. 6 je kontrolnih mušica koje na obje strane štapića imaju kapilare sa šećerom. 10 ih je sa šećerom na lijevoj i metamfetaminom na desnoj strani, a 10 ih je s metamfetaminom na lijevoj i šećerom na desnoj strani. Takav raspored kapilara bio je potreban kako bismo isključili mogućnost da mušice preferiraju jednu stranu i dobili preferencu mušica prema metamfetaminu. Zadnjih 6 mušica predstavlja kontrolu evaporacije – u tim štapićima se ne nalaze mušice.

3.5. FlyBong

FlyBong platforma se sastoji od dva glavna dijela : dio za administraciju droge i dio koji mjeri lokomotornu aktivnost. Dio za administraciju droge sadrži trogrlu tikvicu volumena 250 mL koja je s jedne strane spojena na zračnu pumpu. Ispod tikvice je postavljena grijaća kapa koja služi zagrijavanju sadržaja tikvice, odnosno isparavanju otopine droge. Kroz srednji čep se u trogrlu tikvicu ispipetira 75μL otopine 10mg/mL metamfetamina u 95% - tnoj otopini etanola. Otopina se stavlja u tikvicu 4 – 6 sati prije administracije droge kako bi etanol evaporirao. Dio koji mjeri lokomotornu aktivnost sastoji se od cijevi koja provodi zrak do tubica s mušicama. Tubice su spojene na DAM4 (Drosophila Activity Monitoring), a u svakoj se nalazi po jedna mušica. Na jednom kraju svake tubice spojene na DAM, nalazi se hrana za mušice.

Metamfetamin je administriran dva puta – u 9 h ujutro i 19h navečer. Na dan eksperimenta tikvice se začepe te se upali grijaća kapa na crvenu tipku u 08:54:55. U 08:58:45 gasi se grijaća kapa i otvara ventil, a zračna pumpa pali se u 08:59:00. U 09:00:00 pumpa se gasi, zatvara se ventil i vadi se čep iz tikvice. Postupak se ponovi jednakim redoslijedom u 18:54:45, 18:58:45, 18:59:00 i 19:00:00 istog dana. Podaci o lokomotornoj aktivnosti mušica prikupljani su od 8 h ujutro do 20 h navečer u intervalima od 1 min. DAM skuplja podatke na način da bilježi broj puta prelazaka sredine cjevčice individualnih mušica.

Iz tih sirovih podataka moguće je analizirati lokomotornu aktivnost mušica individualno i populacijski. U prvom tjednu ispitivanje se vršilo na 26 mušica (jer su mušice prethodno bile izložene samoadministracijskom pokusu), a u drugom na 32 mušice. Za analizu populacije koriste se podaci od 30 minuta prije i 30 minuta nakon administracije droge, a za analizu lokomotorne aktivnosti individualnih mušica računa se prosjek u minuti, mjereno tijekom 5 minuta prije i 5 minuta nakon administracije. Lokomotorna aktivnost mjerena 5 minuta prije administracije droge naziva se bazična lokomotorna aktivnost. Vrijednost bazične lokomotorne aktivnosti uspoređuje se s vrijednošću lokomotorne aktivnosti nakon administracije droge te se zaključuje kakva je promjena, ako ona postoji. Mjera osjetljivosti na metamfetamin je vrijednost koja je dobivena računanjem postotka mušica koje imaju povećanu lokomotornu aktivnost

nakon prve admisnistracije u odnosu na bazičnu lokomotornu aktivnost te nakon druge administracije u odnosu na lokomotornu aktivnost nakon prve administracije.

3.6. Statistička obrada rezultata

Za usporedbu prosječnih volumena popijene tekućine po mušici tijekom uzastopnih dana između različitih grupa korišten je t – test za nezavisne uzorke. Razina statističke značajnosti iznosi $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj samoadministracije na lokomotornu senzitizaciju

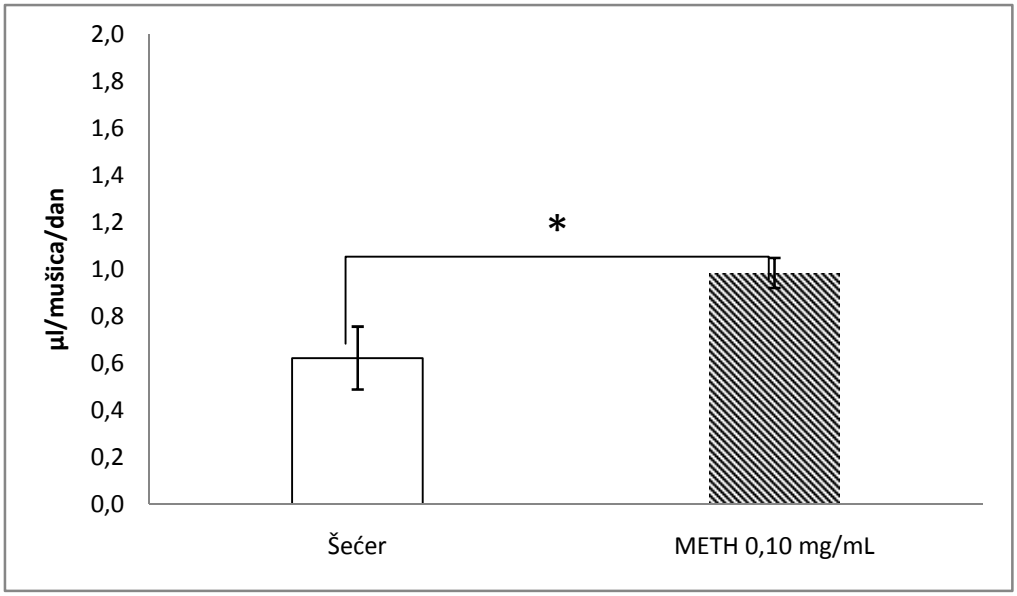
4.1.1. FlyCafe

Mjerenjem količine popijenih otopina u kapilarama željeli smo ispitati preferiraju li vinske mušice hranu obogaćenu metamfetaminom naspram one bez. U pokusu je korištena FlyCafe metoda, a rezultati su prikazani mjerenjem volumena otopine šećera te otopine šećera s dodatkom metamfetamina masene koncentracije 0,10 mg/mL, koje su mušice popile. Za vrijednosti volumena uzete su prosječne količine popijene tekućine po mušici u jednom danu. Statistička značajnost provjerena je t-testom, a vrijednosti $p<0,05$ uzete su kao značajne.

Eksperimentalna skupina mušica (EXP) bila je podijeljena u dvije podskupine. Jedna podskupina imala je ponuđenu otopinu šećera s metamfetaminom s lijeve strane, a običnu otopinu šećera s desne strane. Druga podskupina imala je obrnut raspored. Vidljiva je preferenca mušica prema hrani koja sadrži šećer i metamfetamin – statistički značajna razlika $p = 0,0002$ (Slika 1.).

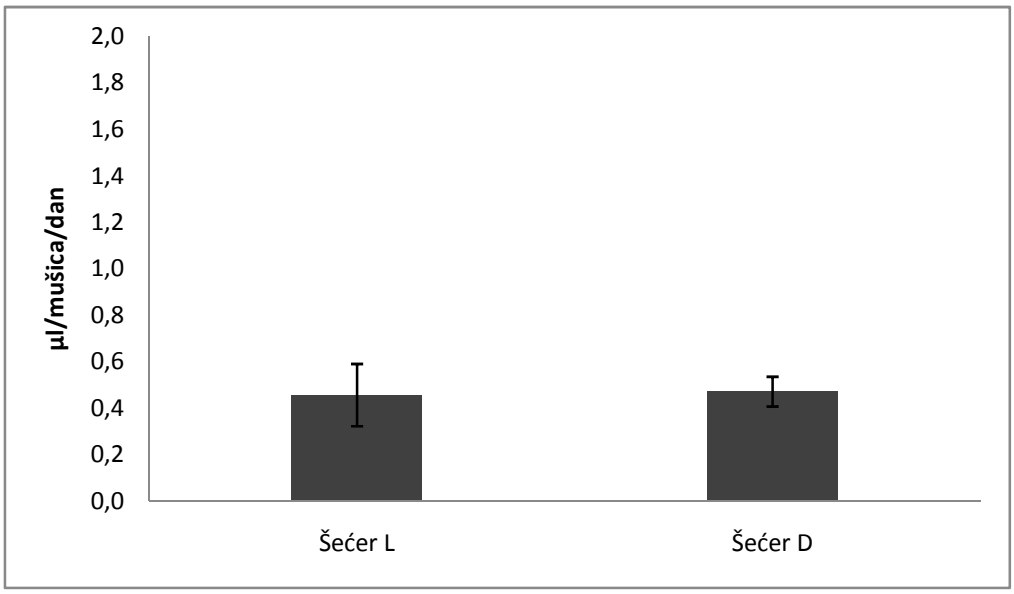
Kontrola za ovaj eksperiment je utvrđivanje preferiraju li mušice jednu stranu više od druge. Ako preferiraju to znači da rezultati koje smo dobili kod eksperimentalne skupine mogu biti lažno pozitivni. Iz tog razloga kontrolna skupina mušica (CTRL) imala je s obje strane ponuđenu otopinu šećera. Utvrđeno je da mušice nemaju preferenciju prema pojedinim kapilarama ukoliko su u svima nalazi čista otopina šećera jer nema statistički značajne razlike (Slika 2.), p=0,924.

Između eksperimentalne i kontrolne skupine mušica postoji statistički značajna razlika u ukupnom volumenu popijenih tekućina. Eksperimentalne mušice su u prosjeku popile veći volumen tekućine u kapilarma od kontrolnih. (Slika 3.), p = 0,008.



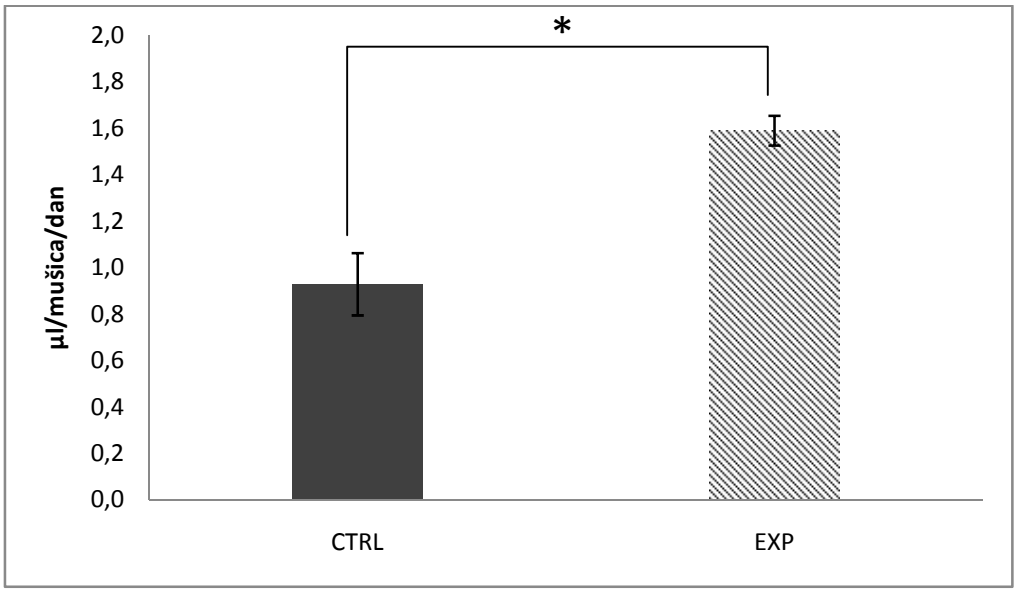
Slika 1. Mušice preferencijalno konzumiraju metamfetamin nad šećerom.

. Prosječni volumen popijene otopine šećera te otopine šećera s metamfetaminom (METH 0,10 mg/mL) mjeren je za pojedinu mušicu tokom 3 dana, n=20. Rezultati kod kojih je $p<0,05$, tj. kod kojih postoji statistički značajna razlika označeni su * na grafovima.



Slika 2. Preferencijalna konzumacija ne ovisi o strani na kojoj se nalazi kapilara.

Mušice ne preferiraju ni lijevu ni desnu stranu kada im je s obje strane ponuđena hrana koja sadrži samo šećer. Prosječni volumen popijene otopine šećera ponuđene s lijeve (Šećer L) i desne (Šećer D) strane mjeren je za pojedinu mušicu tokom 3 dana, n=6.



Slika 3. Mušice koje konzumiraju metamfetamin ukupno piju veću količinu tekućine od onih koje ne konzumiraju metamfetamin. Eksperimentalnoj skupini mušica (EXP) ponuđen je izbor između hrane koja sadrži samo šećer te hrane koja sadrži šećer i metamfetamin. Kontrolna skupina mušica (CTRL) imala je ponuđenu samo otopinu šećera .Prosječni volumen ukupno popijenih otopina mjeren je za pojedinu mušicu tokom 3 dana. Za eksperimentalnu skupinu (EXP) broj mušica n=20, a za kontrolnu skupinu (CTRL) broj mušica n=6.

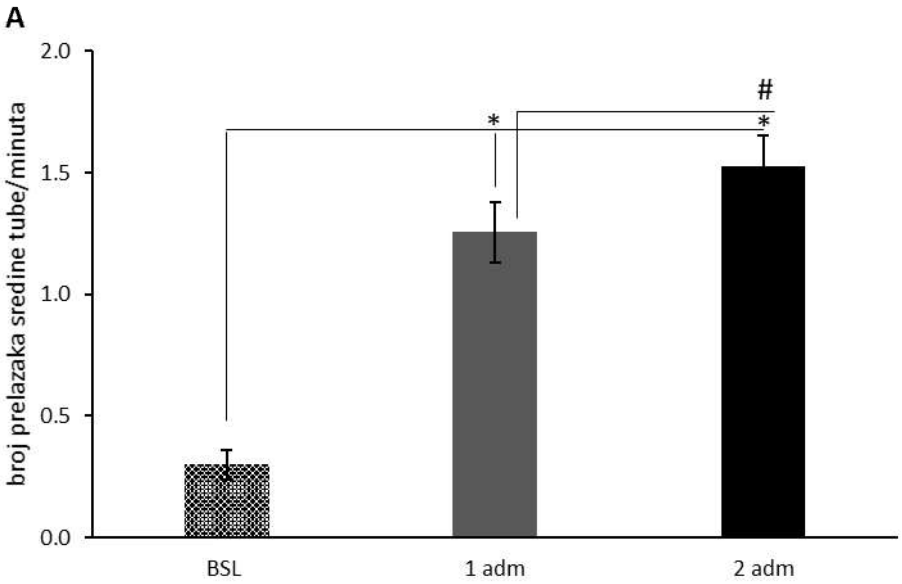
4.1.2. FlyBong

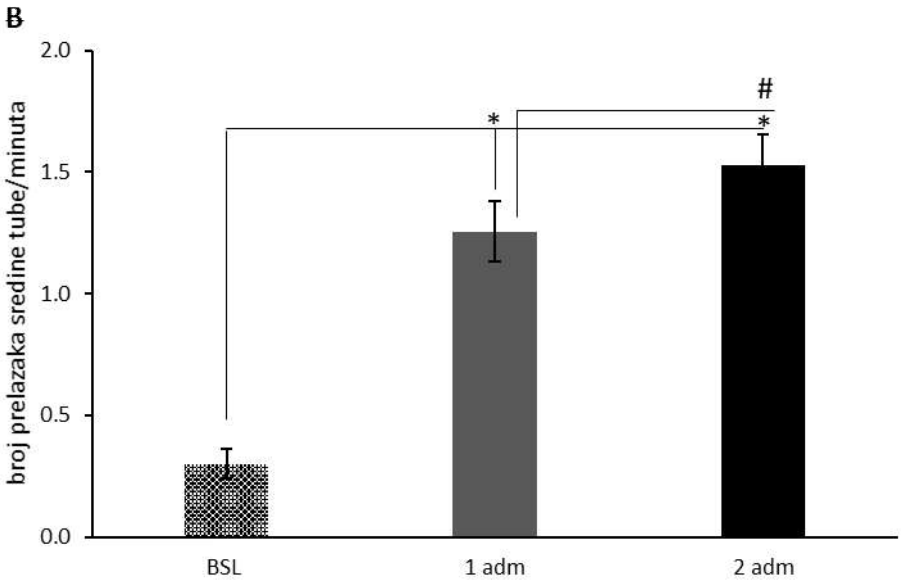
Brojanjem prelazaka sredine tube 30 minuta prije (BSL – bazična lokomotorna aktivnost), 30 minuta nakon prve administracije (1 adm) i 30 minuta nakon druge administracije (2 adm) nakon što su mušice izložene 75 μg METH-HCl u volatiziranom obliku željeli smo ispitati lokomotornu senzitizaciju mušica. Statistička značajnost izračunata je t-testom između BSL (vremenski interval od 30 minuta prije administracije METH – HCl) i 1 adm (prve administracije METH – HCl), te statistička razlika između 1 adm i 2 adm.

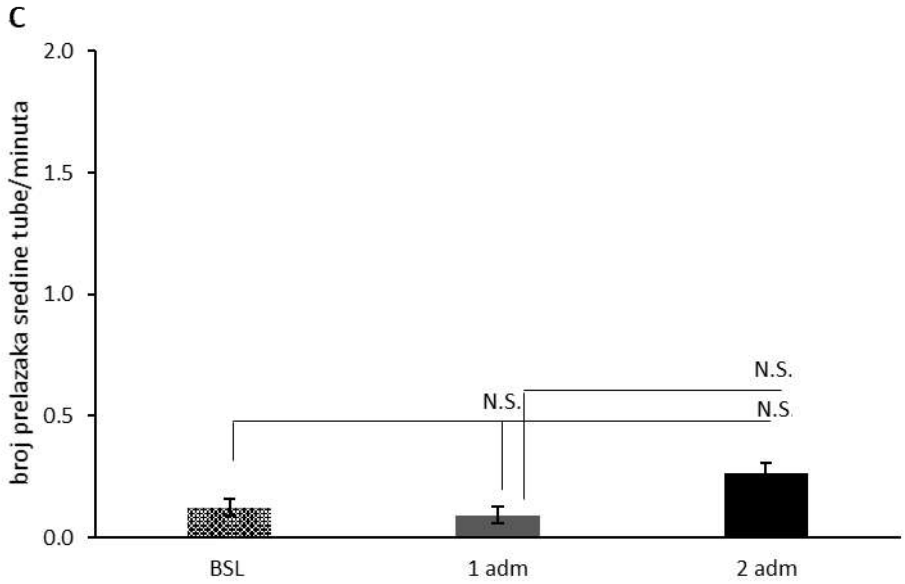
Kontrolne mušice koje prethodno nisu sudjelovale u FlyCafe pokusu pokazale su fenotip lokomotorne senzitizacije jer se broj prelazaka sredine tube po minuti povećavao administracijom droge. Postoji statistički značajna razlika između lokomotorne aktivnosti prije i nakon administracije te i između prve i druge administracije droge. (Slika 4.A)

Drugu skupinu kontrolnih mušica predstavljale su mušice koje su prethodno sudjelovale u FlyCafe pokusu i imale i s jedne i s druge strane ponuđene kapilare s običnom otopinom šećera. Postoji statistički značajna razlika između lokomotorne aktivnosti prije i nakon administracije, kao i između prve i druge administracije droge. (Slika 4.B) Uspoređujući obje kontrolne skupine vidljivo je da se lokomotorna senzitizacija povećava administracijom droge i da boravak mušica u tubicama ne utječe na lokomotornu senzitizaciju.

Eksperimentalna skupina mušica koje su prethodno sudjelovale u FlyCafe pokusu gdje su s jedne strane imale ponuđenu otopinu šećera, a s druge otopinu šećera s metamfetaminom ne pokazuju fenotip lokomotorne senzitizacije (Slika 4. C). Ne postoji statistički značajna razlika u lokomotornoj aktivnosti prije i nakon administracija droge, $p > 0,05$.


A
broj prelazaka sredine tube/minuta
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
#
BSL
1 adm
2 adm


B
broj prelazaka sredine tube/minuta
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
#
BSL
1 adm
2 adm



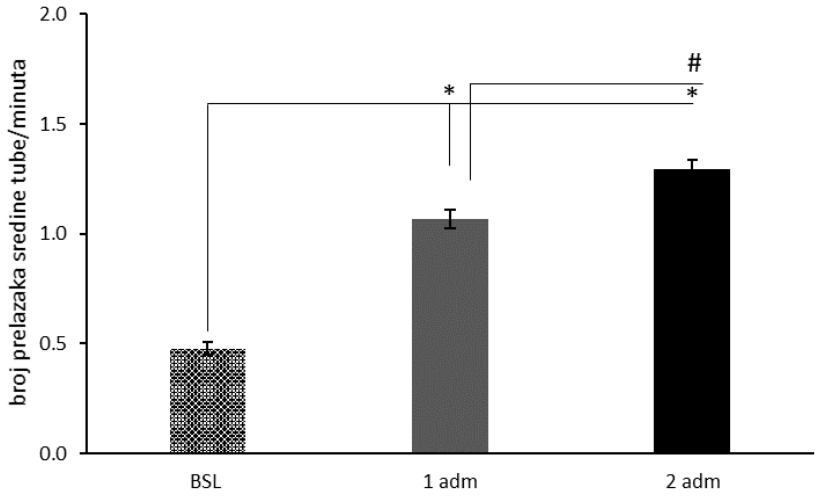
Slika 4. Samoadministracija metamfetamina utječe na lokomotornu senzitizaciju metamfetaminom

Populacijski odgovor mušica koje nisu bile u FlyCafe (n =6) (A), kontrolne mušice koje su bile u FlyCafe, ali su hranjene šećernom otopinom (n =5) (B) te mušice koje su prethodno bile u FlyCafe i imale su izbor između šećerne otopine i šećerne otopine s dodatkom Meth - HCl (n =15) (C)

4.2. Utjecaj lokomotorne senzitizacije na samoadministraciju

4.2.1. FlyBong

Mušice koje prethodno nisu samoadministrirale metamfetamin pokazale su fenotip lokomotorne senzitizacije što je vidljivo iz toga što se broj prelazaka sredine tube po minuti povećava administracijom droge. (Slika 5) Postoji statistički značajna razlika između lokomotorne aktivnosti prije i nakon prve administracije, prije i nakon druge administracije te između prve i druge administracije droge.

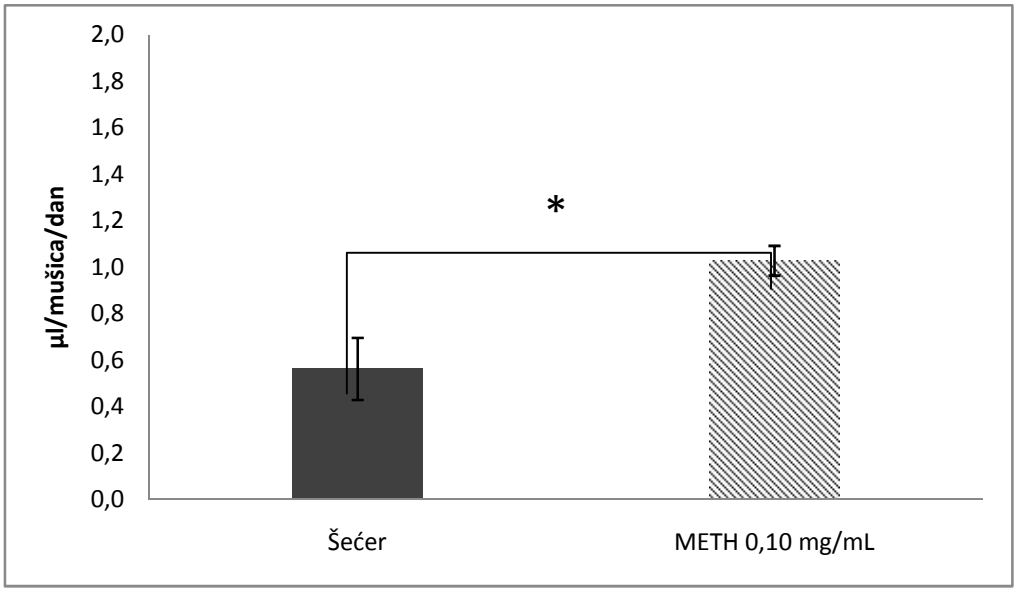


Slika 5.Mušice nakon ponovljenog izlaganja METH-HCl pokazuju fenotip lokomotorne senzitizacije. Populacijski odgovor mušica (n = 32) je prikazan kao prosječna vrijednost broja prelazaka sredine tube 30 minuta prije (BSL), 30 minuta nakon prve administracije (1 adm) i 30 minuta nakon druge administracije 75 µg METH-HCl (2 adm). Statistički značajnarazlika (P<0,05) između broja prelazaka kod BSL te 1 adm i 2 adm (*), te razlika između 1 adm i 2 adm (#).

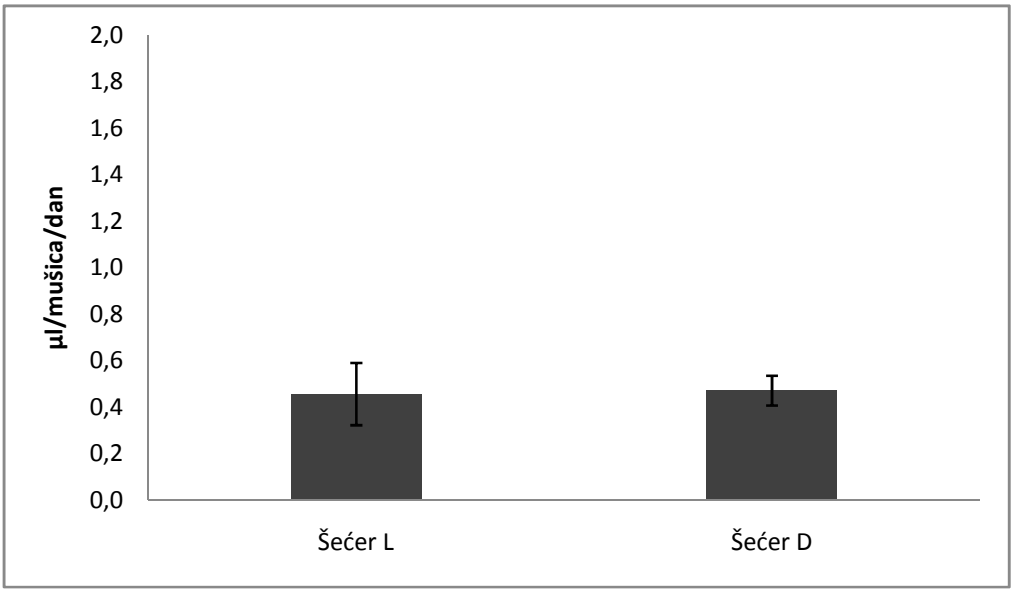
4.2.2. FlyCafe

Mušice su iz FlyBonga prebačene u FlyCafe pokus. Zanimalo nas je hoće li senzitizirane mušice imati drugačiju preferenciju prema metamfetaminu od mušica koje prethodno nisu bile senzitizirane. Postoji statistički značajna razlika u eksperimentalnoj skupina mušica (EXP) koja pokazuje preferencu prema hrani koja sadrži šećer i metamfetamin, p=0,003. Mušice konzumiraju veću količinu hrane s metamfetaminom kad im je ponuđen izbor između hrane koja sadrži samo šećer te hrane koja sadrži šećer i metamfetamin (Slika 6.A). Kontrolna skupina mušica (CTRL) nije pokazala preferencu ni prema jednoj strani, odnosno ne postoji statistički značajna razlika, p = 0,924 (Slika 6.B). Između eksperimentalne i kontrolne skupine mušica postoji statistički značajna razlika u ukupnom volumenu popijenih tekućina – eksperimentalna skupina mušica u prosjeku je popila više ukupnog volumena tekućine, p = 0,008 (Slika 6.C).

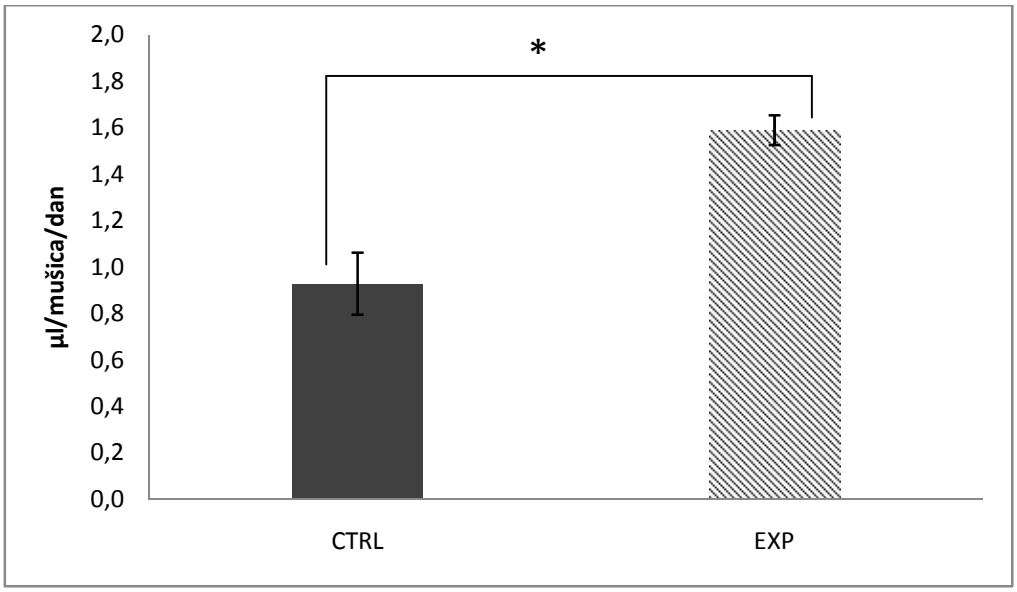
A


2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
µl/mušica/dan
*
Šećer
METH 0,10 mg/mL

B


2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
µl/mušica/dan
Šećer L
Šećer D

C



Slika 6. Lokomotorna senzitizacija metamfetaminom utječe na samoadministraciju metamfetamina. .n=20. (A) n=6. (B). Za eksperimentalnu skupinu (EXP) broj mušica n=20, a za kontrolnu skupinu (CTRL) broj mušica n=6. (C). Volumeni popijene tekuće hrane mjereni su za pojedinu mušicu tokom 3 dana.

5. RASPRAVA

Prvi cilj istraživanja bio je saznati hoće li mušice preferirati hranu uz dodatak metamfetamina nad hranom bez droge. Mušice su u FlyCafe pokusu prvi tjedan aktivno samoadministrirale hranu te pokazale preferenciju prema hrani s metamfetaminom. Preferencija je najjača prvi i četvrti dan. Moguće objašnjenje za takav rezultat je gorak okus metamfetamina. Mušicama je hrana s metamfetaminom odbojna radi potencijalno gorkog okusa, međutim motivacija za uzimanjem droge prevladava nad negativnim posljedicama. To ukazuje da je moguće da metamfetamin djeluje na motivacijske centre u mozgu mušica, slično kao i kod sisavaca. Rezultat se djelomično poklapa s istraživanjem u kojem su mušice pokazale preferencu prema hrani s metamfetaminom

prvi dan, ali ostale dane je PI padao (15). Studije na štakorskim modelima su pak, pokazale preferencu prema metamfetaminu sve dane pokusa (18).

Nakon samoadministracije mušice su stavljene u FlyBong gdje su bile izložene dvjema dozama volatiziranog metamfetamina jer nas je zanimalo kakve će biti razlike u lokomotornoj aktivnosti. Rezultati su pokazali da se mušice hranjene šećernom otopinom uz dodatak metamfetamina nisu senzitizirale. Potencijalno objašnjenje može biti da je samoadministracija dovela do adaptacija u dopaminskom, serotoninskom ili oktopaminskom sustavu što je za posljedicu imalo gubitak lokomotorne senzitizacije na opetovanu administraciju volatiziranog metamfetamina su mušice od opetovane konzumacije metamfetamina otupile na podražaj, koji je u ovom slučaju nova doza metamfetamina, i posljedično ne pokazuju fenotip lokomotorne senzitizacije. Ovime smo potvrdili hipotezu da postoji korelacija između preferencijalne konzumacije droge i lokomotorne senzitizacije na modelnim organizmima *Drosophile melanogaster* jer postoji razlika u senzitizaciji između eksperimentalne i kontrolne skupine mušica.

U narednom istraživanju najprije smo napravili pokus kojim smo htjeli vidjeti lokomotornu senzitizaciju opetovanom administracijom metamfetamina. Rezultati su pokazali da mušice pokazuju fenotip lokomotorne senzitizacije, što je u skladu s rezultatima istraživanja koje je proučavalo promjenu lokomotorne aktivnosti nakon opetovane administracije volatiziranog kokaina na modelima vinskih mušica (12). Tamo je također ustanovljena pojava lokomotorne senzitizacije kod mušica nakon administracije droge. Ovim pokusom smo po prvi puta pokazali da opetovane administracije volatiziranog metamfetamina dovode do lokomotorne senzitizacije kao što je to slučaj s volatiziranim kokainom.

Nakon toga nas je zanimalo hoće li senzitizirane mušice smanjiti ili povećati svoju preferencu prema metamfetaminu.FlyCafe pokus je zbog okolišnih uvjeta (promjenjive temperature i vlažnosti) trajao tri dana, za razliku od prvog tjedna kada je trajao četiri dana. Preferencija mušica prema metamfetaminu bila je najviša prvi dan, zatim je drugi dan naglo pala te je treći dan ponovno bila prisutna, iako ne toliko izražena kao

prvi dan. PI vrijednosti slične onima dobivenima u pokusu kada je FlyCafe proveden prije FlyBonga (SA – LS). Vrijednosti razine značajnosti kod uspoređivanja preference prema metamfetaminu odnosno šećeru za sve dane FlyCafe pokusa su i u prvom i u drugom pokusu bile niže od 0,05.

Jedan od problema na koji smo naišli prilikom ovog istraživanja bila je optimizacija okolišnih uvjeta kao što su vlaga i temperatura. Morali smo ponoviti FlyCafe pokus nekoliko puta jer su mušice ugibale zbog preniske ili previsoke vlažnosti u zraku te naglog pada temperature koji se u vrijeme odvijanja pokusa dogodio u gradu Rijeci.

Do sada nisu provedena istraživanja na modelima *Drosophile melanogaster*, ali ni drugim životinjskim modelima koja bi povezala dva tipa obrasca ponašanja vezana uz ovisnost – samoadministraciju tvari i lokomotornu senzitizaciju. Ovo istraživanje je od velikog značaja jer pronalazi korelaciju i potvrđuje povezanost između preferencijalne konzumacije droge i lokomotorne senzitizacije uslijed opetovane administracije droge. Smatram da su rezultati dobiveni u ovom radu značajni jer su . Potrebna su daljnja istraživanja na ovom području kako bi se što bolje mogla razumjeti problematika same bolesti te možda otkriti neki učinkovitiji pristup liječenju. Po mom mišljenju sljedeći korak bi trebao biti provođenje istog protokola pokusa kao u ovom istraživanju, samo uz povećanje broja dana FlyCafe pokusa da bi se vidjelo na koji će se način te hoće li se uopće mijenjati preferenca mušica prema metamfetaminu, kao i povećanje broja administracija METH – HCl – a u FlyBong pokusu kako bi se vidjelo kako će to utjecati na senzitizaciju mušica. Također ponovila bih taj protokol pokusa koristeći metamfetamin,ali i kokain kako bih uočila razlike ako ih bude bilo. Za provođenje tog sljedećeg koraka bilo bi potrebno optimizirati FlyCafe pokus na način da vanjski čimbenici nemaju toliki utjecaj nad dobivenim rezultatima.

6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem potvrdili smo da je *Drosophila melanogaster* dobar modelni organizam za istraživanja jednostavnih oblika ponašanja vezanih uz ovisnost. U pokusu samoadministracije (FlyCafe) pokazala je preferenciju prema hrani s drogom naspram obične hrane, a u pokusu lokomotorne senzitizacije (FlyBong) pokazala je povećanu lokomotornu aktivnost uslijed opetovane administracije droge. Cilj nam je bio saznati postoji li neka korelacija između ova dva ponašanja, a rezultati ukazuju na to da samoadministracija utječe na lokomotornu senzitizaciju, ali ne i obrnuto. To ukazuje na djelomično preklapanje genetskih mehanizama i anatomskih regija mozga koja kontroliraju ta dva oblika ponašanja.

Zbog velike genetičke sličnosti *Drosophile* i čovjeka pretpostavka je da i kod ljudi postoje zajednički neuralni mehanizmi koji su uključeni u ispitivane oblike modulacije ponašanja. Iako na razvoj ovisnosti kod ljudi utječu različiti društveni, statusni i kulturološki faktori koji se ne mogu simulirati u pokusima na laboratorijskim životinjama, ipak su rezultati ovog rada značajni za razumijevanje ove kompleksne bolesti. Važno je nastaviti s istraživanjima na ovom polju kako bi se oboljelima omogućio prikladan pristup i odgovarajuća terapija.

7. Literatura

1. Semantic Scholar Link [Internet]. [citirano 20. kolovoz 2019.]. Dostupno na: https://api.semanticscholar.org/28fc4738942e73d32a270519188e6e779e1a6394?_ga=2.226895261.1604090715.1565219976-1598861235.1565219976

2. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of Addiction. Neuron. rujan 1998.;21(3):467–76.

3. Kish SJ. Mechanisms and innovations: Pharmacologic mechanisms of crystal meth. CMAJ [Internet]. lipanj 2008. [citirano 20. kolovoz 2019.]; Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2413312/#r3-18

4. Su T-P. Non-canonical Targets Mediating the Action of Drugs of Abuse: Cocaine at the Sigma-1 Receptor as an Example. Front Neurosci [Internet]. 2019. [citirano 20. kolovoz 2019.];13. Dostupno na: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00761/full#B1

5. Zoričić Z. Ovisnosti prevencija, liječenje i oporavak. U Zagreb: Školska knjiga; 2018.

6. Steketee JD, Kalivas PW. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. Pharmacol Rev. lipanj 2011.;63(2):348–65.

7. Joyce EM, Iversen SD. The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat. Neurosci Lett. listopad 1979.;14(2–3):207–12.

8. Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. Brain Res. lipanj 1986.;396(2):157–98.

9. Benwell ME, Balfour DJ. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. Br J Pharmacol. travanj 1992.;105(4):849–56.

10. Cunningham CL, Noble D. Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. Pharmacol Biochem Behav. rujan 1992.;43(1):307–13.

11. Cadoni C, Pisanu A, Solinas M, Acquas E, Di Chiara G. Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and cross-sensitization with morphine. Psychopharmacology (Berl). studeni 2001.;158(3):259–66.

12. Filošević A, Al-samarai S, Andretić Waldowski R. High Throughput Measurement of Locomotor Sensitization to Volatilized Cocaine in Drosophila melanogaster. Front Mol Neurosci [Internet]. 05. veljača 2018. [citirano 20. kolovoz 2019.];11. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5807336/

13. Vezina P, Giovino AA, Wise RA, Stewart J. Environment-specific cross-sensitization between the locomotor activating effects of morphine and amphetamine. Pharmacol Biochem Behav. veljača 1989.;32(2):581–4.

14. Mattson BJ, Koya E, Simmons DE, Mitchell TB, Berkow A, Crombag HS, i ostali. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. Eur J Neurosci. siječanj 2008.;27(1):202–12.

15. Devineni AV, Heberlein U. Preferential Ethanol Consumption in Drosophila Models Features of Addiction. Curr Biol CB. 29. prosinac 2009.;19(24):2126–32.

16. Selimovi A. Definiranje preferencijalne konzumacije kokaina i metamfetamina kod Drosophile melanogaster.

17. McClung C, Hirsh J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in Drosophila. Curr Biol. siječanj 1998.;8(2):109–12.

18. Johansen A, McFadden LM. The neurochemical consequences of methamphetamine self-administration in male and female rats. Drug Alcohol Depend. 01. rujan 2017.;178:70–4.

8. Životopis

OSOBNEINFORMACIJE Osredečki Mia

Nazorova 18b, 47000Karlovac(Hrvatska)

(+385)989602395

osredeckim@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

2018–2018 Demonstrator na laboratorijskim vježbama kolegija Organskakemija

Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

10/2016–danas

Odjel za biotehnologiju, Preddiplomski sveučilišni studij, Rijeka (Hrvatska)

09/2012–05/2016

Gimnazija Karlovac, Karlovac (Hrvatska)

09/2005–06/2015 **Glazbenik violinist**

Glazbena škola Karlovac, Karlovac (Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinskijezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	B2	B2	B2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijskevještine Dobre komunikacijske i prezentacijske vještine zahvaljujući iskustvu stečenom tijekom pripreme prezentacijaiseminaranapreddiplomskomstudiju.

Poslovnevještine Dobrosnalaženjeutimskomradustečenotijekomobavljanjastudentskihposlova.

Sudjelovanje u provedbi Otvorenog dana Odjela za biotehnologiju 2018.godine - demonstracija pokusa "Dugine boje"

Digitalnevještine

SAMOPROCJENA

Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Temeljni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik	Samostalni korisnik