

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Ira Čoso

Ispitivanje karakteristika bihevioralne senzitivacije u *Drosophila*
melanogaster

Diplomski rad

Rijeka, 2016.godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Ira Čoso
Ispitivanje karakteristika bihevioralne senzitivacije u *Drosophila*
melanogaster
Diplomski rad

Rijeka, 2016.godina

Mentor rada: dr.sc., Rozi Andrečić-Waldowski

Diplomski rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

1. Doc.dr.sc. Igor Bajšanski

2. Izv.prof. dr.sc. Miranda Mladinić Pejatović

3. Doc.dr.sc. Rozi Andrečić-Waldowski

Rad ima 45 stranica, 9 slika, 3 sheme, 6 tablica i 29 literaturnih navoda

SAŽETAK

Bihevioralna senzitivacija predstavlja neasocijativno učenje u kojem ponovljena administracija stimulansa rezultira progresivnim stepenastim povećanjem odgovora. Bihevioralna senzitivacija kod *Drosophila* može biti kratkotrajna, i trajati kraće od 30 minuta, ili dugotrajna, do dva dana. Pretpostavlja se da su u njihovoj podlozi različiti molekularni mehanizmi. Cilj rada je bio razvoj visokoprotočne metode za razvoj dugotrajne bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse kokain i metamfetamin. Svi testovi provedeni su na mužjacima divljeg tipa (wt) *Drosophila melanogaster*, na soju *Canton S*, i mutantima *period (per)* i *timeless (tim)*, od kojih je *per* prethodno povezan s razvojem bihevioralne senzitivacije na kokain, dok *tim* nije.

Oralno administrirani metamfetamin kod mušica je izazivao toleranciju, bez obzira na doba dana administracije, koncentraciju ili dužinu trajanja administracije. Nasuprot tome, administracija volatiliziranog kokaina ili metamfetamina dovela je do brzog povećanja lokomotorne aktivnosti koja je bila dozno ovisna (75-1.25 μ l) i ovisna o dužini trajanja (1-7 minuta). Za administraciju volatiliziranog psihostimulansa razvili smo novu metodu gdje se regulacijom protoka zraka volatilizirana supstanca dostavlja individualnim mušicama u *Drosophila* Activity Monitoring System-u. Naredni eksperimenti će definirati uvjete za induciranje bihevioralne senzitivacije na kokain i metamfetamin u ovom visokoprotočnom sistemu.

Razvijen je i postupak za izazivanje kratkotrajne bihevioralne senzitivacije na mehanički stres. Mušice su izložene početnom jakom mehaničkom stresu (*startle*, ST), a potom seriji slabijih senzitivirajućih podražaja (SS1-3). Mušice jače reagiraju na SS podražaje ukoliko su prethodno izložene ST, što je u skladu s prethodno publiciranim rezultatima. *Per* i *tim* mušice na ST i SS reagiraju poput wt što pokazuje po prvi puta da ti geni nisu uključeni u regulaciju kratkotrajne bihevioralne senzitivacije, i govore u prilog razlike u mehanizmima indukcije kratkotrajne i dugotrajne bihevioralne senzitivacije.

Naši rezultati su u skladu s dvoprocesnom teorijom (dual-process theory) plastičnosti odgovora na ponovljenu stimulaciju, autora Groves i Thompson, 1970., koja govori da o jačini i trajanju podražaja ovisi razvoj senzitivacije ili habituacije. Oralna administracija (dugotrajan podražaj slabog intenziteta) izazvala je

toleranciju, dok je mehanički stres (kratkotrajan podražaj jakog intenziteta) inducirao razvoj bihevioralne senzitivacije. Karakteristika podražaja dana putem volatiliranog kokaina zadovoljava uvjete za razvoj bihevioralne senzitivacije što će se provoditi u narednim eksperimentima.

Ključne riječi: bihevioralna senzitivacija, kokain, metamfetamin, *startle* podražaj, *Drosophila melanogaster*

SUMMARY

Behavioral sensitization represents non-associative learning in which repeated administration of stimulus results in a progressive increase in response. Behavioral sensitization in *Drosophila* can be short-term (takes less than 30 minutes) or long-term (lasts up to two days). It is assumed that they rely on different molecular mechanisms. The aim of the study was the development of high-throughput method to develop long-term behavioral sensitization to psychostimulants cocaine and methamphetamine. All tests were performed on male wild type (wt) *Drosophila melanogaster*, of strain *Canton S*, and mutants *period* (*per*) and *timeless* (*tim*), of which is *per* previously associated with the development of behavioral sensitization, while *tim* is not.

Oral administration of methamphetamine in flies induce tolerance, regardless of the day time, concentration or duration of administration. As opposed to that, the administration of volatilized cocaine or methamphetamine led to a rapid increase in locomotor activity which was dose dependent (75-1.25 μ l) and time dependent (1 to 7 minute length). For administration of volatilized psychostimulants we have developed a new method where with regulation of airflow volatilized substance is delivered to individual flies in DAMS (Drosophila Activity Monitoring System). The next experiments will define requirements in this high-throughput system for induction of behavioral sensitization to cocaine and methamphetamine.

Also, we developed a method for the induction of short-term bibehavioral sensitization to mechanical stress. Flies were exposed to an initial strong mechanical stress (startle, ST), and then a series of weaker sensitizing stimulus (SS1-3). Flies are more responsive to the SS stimulus if they were previously treated with ST, which is in accordance with previously published results. On ST and SS *per* and *tim* flies react like wt which shows for the first time that these genes are not involved in the regulation of short-term bibehavioral sensitization, and indicate the differences in the mechanisms of induction of short and long-term behavioral sensitization.

Our results are in line with dual-process theory of plasticity response to repeated stimulation by Groves and Thompson 1970. which tells that development of sensitization or habituation depends on the strength and duration of the stimulus. Oral administration (long-term stimulus of low intensity) caused tolerance, while

the mechanical stress (short-term stimulus of high intensity) induced development of behavioral sensitization. The characteristic of the stimulus given by volatilized cocaine satisfies conditions for the development of behavioral sensitization which will be implemented in the next experiments.

Keywords: behavioral sensitization, cocaine, methamphetamine, *startle* stimulus, *Drosophila melanogaster*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Psihostimulansi kod <i>Drosophila</i>	2
1.1.1. Etanol	2
1.1.2. Nikotin	3
1.1.3. Kokain i metamfetamin	3
1.2. Bihevioralna senzitivacija i tolerancija	5
1.3. Dosadašnji eseji i načini administracije psihostimulansa	6
2. CILJ RADA	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Soj <i>Drosophila</i> i uzgoj	10
3.2. Mjerenje lokomotorne aktivnosti	10
3.3. Eksperimenti oralne administracije psihostimulansa	10
3.4. Startle (mehanički stres) eksperimenti.....	10
3.5. Eksperimenti volatiliziranog kokaina i metamfetamina	11
3.6. Statička obrada podataka	12
4. REZULTATI	13
4.1. Utjecaj oralne administracije METH-a na lokomotornu aktivnost	13
4.1.1. Dnevna administracija 0,5 mg/mL METH-a.....	13
4.1.2. Noćna administracija 1,25 mg/mL METH-a.....	14
4.1.3. Utjecaj koncentracije METH-a i administracije kod CS i <i>tim</i> mušica	17
4.1.4. Utjecaj prebacivanja na svježiju hranu kod CS i <i>per</i> mušica	19
4.2. Utjecaj startle efekta (mehaničkog stresa) na lokomotornu aktivnost mušica eksperimentalne grupe	22
4.2.1. Ručno izvođenje eksperimenta	22
4.2.2. Eksperimenti izvođeni pomoću vibracijskog uređaja	24
4.3. Utjecaj aerosola COC i METH na lokomotornu aktivnost mušica	28
4.3.1. Volatilizirani kokain	28
4.3.2. Volatilizirani metamfetamin.....	31
5. RASPRAVA	36
5.1. Praćenje lokomotorne aktivnosti uslijed oralne administracije metamfetamina	36
5.2. Kontrolne skupine imaju povećanu aktivnost	37
5.3. Praćenje lokomotorne aktivnosti uslijed mehaničkog stimulansa.....	38

5.4. Povećanje lokomotorne aktivnosti uslijed administracije volatiliziranog kokaina i metamfetamina	40
5.5. Rezultati potvrđuju dvoprocesnu teoriju plastičnosti	41
6. ZAKLJUČAK	42
7. LITERATURA	43
8. ŽIVOTOPIS STUDENTA.....	46

1. UVOD

Ovisnost o drogama je poremećaj koji je okarakteriziran pretjeranom konzumacijom droge do točke kompulzivnog traženja droge (1). Životinjski modeli omogućavaju promatranje različitih komponenti procesa ovisnosti, u rasponu od jednostavnog akutnog odgovora do kompleksnih ponašanja poput traženja droge, samoadministracije i recidiva. Selektivni uzgoj, farmakološke manipulacije i reverzni genetski pristupi na životinjskim modelima napravili su značajan doprinos razumijevanju mehanizama koji stoje iza preferencijalne konzumacije psihostimulansa (2). Kako bi se istražilo koje su neurokemijske promjene u središnjem živčanom sustavu povezane s djelovanjem droge i ovisnosti provedeno je niz studija na štakorima, miševima, babunima i majmunima (3). Također, i *Drosophila* pokazuje elemente ovisničkog ponašanja, a psihoaktivne supstance poput kokaina, nikotina i etanola imaju jaki bihevioralni efekt (4). Kod mušica etanol ima nagrađujući efekt, a ponovljena izloženost kokainu može izazvati bihevioralnu senzitivaciju ovisno o jačini i intervalu izloženosti. Osim toga, kokain i metamfetamin djeluju aktivirajuće (povećavaju lokomociju) i pobuđujuće (smanjuju spavanje) (5,6).

Glavni cilj ovog rada je razvoj visokoprotočna metoda za izazivanje bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse metamfetamin i kokain. S obzirom na to da je u dosadašnjim eksperimentima u našem laboratoriju primijećeno kako i kontrolne skupine reagiraju s povećanim bihevioralnim odgovorom, tema ovog rada je definiranje vrste podražaja koji izaziva senzitivirajući odgovor kod *Drosophile*.

Drosophila melanogaster ili vinska mušica je model organizam koji se uspješno koristi kako bi se razjasnili mehanizmi osnovnih bioloških procesa poput signalizacije, razvoja živčanog sustava, staničnog ciklusa, ponašanja i molekularnih aspekata ljudskih bolesti (7). Zbog sličnosti s ljudima u temeljnim staničnim neurobiološkim procesima ovaj model organizam koristi se za razumijevanje neurobiološke baze složenih ponašanja poput učenja, cirkadijurnog ponašanja i odgovora na supstance koje stvaraju ovisnost (4). *Drosophila* ima oko 70% konzerviranih gena sličnih ljudskima, brzo se razmnožava, jednostavna je za uzgoj i kao takva predstavlja dobar temelj za razumijevanje složenosti bioloških sustava u sisavaca (1,7).

1.1. Psihostimulansi kod *Drosophila*

Ovisnost o psihoaktivnim tvarima može se okarakterizirati s tri glavna elementa: traženjem i uzimanjem droge, gubitkom kontrole pri uzimanju droge i pojavom negativnih emocionalnih stanja prilikom ograničenog pristupa drogi (8). Iako niti jedan životinjski model u potpunosti ne oponaša ljudsko stanje, moguće je izazvati i mjeriti jednostavnija ponašanja koja predstavljaju dio ovisničkog sklopa ponašanja i onda ih koristiti za izučavanje molekularnih mehanizama uključenih u stanične procese i ponašanja. *Drosophila* se koristi za proučavanje molekularnih mehanizama povezanih s konzumacijom etanola, nikotina te psihostimulansa poput kokaina i metamfetamina (2).

1.1.1. Etanol

Najviše znanstvenih radova do sada je publicirano o psihoaktivnoj tvari etanolu čije molekularne i neuronske mete nisu u potpunosti razjašnjene (4). Za razliku od drugih droga, poput kokaina i nikotina koji imaju jasno definiranu molekularnu metu, etanol utječe na razne molekule kao i na ionske kanale (1).

Bihevioralni odgovor uzrokovan etanolom konzerviran je između mušica i sisavaca (2,4,9). Kod mušica kao i kod sisavaca ponovljena izloženost etanolu inducira toleranciju, odnosno smanjenje osjetljivosti na etanol (1). Mušice pri nižim dozama etanola pokazuju lokomotornu stimulaciju, dok pri višim pokazuju motornu nekoordiniranost, gubitak refleksa upravljanja i sedaciju (2,4,9).

Pokazano je da mušice radije konzumiraju hranu koja sadrži etanol u odnosu na običnu hranu, povećavaju konzumaciju etanola tijekom vremena i troše ga u farmakološki relevantnim koncentracijama (2). Preferiranje mušica za konzumaciju hrane koja sadrži etanol u odnosu na običnu hranu ima komponente ovisnosti o konzumaciji alkohola kod ljudi. Osim odgovora na akutnu izloženost etanolu, ženke preferiraju lijegati jaja u podloge koje sadrže etanol, osim toga i larve provode više vremena u agaru koji sadrži etanol. Ova prioritarna ponašanja vjerojatno odražavaju evolucijsku povijest vinske mušice. U prirodnom okruženju *Drosophila* često susreće značajne razine etanola proizvedenog fermentiranjem biljnih materijala i evolucijski je razvijen mehanizam za učinkovitu degradaciju etanola kojega koriste kao izvor energije ili kao prekursor za biosintezu lipida (2). Radi toga, definiranje dugoročnih promjena izazvanih psihostimulansima bilo bi

vrlo značajno jer bi pokazalo da *Drosophila* može razviti ovisničku vrstu ponašanja za droge koje nisu dio njezine evolucijske povijesti.

1.1.2. Nikotin

Istraživanja vršena sa psihostimulansom nikotinom pokazala su kako nikotin ima utjecaj na ponašanje sisavaca na način da aktivira nikotinske acetilkolinске receptore (1). Smatra se da je ovisnost o nikotinu posredovana izravnom i neizravnom aktivacijom dopaminergičkih neurona, a farmakološko snižavanje količine dopamina reducira osjetljivost na nikotin (10). Lokomotorni učinak nikotina u mušica ovisi o dopaminu, tako da mušice izložene volatiliziranom nikotinu pokazuju lokomotornu hiperaktivnost koja je smanjena kod mušica sa smanjenom dopaminskom transmisijom (1).

1.1.3. Kokain i metamfetamin

Opojne droge imaju zajedničko svojstvo kod sisavaca: nakon administracije prodiru u mozak i imaju psihoaktivne ovisničke učinke, a stvaranje zadovoljstva i gubitka kontrole može se pratiti utjecajem na međusobno povezana područja u mozgu (11). Ti učinci nastaju prvenstveno djelovanjem na limbički sustav, odnosno skup povezanih regija koje reguliraju zadovoljstvo i motivaciju (11,12). Poseban dio limbičkog sustava, nukleus akumbens (NAc) je najvažnija meta psihostimulansa (10,11). Osim na NAc, psihostimulansi djeluju i na memorijski dio limbičkog sustava koji se nalazi u regijama hipokampusa i amigdale. Ovi memorijski centri pomažu prisjećanju na uzrok užitka, stvaraju se jake asocijacije (učenje uvjetovanjem) pa se kod sisavaca naknadne situacije i mjesta povezuju s ugodom nakon čega se javlja jaka žudnja za uzimanjem droge (11).

Kod sisavaca nakon administracije psihostimulansa (kokaina i metamfetamina) te njihovog rapidnog ulaska u krvotok, dolazi do nakupljanja dopamina na mjestima gdje u mozgu postoje dopaminski transporteri (11). Kokain i metamfetamin ne utječu samo na promjene u ekstracelularnoj koncentraciji neurotransmitera dopamina (DA), već i na neurotransmitere serotonin (5HT) i noradrenalin (NA) (10). Psihostimulansi blokiraju transportere za ove neurotransmitere, čime se sprječava njihovo uklanjanje iz sinaptičke pukotine, ili se potiče njihovo otpuštanje iz presinaptičkog neurona (6). Kokain povećava razinu dopamina blokiranjem presinaptičkog dopaminskog transportera (DAT), koji je odgovoran za reapsorpciju dopamina natrag u stanicu koja ih je ispustila (12,13). Za razliku od kokaina,

metamfetamin ima puno složenije djelovanje od čega je najznačajnije povećanje otpuštanja monoamina dopamina, serotonina i noradrenalina iz sinaptičkih vezikula te iz presinaptičkog neurona.

Bihevioralni efekti dva najvažnija psihostimulansa kokaina i metamfetamina su aktivirajući, podražujući i nagrađujući, a mogu imati akutni i kronični efekt. Aktivirajući (akutni) efekt uključuje povećanje lokomotorne aktivnosti i stereotipna ponašanja, dok se podražujući efekt manifestira ukupnim smanjenjem sna (5,6,11). Nagradni (kronični) efekt inducira osjećaj ugone i energično ponašanje uslijed administracije droge te se upravo on povezuje se s razvojem ovisnosti (13). Naime, količina dopamina vezanog na receptore u NAc nakon djelovanja kokaina može premašiti iznose povezane s primarnim nagradama. Sisavcima su hrana i seks primarne nagrade, a nagrađujući put baziran na dopaminskoj transmisiji je evolucijski konzerviran. Svi psihostimulansi povećavaju aktivnost nagrađnog puta, stoga neke laboratorijske životinje, ako im se da izbor, zanemaruju hranu i uzimaju kokain dok se ne izgadne (11,13).

Geni uključeni u djelovanje psihostimulansa su konzervirani što ukazuje na očuvanje mehanizama dopaminskog nagrađujućeg puta u različitim vrstama (14). Opisana inhibicija dopaminskog transportera kokainom inducira lokomotornu hiperaktivnost kod sisavaca, no slično je i kod mušica jer imaju dopaminske transportere te kokain također povećava i njihovu aktivnost (1). Kod mušica je ključni regulator pobuđenosti (eng. *arousal*) dopamin, a psihostimulansi uneseni hranom kod njih povećavaju koncentraciju dopamina u sinapsi. Učinak povećanja je vidljiv na općem porastu pobuđenosti koji se manifestira kao smanjenje prosječnog vremena spavanja i povećanje prosječne aktivnosti kada su mušice budne (6). Osim toga, kao i kod sisavaca, ponovljene administracije volatiliziranog kokaina kod mušica dovode do bihevioralne senzitivacije, fenomena povećanog odgovora na drogu koji nastaje pri sekundarnoj izloženosti nekoliko sati nakon prve (4,15).

Administracija volatiliziranog kokaina u mušica inducira motoričko ponašanje koje je slično onima primijećenima kod sisavaca (5). Niske doze kokaina (50-75mg) izazivaju čišćenje, engl. *grooming*, i hiperaktivnost, umjerene doze (100-150mg) dovode do hipokinezije, tremora i stereotipne lokomocije obično manifestirane kao kruženje, dok visoke doze (200-400 mg) izazivaju akineziju, kompletan gubitak kretanja (4,10). S druge strane, kod mušica je proveden mali broj studija koje su

okarakterizirale učinke amfetamina, a najveći fokus je stavljen na metamfetamin. Mušicama oralno administrirani metamfetamin uzrokuje povećanje lokomotorne aktivnosti, ometa san, utječe na udvaranje mužjaka. Administracija metamfetamina također je povezana i s promjenama u vizualnom pobuđivanju neuronske aktivnosti što ukazuje da može utjecati na vizualnu percepciju (6). Utjecaj oralno administriranog metamfetamina na vizualnu percepciju vrlo je brz i vidljiv je već nakon 12 minuta što potvrđuje oralnu administraciju kao brz i efikasan način administracije psihostimulansa.

Vrlo je važno razumijevanje ovisnosti kao kompleksnog ponašanja, u čijoj je osnovi promjena funkcioniranja mozga. Kokain izaziva mnoge vrste dugoročnih promjena u funkcioniranju moždanih stanica, no još uvijek nije razjašnjeno kako psihostimulansi uzrokuju dugoročne promjene poput bihevioralne senzitivacije ili tolerancije koje su temelj ovisnosti, te jesu li oni povezani s rizikom od recidiva (5).

1.2. Bihevioralna senzitivacija i tolerancija

Tijekom vremena efekt psihostimulansa kokaina i metamfetamina se može pojačavati (senzitivacija) ili smanjivati (tolerancija) ukoliko se daju u ponovljenim dozama (16). Bihevioralna senzitivacija predstavlja neasocijativno učenje u kojem ponovljena administracija iste koncentracije psihostimulansa rezultira u stepenastom povećanju odgovora, dok se tolerancija očituje kao smanjeni fiziološki i bihevioralni odgovor na istu dozu psihostimulansa (5,17,18). Oba ponašanja se mogu izazvati istim drogama, a o tome koji oblik ponašanja će se inducirati ovisi o koncentraciji droge te režimu i načinu administracije.

Senzitivacija i tolerancija mogu biti kratkoročne ili dugoročne (18). Kratkoročna senzitivacija izučavana je kao jednostavan oblik učenja, a tolerancija se tada zove habituacija. Izučavana je na elektrofiziološkom nivou mjerenjem promjena u aktivnosti jednostavnih neuralnih mreža i korelacijom s promjenom u ponašanju u organizama kao što je morski puž *Aplysia* (19). Dugoročna senzitivacija može trajati danima i mjesecima, a kod mušica ona može biti izazvana volatiliziranim kokainom, dok toleranciju izaziva etanol (17,20).

Na jačinu biheviornalne senzitivacije utječu brojni čimbenici poput broja administracija psihostimulansa, intervala između administracija, jačine doza, spola, dobi i genetike. Razvoj biheviornalne senzitivacije može se podijeliti u dvije faze, inicijaciju i ekspresiju. Inicijacija je neposredan neuronski događaj koji izaziva biheviornalnu senzitivaciju (promjene inicirane akutnoj izloženosti), a ekspresija je dugoročna posljedica inicijalnih događaja. Osim samih psihostimulansa i okolina može utjecati na inicijaciju i ekspresiju. Životinje uzastopno izložene psihostimulansima pokazuju robusniju senzitivaciju pri ponovnom izlaganju drogi u istom okolišu, u usporedbi sa životinjama testiranim u okruženju koje se razlikuje od onog korištenog tijekom inicijacijske faze (18).

Biheviornalna senzitivacija se najčešće mjeri praćenjem motoričke aktivnosti (18). Mušice mogu pokazati senzitivaciju nakon višestrukih administracija volatiliziranog kokaina iste koncentracije pod uvjetom da su doze odvojene u intervalu od 6 do 24 sata (10,20). Kod divljeg tipa mušica motorički odgovor nakon izloženosti drugoj dozi iste koncentracije znatno je jači nego nakon prve (20,21). Također je pokazano da su u razvoj biheviornalne senzitivacije na kokain kod *Drosophila* uključeni i geni cirkadijurnog sata *period*, *Clock*, *cycle* i *doubletime*, a iako je s njima u interakciji za regulaciju cirkadijurnog ponašanja uključen i cirkadijurni gen *timeless*, on nije uključen u proces senzitivacije (5,15,20).

Iako je tolerancija najčešće povezana s djelovanjem etanola, kod sisavaca ju mogu izazvati i psihostimulansi uslijed čega dolazi do promjena u središnjem živčanom sustavu (CNS) što ima sličnosti s mehanizmima učenja i pamćenja (17). Poznato je da etanol kod *Drosophila* dovodi do razvoja tolerancije, a do sada su zabilježene dvije vrste tolerancije, brza i kronična (1). Brza tolerancija je izazvana kratkim izlaganjem sedacijskoj koncentraciji etanola, a kronična je inducirana produljenom izloženosti niskim koncentracijama. Brza i kronična tolerancija su posredovane različitim mehanizmima, a samo je dugoročna tolerancija ovisna o sintezi proteina. Za sada nije poznato mogu li psihostimulansi u *Drosophila* osim senzitivacije izazvati i toleranciju.

1.3. Dosadašnji eseji i načini administracije psihostimulansa

Biheviornalni esej koji je namijenjen izučavanju razvitka ovisnosti je oblik samostalne konzumacije stimulansa u kojem životinje imaju dva izbora, od kojih jedan sadrži stimulans, najčešće etanol (2). Postoji nekoliko različitih načina na

koji se mušicama može administrirati droga (22). Psihostimulansi poput etanola i kokaina mogu biti davani u obliku pare (volatilizirani), ali se mogu davati i pomiješani s hranom ili saharozom (21). Također, psihostimulansi se mogu aplicirati direktno na izloženi ventralni ganglij (ekvivalentno kralježničkoj moždini) ili može biti injektirana u abdomen gdje brzo difundira kroz organizam (3,22).

Kako bi se odredilo utječe li prisutnost droge na unos hrane postoji i nekoliko jednostavnih testova hranjenja (23). Jedna od metoda je da se mušice izgladne 16 do 18 sati, a zatim ih se stavi nekoliko minuta na hranu koja sadrži drogu. Mušice u ovakvom eseju uglavnom konzumiraju velike količine droge (22). Opisani esej omogućuje promatranje i mjerenje akutnog efekta psihostimulansa, ali postoje značajne varijabilnosti u unesenoj dozi između mušica zbog različitih veličina njihovih tijela i količine konzumirane droge. Druga metoda uključuje držanje mušica na hrani tijekom dužeg vremenskog perioda, učestalo 12 sati ili više, jer se na taj način osigurava da će sve jedinke u prosjeku konzumirati približno podjednaku količinu hrane. Ovakav postupak je visoko propustan jer omogućava istovremenu administraciju droge za veliku populaciju mušica (22).

Bihevioralni efekti psihostimulansa kod mušica mogu se mjeriti ovisno o načinu administracije droge. U dosadašnjim istraživanjima na mušicama, bihevioralni efekti izazivani su isključivo administracijom kokaina putem aerosola (volatilizirani kokain), dok su efekti metamfetamina izazivani i mjereni administracijom oralnim putem u kombinaciji s običnom hranom (6,20,21).

Efekti metamfetamina na mušice, izazvani oralnom administracijom, i njegov utjecaj lokomotornu aktivnost pojedine mušice moguće je pratiti pomoću DAMS-a, Drosophila Activity Monitoring System-a (6,24). U DAMS monitoru istovremeno se nalaze 32 mušice smještene u individualnim staklenim cjevčicama s hranom. Prolazak mušice sredinom cjevčice se detektira i zbraja pomoću infracrvenog snopa koji presijeca cjevčicu, a akumulirani ukupni zbroj prikuplja se na računalo u periodu od svakih 1 ili 5 minuta, ovisno o eksperimentu, tijekom cijelog dana. Istovremeno je moguće prikupljati podatke iz velikog broja monitora. U ovom radu smo pokušali razviti novu visokoprotlačnu metodu za izazivanje bihevioralne senzitivacije baziranu na oralnoj administraciji psihostimulansa, te mjerenjem lokomotorne aktivnosti u DAMS monitorima.

Prethodno publicirana metoda za izazivanje bihevioralne senzitivacije na ponovljene administracije kokainom uključuje izlaganje mušica aerosolu kokaina (volatilizirani kokain), nakon čega se mušice prebacuju u komoru koja omogućuje snimanje video zapisa. Kvantifikacija ponašanja provodi se bodovanjem najizraženijeg ponašanja svake mušice, a postupak je vremenski zahtjevan i nije potpuno objektivan (21). Kako bi objektivno kvantificirali ponašanje u ovom istraživanju smo razvili novi postupak za izazivanje bihevioralne senzitivacije gdje smo administraciju volatiliziranih psihostimulansa povezali s mjerenjem lokomotorne aktivnosti u DAMS-u.

Inicijalni eksperimenti oralnim administracijama psihostimulansa bazirani su na ponovljenim administracijama droge, dok je kontrolna skupina u isto vrijeme dobivala običnu hranu. Primijećeno je kako kontrolne skupine pokazuju nestabilnu bazičnu aktivnost, učestalo povećavajući lokomotornu aktivnost nakon mehaničke manipulacije promjene hrane. Stoga smo proveli seriju eksperimenata kako bismo provjerili izaziva li i mehanički stimulans konzistentnu promjenu u aktivnosti sličnu bihevioralnoj senzitivaciji.

Jedan od publiciranih načina za mjerenje bihevioralne senzitivacije baziran je na mjerenju pobuđenog stanja (engl. *arousal*) mušica uzrokovano ponavljajućim mehaničkim šok (engl. *Startle*) stimulansom. Pomoću ove metode moguće je pratiti položaj, brzinu, akceleraciju i putanju mušica u odgovoru na stimulans. Šok stimulans ili *startle*, davan je mušicama u obliku šest kratkih mlazova zraka (200msec svakih 5 sekundi, 35 psi) što uzrokuje produženu hiperaktivnost mušica u trajanju od 7 do 10 minuta (10,25). Mušice su potom puštane da se oporave 10 minuta, nakon čega im je dan još jedan mlaz zraka. Odgovor mušica koje su prethodno bile izložene *startlu* bio je znatno intenzivniji u odnosu na kontrolnu skupinu koja ga nije primila. Mušice koje su puštene da se oporave 30 minuta ne pokazuju statistički značajnu razliku u naknadnom odgovoru na jedan mlaz, što ukazuje na to da je ovaj oblik senzitivacije kratkotrajan, za razliku od senzitivacije na psihostimulanse (25).

Dio našeg istraživanja kojim smo željeli ispitati utjecaj mehaničkog stresa na ponašanje je serija eksperimenata u kojima smo mjerili utjecaj jake i umjerene mehaničke stimulacije na razvoj kratkotrajne bihevioralne senzitivacije praćene pomoću DAMS-a.

2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je razvoj visokoprotodne metode za izazivanje bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse metamfetamin i kokain kod *Drosophila melanogaster*. Senzitivacija je jedan oblik neuroplastičnih promjena induciranih psihostimulansima i relevantno je za razumijevanje ovisnosti kod ljudi. Bihevioralni efekti mogu se mjeriti ovisno o načinu administracije psihostimulansa. Bihevioralna senzitivacija u vidu povećane lokomotorne aktivnosti mušica praćena je pomoću DAMS-a (Drosophila Activity Monitoring System), a izazivana je na dva načina, višestrukom oralnom administracijom metamfetamina ili mehaničkim šok stimulansom. U ovom radu predstavljeni su samo eksperimenti akutne izloženosti koji će poslužiti za definiranje uvjeta višestruke administracije. Značajno dostignuće ovih eksperimenata je da je po prvi puta administracija volatiliziranog kokaina povezana s metodom koja omogućuje kvantificiranje promjena u lokomociji nakon administracije droge.

Kako je primijećen utjecaj mehaničkog stresa na lokomociju, ispitivano je izaziva li mehanički stres kratkotrajnu bihevioralnu senzitivaciju. Definirano je optimalno trajanje, vrsta podražaja, jačina i razmak između podražaja.

Svi testovi su provedeni na mužjacima divljeg tipa (wt) *Drosophila melanogaster*, na soju *Canton S*, ali i cirkadijalnim mutantima *period (per)* i *timeless (tim)*. Mutanti se u prethodnim istraživanjima razlikuju u svom odgovoru na administraciju volatiliziranog kokaina stoga su korišteni za validaciju metode te kako bi se ispitala njihova uloga u kratkotrajnoj bihevioralnoj senzitivaciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Soj *Drosophila* i uzgoj

Svi testovi su provedeni na divljem tipu (wt) *Drosophila melanogaster*, na soju *Canton S* (CS), i na mutantima *period* (*per*⁰¹) i *timeless* (*tim*⁰¹). Mušice su uzgajane na kuhanoj hrani koja sadrži agar, kukuruzno brašno, šećer, suhi kvasac i nipaginsku i propionsku kiselinu kako bi se spriječio rast plijesni i gljivica. Svi sojevi mušica uzgajani su u inkubatoru u plastičnim bocama na 35 mL hrane na temperaturi 24°C i vlažnosti 60-70% sa stalnim 12-osatnim izmjenama svjetla i mraka. U svim eksperimentima korištene su mušice stare od tri do pet dana. Svi testovi provedeni su na mužjacima.

3.2. Mjerenje lokomotorne aktivnosti

Podaci o lokomotornoj aktivnosti pojedine mušice prikupljani su pomoću DAMS-a, *Drosophila Activity Monitoring System*-a. U DAMS monitoru nalaze 32 mušice smještene u individualnim staklenim cjevčicama s hranom. Prolazak mušice sredinom cjevčice se detektira i zbraja pomoću infracrvenog snopa koji presijeca cjevčicu, a akumulirani ukupni zbroj prikuplja se na računalo u periodu od svakih 1 ili 5 minuta, ovisno o eksperimentu, tijekom cijelog dana.

3.3. Eksperimenti oralne administracije psihostimulansa

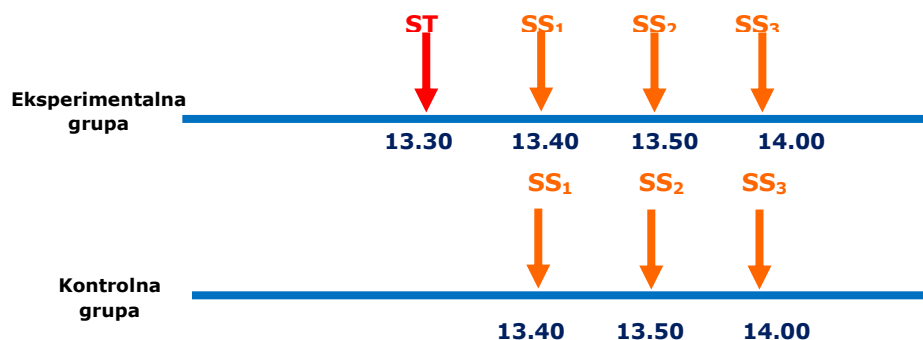
Mušice su kroz više dana u različitim vremenskim intervalima primale metamfetamin putem hrane. U eksperimentima su korištene različite koncentracije droge (0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,25 mg/mL). Droga je administrirana putem hrane tijekom više dana, a ovisno o eksperimentu administracija je vršena u različito doba dana (od 20.00h navečer do 8.00h ujutro, od 12.00h do 16.00h ili od 11.00h do 17.00h). U trenutku kada je eksperimentalna skupina primala drogu, kontrolna skupina je dobivala svježju običnu hranu.

3.4. Startle (mehanički stres) eksperimenti

Testovi su provedeni na divljem tipu (wt) *Drosophila melanogaster*, na soju *Canton S* (CS) i na mutantima *period* (*per*⁰¹) i *timeless* (*tim*⁰¹). Eksperimenti su rađeni na dva načina, ručno i mehanički pomoću Thermomixera. Mušice u monitorima primale su dvije vrste podražaja, startle podražaj (u nastavku ST) i stimulirajući podražaj (u nastavku SS). U eksperimentima su davana ukupno četiri podražaja.

Sve skupine primale su običnu hranu. U prvoj verziji pokusa, eksperimentalni monitor primao je ST podražaj tako da je monitor bio pet puta za redom podignut 3 centimetra od podloge i pušten da padne na stol, zatim su uslijedila tri SS podražaja na način da je monitor jednom podignut oko 3 centimetra od podloge i pušten da padne na stol. U drugoj verziji pokusa za izvedbu startle eksperimenata *Drosophila* monitori za aktivnost spojeni na DAMS sistem bili u kartonskoj kutiji na Eppendorf Thermomixeru-C. Eksperimentalni monitor primao je ST koji je trajao 10 sekundi i tri SS podražaja u trajanju od 3 sekunde koji je ponavljan tri puta za redom. Razmak između ST i svakog od SS bio je u različitim intervalima od 5, 10, 15 ili 20 minuta. Kontrolni monitor primao je samo tri SS podražaja. Podražaj je standardno davan na 350 o/min osim u eksperimentima manipulacije jačine podražaja (300, 350, 400 i 450 o/min). Vršena je i manipulacija trajanja ST podražaja (10, 7, 5 i 3 sekunde) na 350 o/min. Promjene u lokomotornoj aktivnosti pojedinih mušica praćene su svaku minutu pomoću DAMS sistema.

Shema 1. Vrijeme primanja ST i SS podražaja kontrolne i eksperimentalne grupe

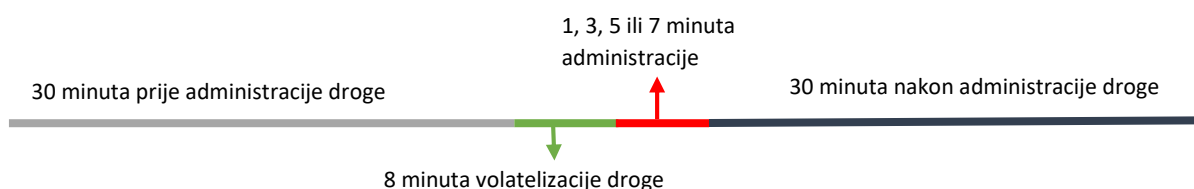


3.5. Eksperimenti volatiliziranog kokaina i metamfetamina

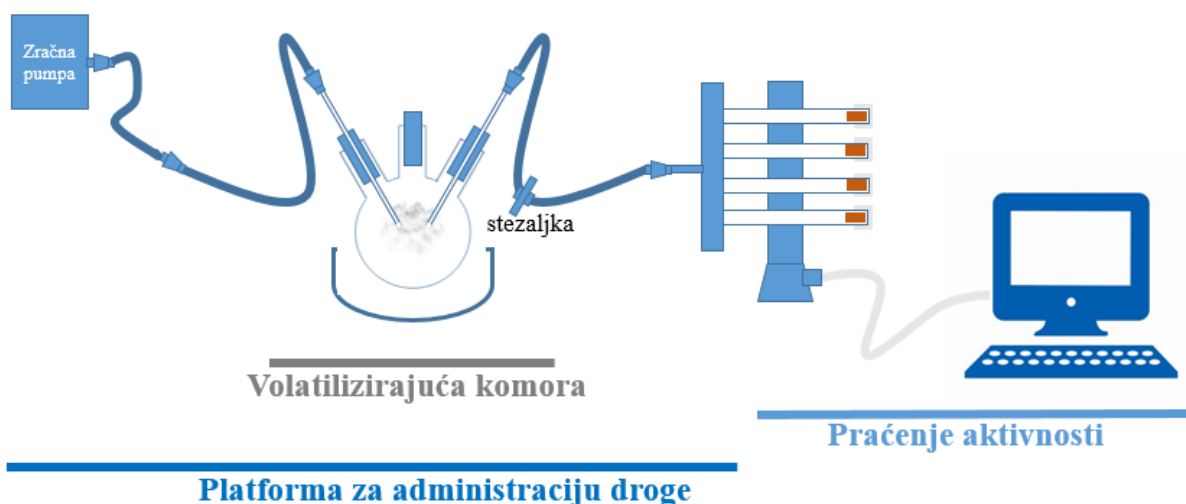
Testovi su provedeni na divljem tipu (wt) *Drosophila melanogaster*, na soju *Canton S* (CS). U eksperimentima je korištena platforma za administraciju droge i praćenje aktivnosti koja ima tri glavna dijela: komoru za zagrijavanje droge, *Drosophila* monitor za aktivnost spojen na DAMS sistem i sustav za dostavljanje kokaina. Komora se sastoji od trogrle tikvice i grijaće kape za volatilizaciju psihostimulansa kokaina ili metamfetamina. Optimizirana je temperatura grijaće kape na 100°C (više temperature dovode do izgaranja) i vrijeme za volatilizaciju na 8 minuta. Središnje grlo tikvice korišteno je za dostavu psihostimulansa. U testovima su korišteni kokain i metamfetamin otopljeni u 96% etanolu u koncentraciji od 10

mg/mL, a za jednu administraciju korišteno je 75 μ l ili 150 μ l kokain-etanol ili metamfetamin-etanol otopine. Otopine su dodavane u volatilizirajuću komoru 4 do 6 sati prije administracije kako bi eliminirali efekt etanola u eksperimentu. Bočna grla tikvice povezana su staklom i gumenim cijevima na Drosophila monitor za aktivnost na jednu, a zračna pumpa kao sustav za dostavu psihostimulansa na drugu stranu. Nakon perioda zagrijavanja od 8 minuta i isparavanja kokaina, zračna pumpa se uključivala na 1, 3, 5 ili 7 minuta s protokom zraka od 150 L/h kako bi psihostimulans bio dostavljen do cjevčice s mušicom. Administracija droge vršena je u 10.00 sati ujutro. Promjene u lokomotornoj aktivnosti pojedinih mušica praćene su svaku minutu pomoću DAMS sistema.

Shema 2. Podaci korišteni za analizu lokomotorne aktivnosti tijekom administracije droge



Shema 3. Shema eseja za volatilizaciju psihostimulansa



3.6. Statička obrada podataka

Podaci su analizirani u programu Statistica 12. Korištena je dvostruka ANOVA s ponovljenim mjerenjima i trostruka ANOVA s ponovljenim mjerenjima na druga dva faktora. Za analizu razlika unutar faktora korišten je Bonferronijev Post hoc test. P vrijednosti manje od 0,05 uzete su kao statistički značajne.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj oralne administracije METH-a na lokomotornu aktivnost

4.1.1. Dnevna administracija 0,5 mg/mL METH-a

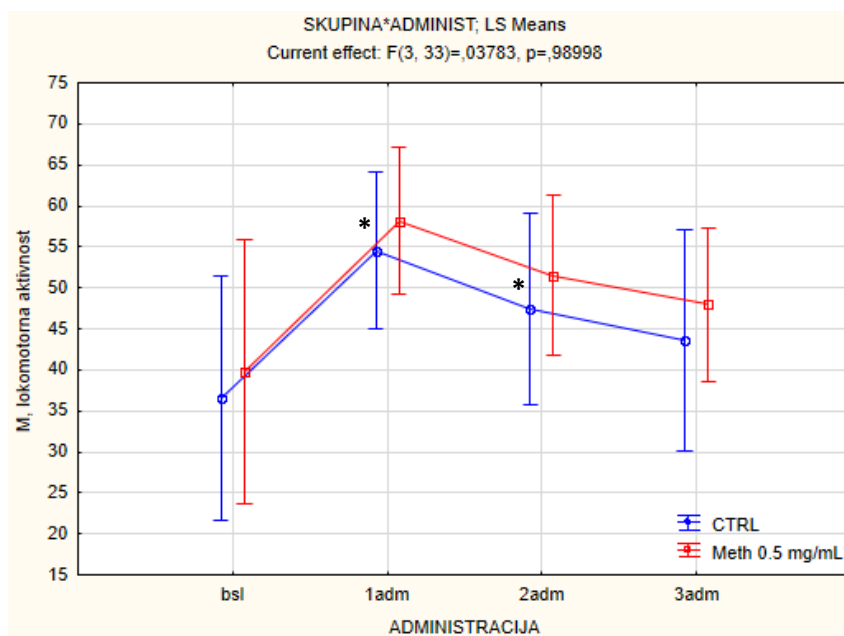
Kako bismo izazvali bihevioralnu senzitivaciju mužjake *Drosophila* smo višekratno izložili oralnoj administraciji psihostimulansa METH-a i pratili njegov utjecaj na lokomotornu aktivnost. Željeni ishod bilo bi povećanje lokomotorne aktivnosti eksperimentalne skupine prilikom svake naredne administracije za razliku od kontrolne skupine koja je primala samo običnu hranu.

U prvom pokusu koristili smo dva monitora mužjaka divljeg tipa (wt) *Drosophila*, soj *Canton S* (CS). Kontrolna skupina primala je običnu hranu, dok je eksperimentalna skupina bila izložena METH-u koncentracije 0,5 mg/mL pomiješanog s hranom tijekom tri dana u razdoblju od 11 do 17 sati.

Kako bi ispitali utjecaj skupine i administracije na lokomotornu aktivnost korištena je dvostruka 2 (skupina: kontrolna i eksperimentalna) x 4 (administracija: baseline, 1adm, 2adm, 3adm) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 1). ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta skupine na lokomotornu aktivnost, $F(1, 11)=6.23$, $p=0.030$, pri čemu je eksperimentalna skupina ($M=49.37$, $SE=4.65$) imala značajno veće kretanje u odnosu na kontrolnu skupinu ($M=45.54$, $SE=5.30$). ANOVA je također pokazala značajan efekt administracije METH-a na lokomotornu aktivnost, $F(3, 33)=12.10$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je statistički značajno nižu lokomotornu aktivnost u početnoj razini, eng. baseline, skraćeno bsl ($M=38.16$, $SE=6.98$) u odnosu na prvu administraciju, 1adm ($M=56.36$, $SE=4.06$, $p<0.001$) kao i na drugu administraciju, 2adm ($M=49.47$, $SE=4.74$, $p=0.051$). Između baseline-a i treće administracije nema razlike ($M=45.82$, $SE=4.87$, $p=0.110$). Također se pokazala značajna razlika između prve i treće administracije, $p=0.010$. Između prve i druge administracije nije bilo razlike ($p=0.193$), kao niti između druge i treće administracije ($p=1.000$). ANOVA nije pokazala značajnu interakciju između skupine i administracije droge, $F(3, 33)=0.04$, $p<0.990$.

Mjerenja pokazuju da u pokusu ima razlike između skupina, odnosno dodatak psihostimulansa u hrani doveo je do povećane aktivnosti mušica koje su primale drogu u odnosu na kontrolu. Također uočena je razlika u aktivnosti između baseline-a, prve i druge administracije u obje skupine. S obzirom da su mušice

aktivnije tijekom dana ovi rezultati upućuju na mogućnost da je promjena svježehrane u kontrolnoj skupini (CTRL) bila stimulans koji je doveo do povećanog odgovora. Iako je uočena statistički značajna razlika između baseline-a i prve i druge administracije droge u eksperimentalnoj skupini, radi sličnog odgovora kod kontrolne skupine nije moguće tvrditi da je on bio posljedica METH-a.



Slika 1. Oralna administracija METH-a tijekom dana ne dovodi do senzitivirajućeg odgovora

Prikaz srednje vrijednosti ukupne dnevne aktivnosti mužjaka koji su primali običnu hranu (CTRL, n=32) ili hranu pomiješanu s METH-om koncentracije 0,5 mg/mL (Meth 0,5 mg/mL, n=32) tijekom tri dana u razdoblju od 11 do 17 sati. Prosječna lokomotorna aktivnost grupe mušica prije administracije (bsl), uspoređena je s lokomotornom aktivnošću za vrijeme prve (1adm), druge (2adm) i treće (3adm) administracije. Razlike su izračunate pomoću Bonferronijevog Post hoc testa i pokazano je da postoji statistički značajna razlika između baseline-a i prve i druge administracije u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi ($p < 0.01$), kao i između prve i treće administracije u obje grupe ($p < 0.05$).

4.1.2. Noćna administracija 1,25 mg/mL METH-a

Kako administracija METH-a danju nije dovela do željenog povećanja aktivnosti nakon uzastopnih administracija, pokušali smo administrirati METH tijekom noći. Ovom eksperimentu prethodio pokus gdje su mušice tijekom tri dana bile izložene

0,5 mg/mL u razdoblju od 20 sati navečer do 8 sati ujutro. Rezultati tog eksperimenta nisu prikazani u ovom diplomskom radu jer se nisu pokazale statistički značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti, što upućuje na premalu koncentraciju METH-a. Stoga smo ponovili eksperiment s povećanom koncentracijom METH-a na 1,25 mg/mL.

Kako bi ispitali utjecaj skupine i administracije na lokomotornu aktivnost korištena je dvostruka 2 (skupina: kontrolna i eksperimentalna) x 5 (administracija: baseline, 1adm, 2adm, 3adm, 4adm) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 2). ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta skupine na lokomotornu aktivnost, $F(1, 11)=53.454$, $p<0.001$, pri čemu je eksperimentalna skupina ($M=49.07$, $SE=4.91$) imala značajno veće kretanje u odnosu na kontrolnu skupinu ($M=24.81$, $SE=7.44$).

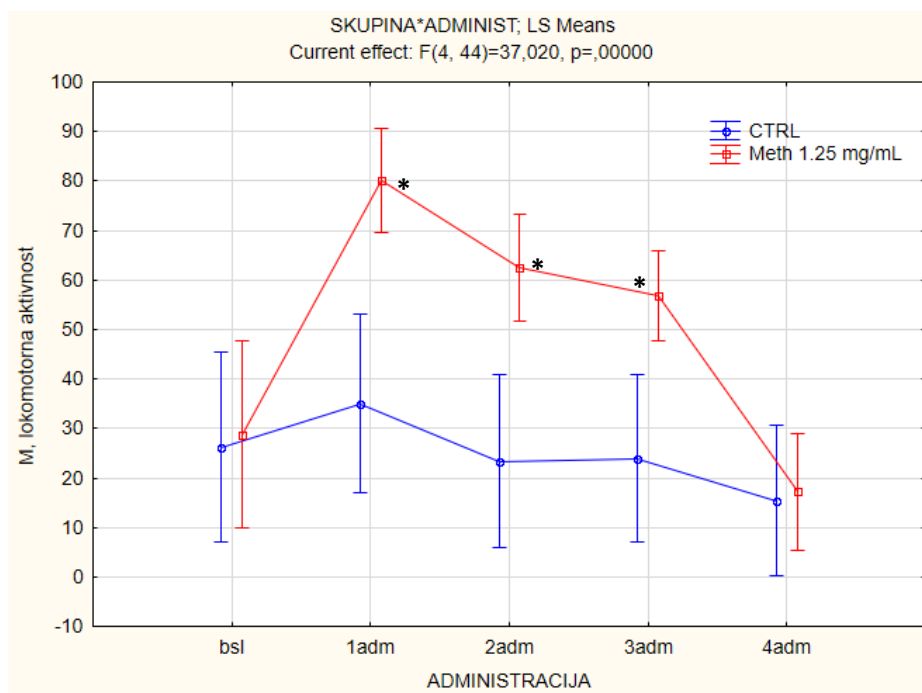
ANOVA je također pokazala značajan efekt administracije METH-a na lokomotornu aktivnost, $F(4, 44)=34.40$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je statistički značajno nižu lokomotornu aktivnost baseline-a ($M=27.54$, $SE=8.51$) u odnosu na prvu ($M=57.58$, $SE=6.09$, $p<0.001$), drugu ($M=42.91$, $SE=6.02$, $p=0.002$) i treću ($M=40.37$, $SE=5.56$, $p=0.015$), dok je u odnosu na četvrtu administraciju ona bila viša ($M=16.31$, $SE=6.08$, $p=0.049$). Prva administracija je bila značajno viša u odnosu na drugu ($p=0.004$), treću ($p<0.001$) i četvrtu ($p<0.001$). Između druge i treće administracije nije bilo značajne razlike ($p=1,000$), no interesantno je kako je četvrta administracija pokazala najnižu lokomotornu aktivnost u odnosu na sve prethodne administracije, uključujući i baseline.

ANOVA je pokazala postojanje značajne interakcije između skupina i administracije droge, $F(4, 44)=37.02$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je da nema statistički značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti između kontrolne i eksperimentalne skupine u baseline mjerenju ($p=1.000$) kao niti u četvrtoj administraciji METH-a ($p=1.000$). S druge strane pokazala se statistički značajna razlika između skupina u prvoj, drugoj i trećoj administraciji, pri čemu eksperimentalna grupa pokazuje značajno višu lokomotornu aktivnost u odnosu na kontrolnu ($p<0.001$). Zbog jednostavnosti prikaza aritmetičke sredine i standardne devijacije prikazane su u tablici.

Mjerenja pokazuju da postoji razlika između skupina, odnosno oralna administracija METH-a tijekom noći dovodi do povećane noćne aktivnosti mušica koje su primale drogu u odnosu na kontrolnu skupinu, osim u četvrtoj administraciji. Potvrđeno je da akutna, prva doza metamfetamina dovodi do povećanja lokomotorne aktivnosti. S obzirom na to da je uočeno smanjenje lokomotorne aktivnosti tijekom višestrukih administracija Metha 1.25 mg/mL tijekom noći, ovi rezultati ukazuju da oralna administracija METH-a dovodi do pojave tolerancije kod mušica.

Tablica 1. Deskriptivna statistika lokomotorne aktivnosti kontrolne (CTRL) i eksperimentalne skupine (Meth 1.25 mg/mL)

	CTRL					Meth 1,25 mg/mL				
	bsl	1adm	2adm	3adm	4adm	bsl	1adm	2adm	3adm	4adm
M	26,25	35,07	23,41	23,95	15,39	28,83	80,09	62,41	56,78	17,23
SE	8,67	8,18	7,91	7,72	6,92	8,55	4,80	4,90	4,10	5,34



Slika 2. Oralna administracija METH-a tijekom noći dovodi do tolerancije

Prikaz značajne interakcije skupine i administracije na lokomotornu aktivnost mužjaka koji su primali običnu hranu (CTRL, n=32) ili hranu pomiješanu s METH-om koncentracije 1,25 mg/mL (Meth 1,25 mg/mL, n=32) tijekom četiri dana u razdoblju od 20 sati navečer do 8 sati ujutro. Prosječna lokomotorna aktivnost grupe mušica prije administracije (bsl),

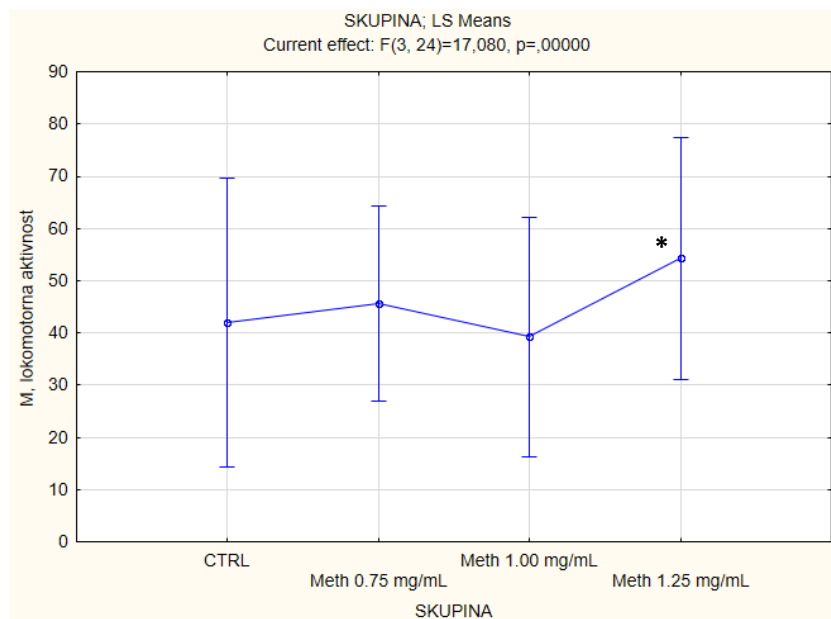
uspoređena je s lokomotornom aktivnošću za vrijeme prve (1adm), druge (2adm), treće (3adm) i četvrte (4adm) administracije. Razlike su izračunate pomoću Bonferronijevog Post hoc testa.

4.1.3. Utjecaj koncentracije METH-a i administracije kod CS i *tim* mušica

Sljedećim eksperimentom željeli smo ustanoviti dovode li više koncentracije METH-a do povećane lokomotorne aktivnosti uslijed uzastopnih administracija. Eksperiment je proveden na mužjacima *Drosophila*, na soju *Canton S* (CS), i na mušicama s mutacijama u cirkadijalnim genima *period* (*per*⁰¹ – rezultati nisu prikazani radi nekonzistentnih vrijednosti) i *timeless* (*tim*⁰¹). Eksperimentalne skupine bile su izložene metamfetaminu koncentracija 0,75, 1,00 i 1,25 mg/mL pomiješanog s hranom tijekom tri dana u razdoblju od 12 do 16 sati. Mutanti *per* i *tim* služe za validaciju metode, obzirom da je u eksperimentima s volatiliziranim kokainom pokazano da *per* gen sudjeluje u procesu razvoja bihevioralne senzitivacije, dok *tim* gen ne sudjeluje (normalna senzitivacija kod *tim* mutanata).

Kako bi ispitali utjecaj skupine i administracije na lokomotornu aktivnost korištena je trostruka 2 (vrsta mušica: CS, *tim*) x 4 (količina METH: CTRL, 0.75, 1.00, 1.25 mg/mL) x 4 (administracija: bsl, 1adm, 2adm, 3adm, 4adm). ANOVA s ponovljenim mjerenjima na druga dva faktora (Slika 3). ANOVA nije pokazala postojanje značajnog efekta vrste muhe na lokomotornu aktivnost, $F(1, 8)=1.08$, $p=0.329$, što znači da nema razlike u odgovoru između CS i *tim* mušica.

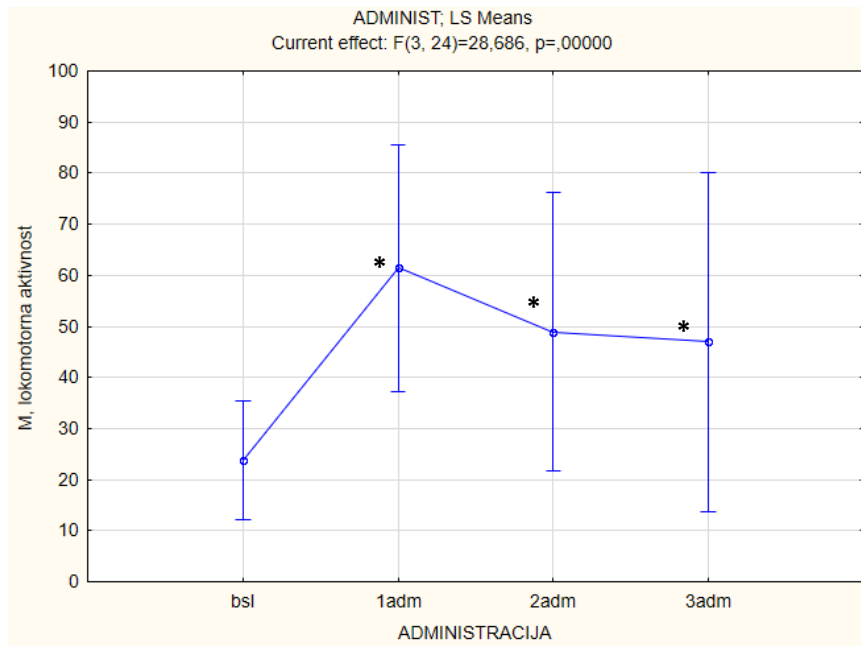
ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta skupine na lokomotornu aktivnost $F(3, 24)=17.08$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je kako eksperimentalna skupina koja je primala 1.25 mg/mL METH-a ima značajno veću lokomotornu aktivnost ($M=54.25$, $SE=5.01$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($M=41.95$, $SE=5.99$, $p<0.001$), skupinu koja je primala 0.75 mg/mL METH-a ($M=45.65$, $SE=4.04$, $p=0.005$) i skupinu koja je primala 1.00 mg/mL METH-a ($M=39.22$, $SE=4.98$, $p<0.001$). Među ostalim skupinama nije bilo značajnih razlika (Slika 3A).



Slika 3A. Oralna administracija METH-a tijekom dana značajno povećava lokomotornu aktivnost u CS i *tim⁰¹* mušica, ali samo kod skupine koja je primala 1.25 mg/mL. Kod ostalih skupina nema značajne razlike.

Također, ANOVA je pokazala značajan utjecaj administracije METH-a na lokomotornu aktivnost $F(3, 24)=28.69, p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je značajno manju lokomotornu aktivnost mušica na baseline mjerenju ($M=23.80, SE=2.51$) u odnosu na 1adm ($M=61.43, SE=5.23, p<0.001$), 2adm ($M=48.87, SE=5.91, p<0.001$) i 3adm ($M=46.98, SE=7.20, p<0.001$). Nadalje, prva administracija je uzrokovala značajno veću aktivnost u odnosu na drugu ($p=0.035$) i treću administraciju ($p=0.011$) METH-a (Slika 3B). Između druge i treće administracije droge nije bilo značajne razlike u odgovoru. Interakcije varijabli na lokomotornu aktivnost nisu se pokazale značajnima. U odnosu na prvu administraciju, druga i treća administracija uvijek daju niži odgovor od prve, što opet kao u prethodnom eksperimentu upućuje na razvoj tolerancije mušica na METH.

Osim toga, ponovno je uočen problem značajnog povećanja odgovora kod kontrola. Zbog nestabilnosti baseline-a rezultati za *per* mutant nisu prikazani, ali uzastopne administracije METH-a nisu dovele do promijenjenog odgovora lokomotorne aktivnosti što se podudara s publiciranim rezultatima koji pokazuju da je *per* gen uvjet za razvoj bihevioralne senzitivacije.



Slika 3B. Oralna administracija METH-a tijekom dana značajno povećava lokomotornu aktivnost u CS i *tim⁰¹* mušica, ali to ne dovodi do senzitiviranog odgovora

Prikaz srednje vrijednosti lokomotorne aktivnosti (od 12 do 16 sati) CS i *tim* mužjaka koji su primali običnu hranu (ctrl n=16, *per* n=16, *tim* n=16) ili hranu pomiješanu s METH-om koncentracije 0,75 mg/mL (ctrl n=16, *per* n=16, *tim* n=16), 1,00 mg/mL (ctrl n=16, *per* n=16, *tim* n=16) i 1,25 mg/mL (ctrl n=16, *per* n=16, *tim* n=16). Podaci su analizirani Bonferronijevim Post hoc testom. Prosječna lokomotorna aktivnost skupina mušica prije administracije (bsl), uspoređena je s lokomotornom aktivnošću za vrijeme prve (1adm), druge (2adm), treće (3adm) administracije.

4.1.4. Utjecaj prebacivanja na svježju hranu kod CS i *per* mušica

S obzirom na to da su mušice kontrolne skupine koja je primala svježju hranu u svim danima izvođenja prethodnih pokusa pokazivale povećanu aktivnost nakon prebacivanja na svježju hranu u odnosu na početni baseline, četvrti eksperiment je uključivao kontrolnu skupinu koja je tijekom pet dana pokusa mirovala. Kako bi provjerili utječu li čin prebacivanja mušica na svježju hranu i mehanički stres kojeg pritom dožive na povećanu lokomociju, imali smo i dvije eksperimentalne grupe; prva je jednom dnevno u 8 sati ujutro primala svježju hranu, dok ju je druga grupa primala dva puta dnevno u 8 ujutro i 20 sati navečer. Eksperiment je proveden na mužjacima *Drosophila*, na soju *Canton S* (CS) i na mutantu *period* (*per⁰¹*).

Kako bi ispitali utjecaj skupine i administracije na lokomotornu aktivnost korištena je trostruka 2 (vrsta mušica: CS, *per*) x 3 (prebacivanje muha: CTRL koja miruje, prebacivanje u 8 ujutro, prebacivanje u 8 ujutro i 8 navečer) x 6 (broj dana izvođenja pokusa: bsl, 1.dan, 2.dan, 3.dan, 4.dan, 5.dan) ANOVA s ponovljenim mjerenjima na druga dva faktora (Slika 4). ANOVA nije pokazala postojanje značajnog efekta vrste muhe na lokomotornu aktivnost, $F(1, 46)=0.92$, $p=0.343$, što znači da nema razlike u odgovoru između CS i *per* mušica.

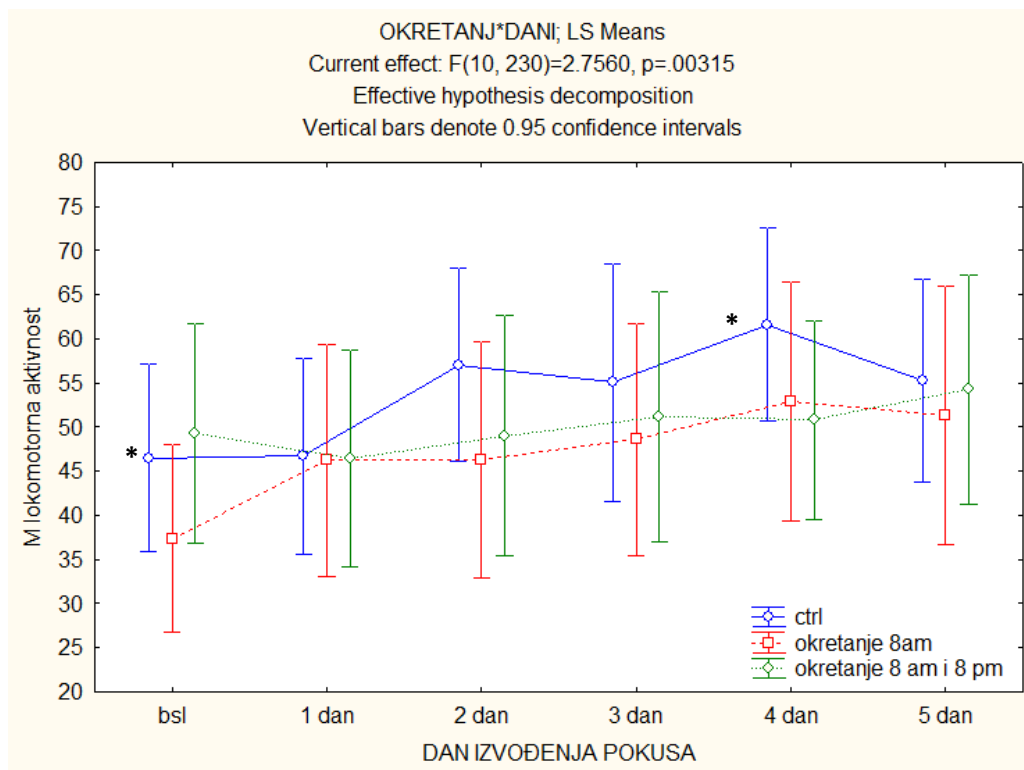
ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta prebacivanja mušica na lokomotornu aktivnost $F(2, 92)=5.16$, $p=0.007$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je značajno veću lokomotornu aktivnost kontrolne skupine ($M=47.70$, $SE=4.64$) u odnosu na eksperimentalnu skupinu koja je primala svježu hranu u 8 ujutro ($M=42.15$, $SE=5.33$, $p=0.007$). Među ostalim skupinama nije bilo značajnih razlika.

Također, ANOVA je pokazala značajan utjecaj ponovljenih prebacivanja mušica tijekom svih dana izvođenja pokusa na lokomotornu aktivnost $F(5, 230)=8.71$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je značajno manju lokomotornu aktivnost mušica na baseline mjerenju ($M=36.97$, $SE=4.57$) u odnosu na prvi ($M=44.67$, $SE=5.82$, $p<0.009$), drugi ($M=45.11$, $SE=5.64$, $p=0.004$), treći ($M=47.03$, $SE=5.80$, $p<0.001$), četvrti ($M=50.56$, $SE=5.40$, $p<0.001$) i peti dan izvođenja pokusa ($M=47.73$, $SE=5.20$, $p<0.001$). Među danima izvođenja pokusa nije bilo statistički značajnih razlika.

ANOVA je pokazala postojanje značajne interakcije između prebacivanja mušica i broja dana izvođenja pokusa, $F(10, 460)=2.03$, $p<0.001$. Do značajnosti interakcije došlo je zbog značajno više lokomotorne aktivnosti kontrolne skupine u odnosu na eksperimentalnu skupinu koja je primala svježu hranu u 8 ujutro u dva mjerenja (baseline i 4.dan izvođenja pokusa, $p<0.001$). Također, u baseline mjerenju eksperimentalna grupa koja je primala svježu hranu u 8 ujutro i 8 navečer je imala značajno višu lokomotornu aktivnost u odnosu na onu koja je primala svježu hranu u 8 ujutro ($p=0.010$).

Mjerenja pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između eksperimentalnih skupina tijekom okretanja mušica jednom ili dva puta dnevno, ali postoji razlika u odnosu na kontrolnu skupinu koja je mirovala tijekom pet dana izvođenja aktivnosti. Efekti koje smo dobili ne pokazuju jasan efekt prebacivanja

mušica na hranu jer je i skupina koja je mirovala tijekom svih dana eksperimenta mijenjala aktivnosti. Te promjene su možda posljedica trešnje police prilikom vađenja monitora iz inkubatora što može ukazivati na to da mehanički utjecaji imaju ulogu u aktivnosti mušica što je u ovom eksperimentu dovelo do statistički značajnih razlika. Stoga smo odlučili provesti sljedeći niz kontroliranih eksperimenata mehaničkim stresom.



Slika 4. Prikaz srednje vrijednosti ukupne 24-satne aktivnosti mužjaka koji su mirovali (ctrl CS, n=32, ctrl per n=32) ili primali dva puta dnevno (8 ujutro i 20 sati navečer, CS n=32, per n=32) ili jednom dnevno (8 sati ujutro, CS n=32, per n=32) svježu običnu hranu tijekom pet dana.

4.2. Utjecaj startle efekta (mehaničkog stresa) na lokomotornu aktivnost mušica eksperimentalne grupe

Kako bi ispitali u kojoj mjeri mehaničke manipulacije utječu na povećanje lokomocije, mušice smo izložili mehaničkom stimulansu. Koristili smo modifikaciju protokola za izazivanje lokomotorne aktivnosti (ref. Anderson i Tully), gdje smo koristili dvije vrste podražaja, jaki šok stimulus, STartle (ST) i blaži Senzitivirajući Stimulus (SS). Kako ovakvi publicirani eksperimenti mjere kratkotrajnu senzitivaciju koja traje kraće od 30 minuta, razvili smo novi protokol kako bi replicirali publicirane rezultate i testirali utječu li cirkadijalni geni na tu vrstu senzitivacije.

4.2.1. Ručno izvođenje eksperimenta

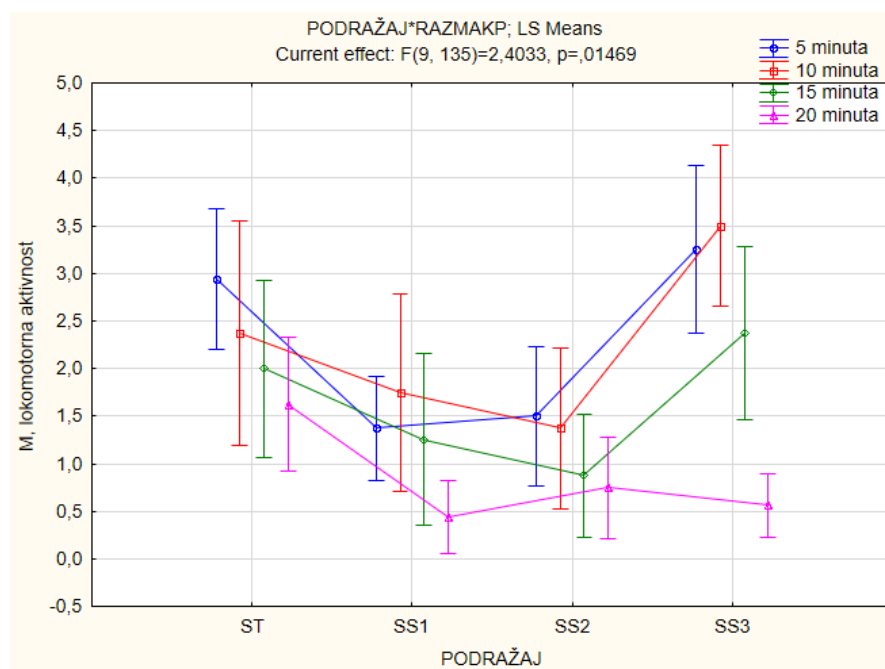
Sve mušice su primale običnu hranu i svaki od monitora primio je po četiri podražaja, jedan ST gdje je monitor bio pet puta podignut oko 3 centimetra od podloge i pušten da padne na stol i tri SS podražaja kada je monitor bio jednom podignut od podloge oko 3 centimetra i pušten da padne na stol. Razmak između ST i svakog od SS podražaja bio je različit za pojedini monitor (5, 10, 15 i 20 minuta).

Kako bi ispitali vrste podražaja i razmaka između podražaja na lokomotornu aktivnost korištena je dvostruka 4 (vrsta podražaja: ST, SS1, SS2, SS3) x 4 (razmak između podražaja: 5, 10, 15, 20 minuta) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 5). ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta vrste podražaja na lokomotornu aktivnost, $F(3, 45)=17.18, p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je značajno veću lokomotornu aktivnost mušica nakon primljenog ST podražaja ($M=2.23, SE=0.28$) u odnosu na SS1 ($M=1.20, SE=0.20, p<0.001$) i SS2 ($M=1.13, SE=0.15, p<0.001$), dok razlike u odnosu ST i SS3 ($M=2.42, SE=0.13, p=1.000$) podražaja nije bilo. Važno, SS3 podražaj uzrokuje značajno veći odgovor od SS1 i SS2 podražaja ($p<0.001$).

ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta razmaka danih podražaja na lokomotornu aktivnost, $F(3, 45)=7.97, p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je značajno nižu lokomotornu aktivnost mušica koje su primile podražaje u razmaku od 20 minuta ($M=0.84, SE=0.18$) u odnosu na podražaje u razmaku od 5 ($M=2.27, SE=0.20, p<0.001$) i 10 minuta ($M=2.25, SE=0.30, p<0.001$).

Osim toga pokazala se značajna interakcija između vrste danih podražaja i razmaka u kojem su davani podražaji, $F(9, 135)=2.40$, $p<0.015$. Do značajnosti interakcije došlo je zbog značajno snižene lokomotorne aktivnosti SS3 podražaja danom u 20 minutnom razmaku u odnosu na podražaje dane u 5, 10 i 15 minutnom razmaku ($p<0.001$).

Mjerenja pokazuju da ST i SS3 podražaji kod svih skupina pokazuju veći odgovor kod mušica u odnosu na SS1 i SS2 podražaj. Odnosno, mušice su najjače reagirale na prvi neočekivani podražaj, a potom se odgovor smanjivao, što upućuje na to da se mušice adaptiraju na udarac i razvija se tolerancija. Odgovor na SS3 podražaj bio je jači nego li na SS1 i SS2, što upućuje na razvoj senzitivacije. Kako su ovi eksperimenti provedeni ručno te mušice nisu primale standardiziranu jačinu udarca, nije moguće s točnošću zaključiti ako je SS3 odgovor senzitivacija ili posljedica jačeg udarca.



Slika 5. Mehanički stimulans ima utjecaj na lokomotornu aktivnost mušica

Prikaz srednje vrijednosti aktivnosti mužjaka unutar jedne minute kada je dan ST ili SS podražaj (5min $n=32$, 10min $n=32$, 15 min $n=32$, 20min $n=32$). Svaki monitor primio je četiri podražaja, prvi ST kada je monitor podignut pet puta 3 cm od podloge i pušten da padne na stol i tri SS podražaja kada je ista radnja ponovljena samo jednom. Podaci su analizirani Bonferronijevim Post hoc testom. Pokazano je da mehanički stimulans uzrokuje povećanje lokomocije mužjaka *Drosophila* jer mjerenja pokazuju da ST i SS3 podražaji kod svih skupina pokazuju veći odgovor kod mušica u odnosu na SS1 i SS2 podražaj.

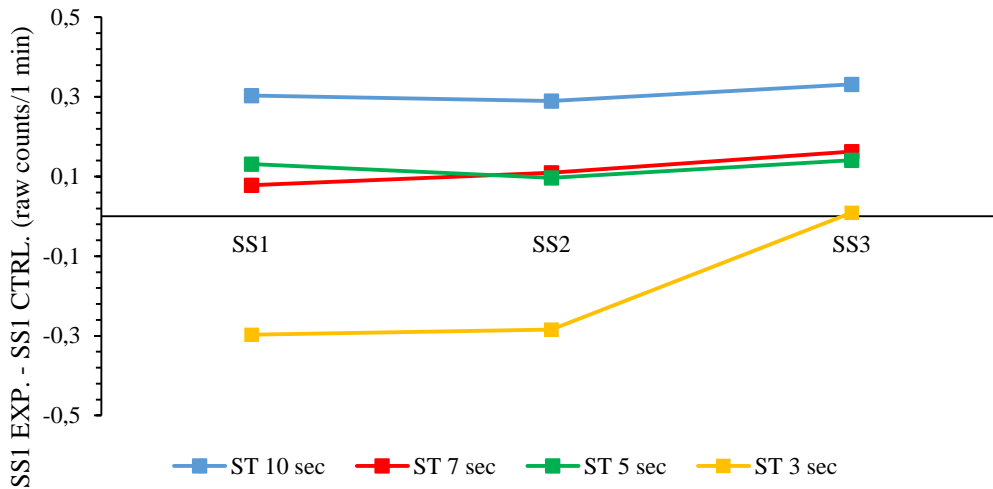
4.2.2. Eksperimenti izvođeni pomoću vibracijskog uređaja

Kako bi izbjegli subjektivnost prethodnog pokusa u narednim eksperimentima korišten je vibracijski uređaj Thermomixer C te smo ispitali utječe li dužina ili jačina ST podražaja na odgovor mušica. Mijenjali smo dužinu trajanja ST podražaja, tako da je trajao 10, 7, 5 i 3 sekunde na 350 o/min. Testirali smo četiri jačine ST podražaja: 300, 350, 400 i 450 o/min u trajanju od 10 sekundi. Sva tri SS podražaja davana su u trajanju od 3 sekunde na 350 o/min i vremenskim razmakom od 10 minuta. Za razliku od prethodnog eksperimenta gdje je provedena analiza unutar skupine, ovdje smo proveli usporedbu među skupinama: skupina koja je primala ST i 3 SS podražaja, u odnosu na skupinu koja je primila samo 3 SS. Podaci su analizirani tako da je plotirana razlika između jačina odgovora eksperimentalne skupine koja je primila ST, i kontrolne koja nije (Slika 6). Prethodni publicirani rezultati u kojima je mjerena bihevioralna senzitivacija kod *Drosophila* koristili su razliku između skupina koje su primile ST podražaj kao mjeru senzitivacije (26).

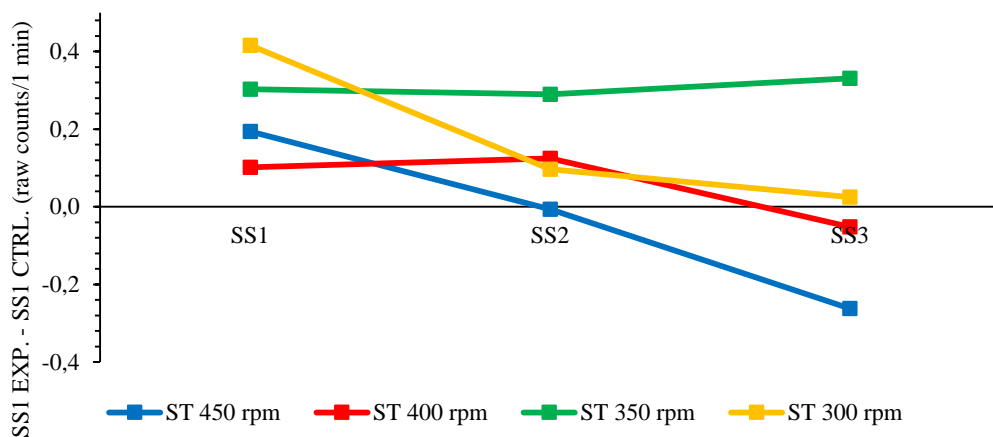
Slika 6A pokazuje da je lokomotorna aktivnost ovisna o dužini trajanja ST podražaja, tako da mušice koje su primile ST podražaj u trajanju od 10 sekundi pokazuju najveći odgovor, a mušice koje su primile ST podražaj u trajanju od 3 sekunde pokazuju najmanji odgovor. Odnosno, što ST podražaj duže traje intenzitet SS odgovora eksperimentalne skupine je veći. Smanjenjem ST podražaja smanjuje se intenzitet SS odgovora eksperimentalne skupine, a kontrolne povećava.

Jačina ST podražaja utjecala je na lokomotornu aktivnost nakon SS podražaja tako da su mušice eksperimentalne skupine koje su primile ST podražaj na 350 o/min pokazale konzistentno najveći odgovor nakon sva tri SS podražaja, a lokomotorna aktivnost nakon SS podražaja se smanjuje kod skupina koje su primile ST podražaj jačine 300, 400 i 450 o/min (Slika 6B). Dakle ST podražaj u trajanju od 10 sekundi jačine 350 o/min daje najbolji odgovor, tako da nakon svakog sljedećeg SS podražaja eksperimentalna skupina odgovara jače od kontrolne.

6.A Utjecaj dužine ST podražaja jačine 350 o/min na lokomotornu aktivnost nakon SS podražaja



6.B Utjecaj jačine ST podražaja u trajanju od 10 sekundi na lokomotornu aktivnost nakon SS podražaja



Slika 6. ST podražaj u trajanju od 10 sekundi jačine 350 o/min utječe na lokomotornu aktivnost mušica

Prikaz razlike srednjih vrijednosti aktivnosti (tijekom 10 minuta) mužjaka eksperimentalne i kontrolne skupine SS podražaja (n=32 u svim grupama). Mušice koje su primile ST podražaj u trajanju od 10 sekundi na 350 o/min pokazuju najveći odgovor, dok mušice koje su primile ST podražaj u trajanju od 3 sekunde na 350 o/min pokazuju najmanji odgovor (Slika 6A). Mušice koje su primile ST podražaj na 350 o/min pokazuju najveći odgovor nakon sva tri SS podražaja, u odnosu na one koje su primile ST podražaj jačine 300, 400 i 450 o/min (Slika 6B).

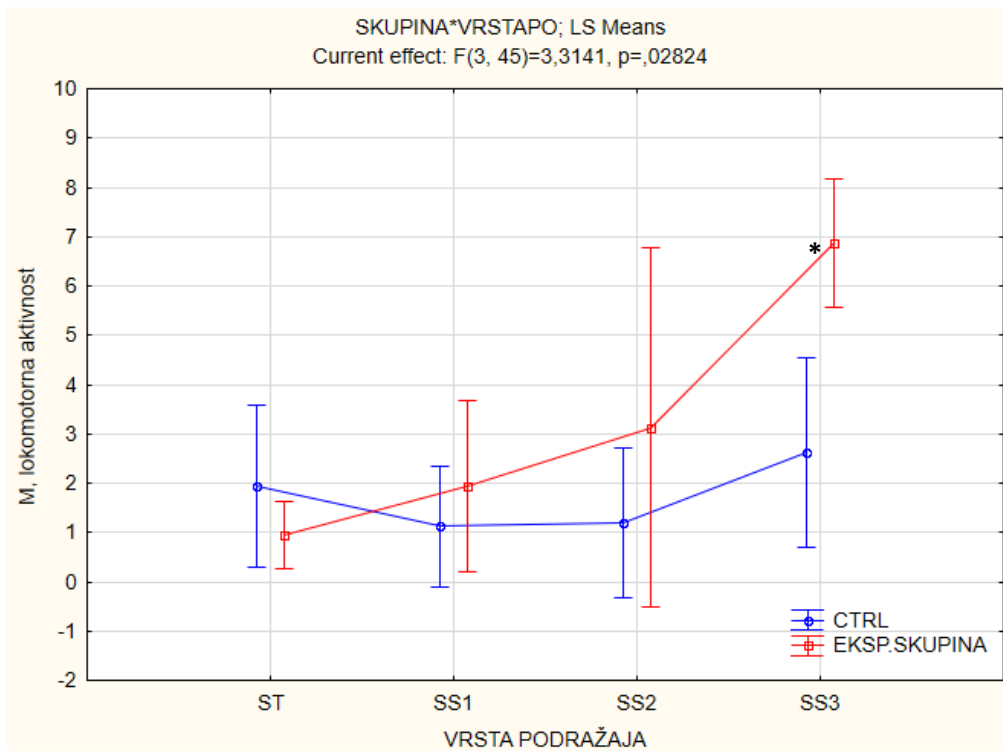
U sljedećim eksperimentima smo koristili ST podražaj u trajanju od 10 sekundi, jačine 350 o/min. Eksperimentalna skupina primila je ST podražaj i tri SS podražaja jačine 350 o/min u trajanju od 3 sekunde. Kontrolna skupina primila je samo tri SS podražaja. Svi podražaji davani su u razmaku od 10 minuta.

Kako bi ispitali utjecaj skupine i vrste podražaja na lokomotornu aktivnost korištena je dvostruka 2 (skupina: kontrolna i eksperimentalna) x 4 (vrsta podražaja: ST, SS1, SS2, SS3) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 7).

ANOVA je pokazala da nema značajnog efekta skupine na lokomotornu aktivnost, $F(1, 15)=3.75$, $p=0.071$, odnosno nema statistički značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti između kontrolne i eksperimentalne skupine. ANOVA je pokazala značajan efekt vrste podražaja na lokomotornu aktivnost, $F(3, 45)=7.18$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je statistički značajno višu lokomotornu aktivnost mušica nakon primljenog SS3 podražaja ($M=4.75$, $SE=0.54$) u odnosu na ST podražaj ($M=1.44$, $SE=0.37$, $p=0.001$), SS1 podražaj ($M=1.53$, $SE=0.43$, $p=0.002$) te SS2 podražaja ($M=2.16$, $SE=0.92$, $p=0.017$) Statistički značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti između ostalih podražaja nije bilo ($p=1.000$).

ANOVA je također pokazala značajnu interakciju između skupine i vrste primljenih podražaja, $F(3, 45)=3.31$, $p=0.028$. Do značajnosti interakcije došlo je zbog značajno više lokomotorne aktivnosti eksperimentalne skupine nakon primitka posljednjeg SS3 podražaja u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije primila ST podražaj ($p=0.028$).

Mjerenja pokazuju da kontrolna skupina koja nije primila ST podražaj pokazuje približno jednak odgovor tijekom svakog od primljenih SS podražaja (Slika 7). Eksperimentalna skupina koja je primila ST svakim idućim SS podražajem pokazuje stepenasto povećanje odgovora, ali statistički značajno tek nakon SS3 podražaja. Povećanje lokomocije mušica eksperimentalne skupine ukazuje na bihevioralnu senzitivaciju kod divljeg tipa mušica. Isti eksperiment napravljen je i na mušicama koje nose nul mutacije u *per* i *tim* genima, ali navedeni protokol ne izaziva bihevioralnu senzitivaciju kod cirkadijalnih mutanata (rezultati nisu prikazani).



Slika 7. ST podražaj uzrokuje bihevioralnu senzitivaciju kod mužjaka *Drosophila*

Prikaz srednje vrijednosti aktivnosti mužjaka unutar jedne minute kada je dan ST ili SS podražaj (ctrl n=32, exp n=32). Eksperimentalna skupina primila je ST podražaj u trajanju od 10 sekundi i tri SS podražaja jačine 350 o/min u trajanju od 3 sekunde. Podaci su analizirani u Bonferronijevim Post hoc testom. Pokazano je da ST podražaj koji je primila eksperimentalna skupina uzrokuje bihevioralnu senzitivaciju kod mužjaka *Drosophila*.

4.3. Utjecaj aerosola COC i METH na lokomotornu aktivnost mušica

Kako eksperimenti oralne administracije dovode do tolerancije te kako su svojstva podražaja koji izazivaju habituaciju i senzitivaciju slična kod *Drosophila* i ostalih životinjskih modela, odlučili smo modificirati svojstva podražaja kako bi optimizirali razvoj senzitivacije. Tako je razvijena metoda volatilizirane droge u staklenoj tikvici koja je cijevima spojena na monitor koji omogućava visokoprotoknu metodu za induciranje akutnog odgovora na psihostimulans. Kako bismo ispitali bihevioralne efekte psihostimulansa mušice smo izložili aerosolu kokaina i metamfetamina i pratili njihov utjecaj na lokomotornu aktivnost. Htjeli smo vidjeti hoće li se aktivnost mušica koje primaju volatilizirani kokain ili metamfetamin mijenjati ovisno o dozi i vremenu izloženosti. Mušice su primale 75 μ L ili 150 μ L COC-etanol ili METH-etanol otopine i bile su izložene aerosolu psihostimulansa 1, 3, 5 ili 7 minuta. Administracija droge vršena je u 10.00 sati ujutro.

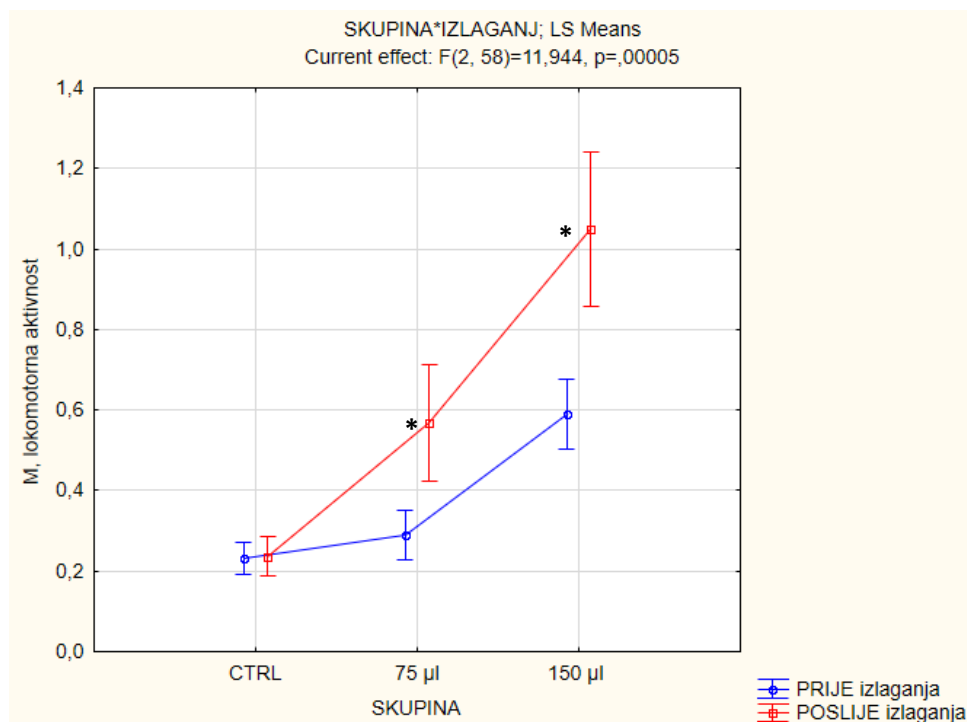
4.3.1. Volatilizirani kokain

Kako bi ispitali utjecaj skupine i izlaganja volatiliziranom kokainu na lokomotornu aktivnost u ovisnosti o dozi korištena je dvostruka 3 (skupina: CTRL, 75 μ L, 150 μ L vol COC-a) x 2 (izlaganje: prije, poslije volatilizacije) ANOVA s ponovljenim mjerenjima. ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta skupine na lokomotornu aktivnost, $F(2, 58)=86.70$, $p<0.001$, pri čemu je Bonferronijev Post hoc test pokazao da su eksperimentalne skupine koje su primale 75 μ L ($M=0.43$, $SE=0.04$) i 150 μ L ($M=0.82$, $SE=0.05$) volatiliziranog kokaina imale značajno veće kretanje u odnosu na kontrolnu skupinu ($M=0.23$, $SE=0.01$, $p<0.001$) (Slika 8A). Također je skupina koja je primala 150 μ L imala značajno veće kretanje u odnosu na skupinu koja je primala 75 μ L volatiliziranog kokaina ($p<0.001$).

ANOVA je također pokazala značajan efekt izlaganja volatiliziranom kokainu na lokomotornu aktivnost, $F(1, 29)=18.85$, $p<0.001$. Rezultati su pokazali statistički značajno nižu lokomotornu aktivnost prije ($M=0.37$, $SE=0.02$) u odnosu na aktivnost nakon izlaganja volatiliziranom kokainu ($M=0.62$, $SE=0.05$, $p<0.001$).

ANOVA je pokazala postojanje značajne interakcije između skupina i izlaganja volatiliziranom kokainu, $F(2, 58)=11.94$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je da nema statistički značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti u kontrolnoj skupini prije ($M=0.23$, $SE=0.02$) u odnosu na aktivnost poslije izlaganja ($M=0.23$, $SE=0.02$, $p=1.000$). Kod skupina koje su primale 75 μ L ili 150 μ L postoji

značajno viša lokomotorna aktivnost poslije izlaganja (M 75 μ l=0.57, SE =0.07, M 150 μ l=1.05, SE =0.09) u odnosu na vrijeme prije izlaganja volatiliziranom kokainu (M 75 μ l=0.29, SE =0.03, p =0.001, M 150 μ l=0.59, SE =0.04, p <0.001).



Slika 8A. Administracija volatiliziranog kokaina značajno povećava lokomotornu aktivnost mušica u odgovoru ovisnom o dozi

Prikaz srednje vrijednosti lokomotorne aktivnosti (30 minuta prije i poslije izlaganja volatiliziranom kokainu) CS mužjaka (ctrl n=32, 75 μ l n=32, 150 μ l n=32). Podaci su analizirani Bonferronijevim Post hoc testom.

Kako bi ispitali utjecaj izlaganja i trajanja izloženosti 75 μ l volatiliziranom kokainu na lokomotornu aktivnost u ovisnosti o dužini vremenskoj izloženosti korištena je dvostruka 2 (izlaganje: prije, poslije volatilizacije) x 5 (trajanje izloženosti skupine: CTRL, 1, 3, 5, 7 minuta) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 8B). ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta izlaganja na lokomotornu aktivnost, F (1, 29)=147.45, p <0.001, pri čemu su mušice nakon izlaganja volatiliziranom kokainu (M =0.72, SE =0.04) imale značajno veće kretanje u odnosu na vrijeme prije izlaganja (M =0.16, SE =0.01, p <0.001).

ANOVA je također pokazala značajan efekt trajanja izloženosti volatiliziranom kokainu na lokomotornu aktivnost, F (4, 116)=38.38, p <0.001. Bonferronijev Post

hoc test pokazao je kako je kontrolna skupina imala značajno nižu aktivnost u odnosu na sve ostale skupine, $p < 0.001$ (Tablica 2). Skupina koja je bila izložena 1 minutu imala je značajno nižu aktivnost u odnosu na skupine izložene 5 minuta ($p = 0.005$) i 7 minuta ($p < 0.001$), no u odnosu na 3 minute nije bilo razlike ($p = 1.000$). Skupina koja je bila izložena 3 minute imala je značajno nižu aktivnost u odnosu na skupine izložene 5 minuta ($p = 0.001$) i 7 minuta ($p < 0.001$). Između skupina koje su bile izložene 5 i 7 minuta nije bilo razlike ($p = 1.000$). Sve aritmetičke sredine i standardne pogreške prikazane su u Tablici 2.

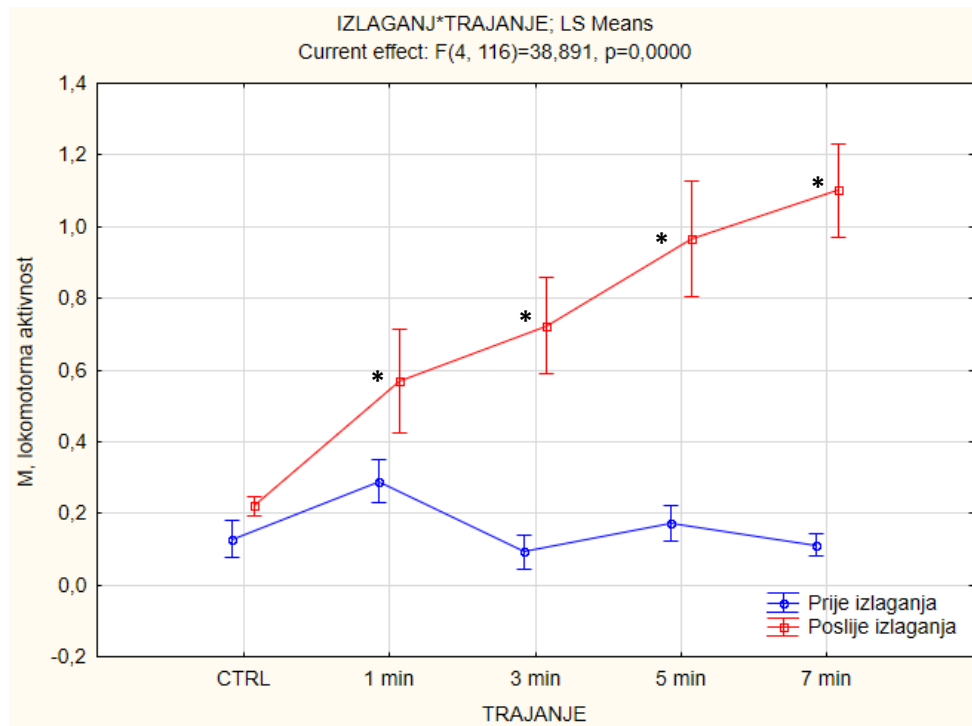
Tablica 2. Deskriptivna statistika lokomotorne aktivnosti (prosječan prijelaz sredine tube tijekom 30 minuta u periodu od jedne minute) prema trajanju izloženosti volatiliziranom kokainu

	Trajanje izloženosti				
	ctrl	1min	3min	5min	7min
M	0.17	0.43	0.41	0.57	0.61
SE	0.01	0.04	0.03	0.03	0.04

ANOVA je također pokazala postojanje značajne interakcije između izlaganja i trajanja izloženosti 75 μ l volatiliziranom kokainu, $F(4, 116) = 38.89$, $p < 0.001$. Bonferronijev Post hoc test je pokazao kako u kontrolnoj skupini nema značajne razlike u aktivnosti prije i poslije izlaganja ($p = 1.000$). U svim ostalim skupinama pokazala se značajna razlika u aktivnosti prije i poslije izlaganja volatiliziranom kokainu, $p < 0.001$. Sve aritmetičke sredine i standardne pogreške prikazane su u Tablici 2 i na Slici 8B.

Tablica 3. Deskriptivna statistika lokomotorne aktivnosti 30 minuta (u periodu od jedne minute) prije i poslije izloženosti volatiliziranom kokainu

	PRIJE					POSLIJE				
	ctrl	1min	3min	5min	7min	ctrl	1min	3min	5min	7min
M	0.13	0.29	0.09	0.17	0.11	0.22	0.57	0.72	0.97	1.10
SE	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.07	0.07	0.08	0.06



Slika 8B. Administracija volatiliziranog kokaina značajno povećava lokomotornu aktivnost mušica u odgovoru ovisnom o trajanju izloženosti

Prikaz srednje vrijednosti lokomotorne aktivnosti (30 minuta prije i poslije izlaganja volatiliziranom kokainu) CS mužjaka (ctrl n=32, 1min n=32, 3min n=32, 5min n=32, 7min n=32). Podaci su analizirani Bonferronijevim Post hoc testom.

4.3.2. Volatilizirani metamfetamin

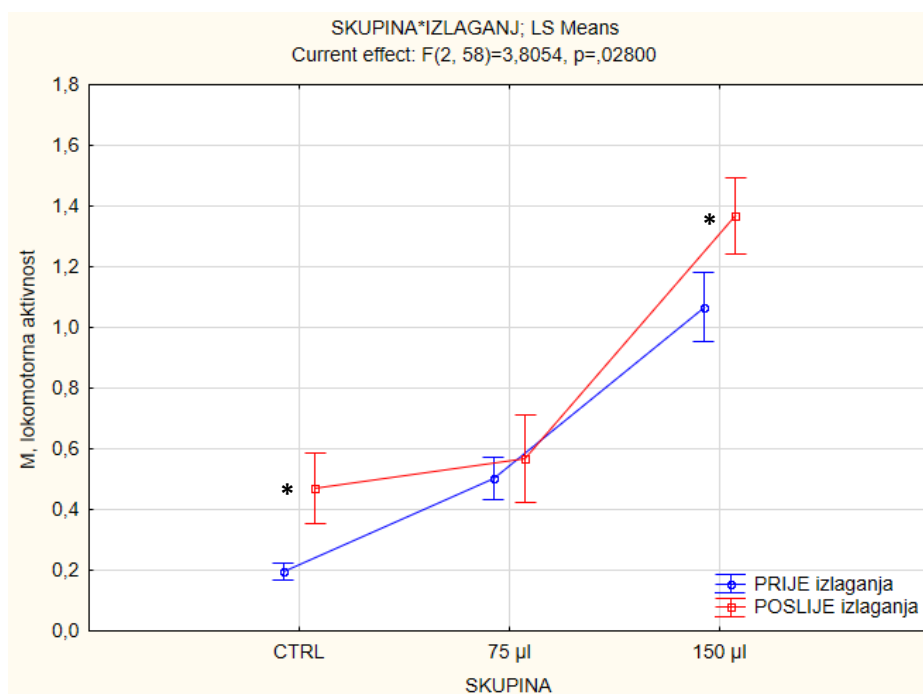
Kako bi ispitali utjecaj skupine i izlaganja volatiliziranom metamfetaminu na lokomotornu aktivnost u ovisnosti o dozi korištena je dvostruka 3 (skupina: CTRL, 75 μ l, 150 μ l vol METH) x 2 (izlaganje: prije, poslije volatilizacije) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 9A).

ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta skupine na lokomotornu aktivnost, $F(2, 58)=182.55, p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je kako su eksperimentalne skupine koje su primale 75 μ l ($M=0.54, SE=0.04$) i 150 μ l ($M=1.22, SE=0.05$) volatiliziranog metamfetamina imale značajno veće kretanje u odnosu na kontrolnu skupinu ($M=0.33, SE=0.03, p<0.001$). Također skupina koja je primala 150 μ l imala je značajno višu aktivnost u odnosu na skupinu koja je primala 75 μ l volatiliziranog metamfetamina ($p<0.001$).

ANOVA je također pokazala značajan efekt izlaganja volatiliziranom metamfetaminu na lokomotornu aktivnost, $F(1, 29)=20.12$, $p<0.001$ i statistički značajno nižu lokomotornu aktivnost prije ($M=0.59$, $SE=0.02$) u odnosu na aktivnost nakon izlaganja volatiliziranom metamfetaminu ($M=0.80$, $SE=0.05$, $p<0.001$). ANOVA je pokazala postojanje značajne interakcije između skupina i izlaganja volatiliziranom metamfetaminu, $F(2, 58)=3.81$, $p=0.028$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je značajnu razliku u lokomotornoj aktivnosti kod kontrolne skupine ($p=0.002$) i skupine koja je primala 150 μl ($p=0.001$) prije i poslije izlaganja. Kod skupine koja je primala 75 μl nije bilo razlike ($p=1.000$). Sve aritmetičke sredine i standardne pogreške prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Deskriptivna statistika lokomotorne aktivnosti 30 minuta (u periodu od jedne minute) prije i poslije izloženosti volatiliziranom metamfetaminu

	CTRL		75 μl		150 μl	
	prije	poslije	prije	poslije	prije	poslije
M	0.19	0.47	0.50	0.57	1.07	1.37
SE	0.01	0.06	0.03	0.07	0.06	0.06



Slika 9A. Administracija volatiliziranog metamfetamina značajno povećava lokomotornu aktivnost mušica u odgovoru ovisnom o dozi

Prikaz srednje vrijednosti lokomotorne aktivnosti (30 minuta prije i poslije izlaganja volatiliziranom metamfetaminu) CS muškaka (ctrl n=32, 75µl n=32, 150µl n=32). Podaci su analizirani Bonferronijevim Post hoc testom.

Kako bi ispitali utjecaj izlaganja i trajanja izloženosti 75 µl volatiliziranom metamfetaminu na lokomotornu aktivnost u ovisnosti o vremenskoj izloženosti korištena je dvostruka 2 (izlaganje: prije, poslije volatilizacije) x 5 (trajanje izloženosti skupine: CTRL, 1, 3, 5, 7 minuta) ANOVA s ponovljenim mjerenjima (Slika 9B). ANOVA je pokazala postojanje značajnog efekta izlaganja na lokomotornu aktivnost, $F(1, 29)=40.86$, $p<0.001$, pri čemu su mušice nakon izlaganja volatiliziranom metamfetaminu ($M=0.47$, $SE=0.02$) imale značajno veće kretanje u odnosu na vrijeme prije izlaganja ($M=0.32$, $SE=0.01$, $p<0.001$).

ANOVA je također pokazala značajan efekt trajanja izloženosti volatiliziranom metamfetaminu na lokomotornu aktivnost, $F(4, 116)=86.01$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je kako je kontrolna skupina imala značajno nižu aktivnost u odnosu na sve ostale skupine, $p<0.001$ (Tablica 5). Skupina koja je bila izložena 1 minutu imala je značajno nižu aktivnost u odnosu na skupine izložene 3 minute ($p<0.001$) i 7 minuta ($p<0.001$), no u odnosu na 5 minuta nije bilo razlike ($p=1.000$). Skupina koja je bila izložena 3 minute imala je značajno višu aktivnost u odnosu na skupinu izloženu 5 minuta ($p<0.001$) i višu u odnosu na 7 minuta ($p<0.001$). Skupina koja je bila izložena 5 minuta imala značajno nižu aktivnost u odnosu na 7 minuta ($p<0.001$). Sve aritmetičke sredine i standardne pogreške prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. Deskriptivna statistika lokomotorne aktivnosti prema trajanju izloženosti volatiliziranom metamfetaminu

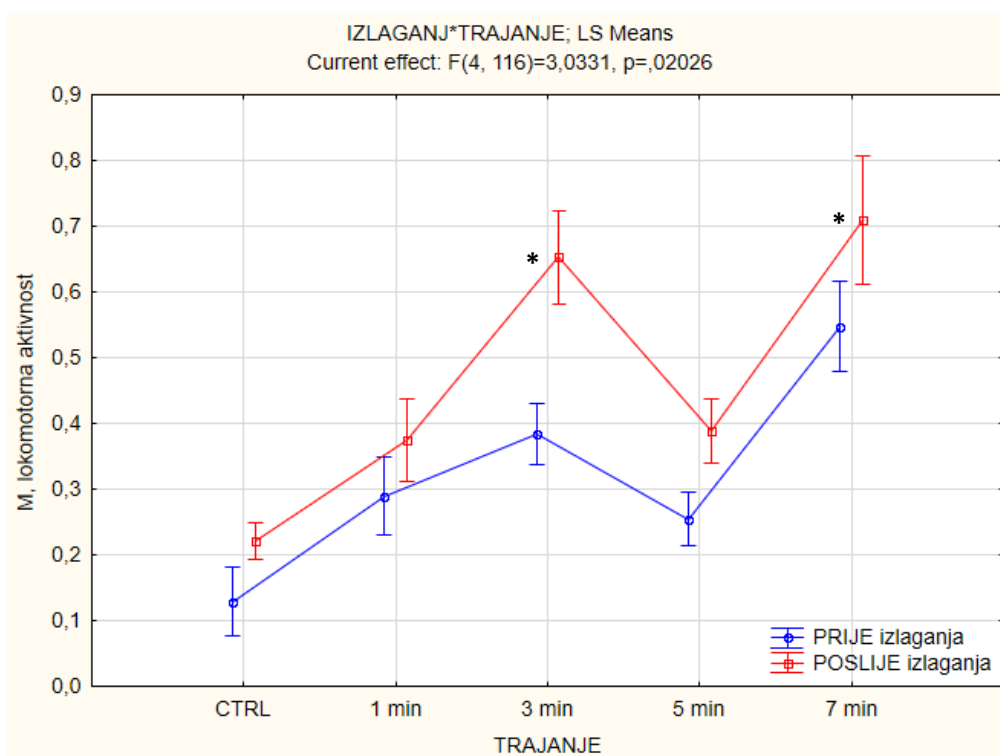
	Trajanje izloženosti				
	ctrl	1min	3min	5min	7min
<i>M</i>	0.17	0.33	0.52	0.32	0.63
<i>SE</i>	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02

Konačno, ANOVA je pokazala i postojanje značajne interakcije između izlaganja i trajanja izloženosti 75 µl volatiliziranom metamfetaminu, $F(4, 116)=3.03$, $p<0.001$. Bonferronijev Post hoc test pokazao je kako kod kontrolne skupine te skupina izloženih 1 i 5 minuta nije bilo razlike prije i poslije izlaganja, $p=1.000$. Kod skupina izloženih 3 ($p<0.001$) i 7 minuta ($p=0.012$) pokazala se značajna razlika u aktivnosti prije i poslije izlaganja volatiliziranom metamfetaminu. Sve aritmetičke sredine i standardne pogreške prikazane su u Tablici 6 i na Slici 9B.

Također, u eksperimentima volatiliziranog metamfetamina osim akutnog odgovora na psihostimulans uočena je i povećana lokomotorna aktivnost kontrolne skupine poslije izvođenja pokusa (u periodu od 30 minuta).

Tablica 6. Deskriptivna statistika lokomotorne aktivnosti 30 minuta (u periodu od jedne minute) prije i poslije izloženosti volatiliziranom metamfetaminu

	PRIJE					POSLIJE				
	ctrl	1min	3min	5min	7min	ctrl	1min	3min	5min	7min
M	0.13	0.29	0.38	0.25	0.55	0.22	0.37	0.65	0.39	0.71
SE	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03	0.02	0.05



Slika 9B. Administracija volatiliziranog metamfetamina povećava lokomotornu aktivnost mišica u odgovoru ovisnom o trajanju izloženosti

Prikaz srednje vrijednosti lokomotorne aktivnosti (30 minuta prije i poslije izlaganja volatiliziranom metamfetaminu) CS mužjaka (ctrl n=32, 1min n=32, 3min n=32, 5min n=32, 7min n=32). Podaci su analizirani Bonferronijevim Post hoc testom.

5. RASPRAVA

5.1. Praćenje lokomotorne aktivnosti uslijed oralne administracije metamfetamina

Metamfetamin uzrokuje pojačano otpuštanje dopamina iz sinaptičkih vezikula i mijenja aktivnost dopaminskog transportera što za posljedicu ima povećanje razine dopamina u sinaptičkim pukotinama (12,13). Iz literature je poznato da je najznačajniji efekt oralno administriranog psihostimulansa metamfetamina kod *Drosophila* lokomotorno aktivirajući i pobuđujući (6). Rezultati koje smo dobili pokazuju značajno povećanje lokomotorne aktivnosti nakon prve, akutne doze metamfetamina, ali nakon višestrukih doza dolazi do razvoja tolerancije (Slike 1, 2, 3B).

U našim eksperimentima oralne administracije metamfetamina tolerancija se razvije nakon višestrukih doza metamfetamina administriranih bilo tijekom dana ili tijekom noći (Slike 1, 2, 3B). Tolerancija se razvila kod divljeg tipa mušica soja *Canton S* (CS) i cirkadijalnog mutanta *timeless* (*tim*). *Tim* mušice ponašaju se kao divlji tip mušica što je poznato iz literature i rezultata s volatiliziranim kokainom (20). Nažalost nemamo adekvatne rezultate za *per* mutant kako bismo to u potpunosti potvrdili. Moguće je da *per* i *tim* mutanti imaju (sličnu) funkciju za razvoj senzitivacije i tolerancije (produkt *per* gena sudjeluje, a *tim* gena ne sudjeluje u procesu) – obzirom na to da je toleranciji i senzitivaciji zajedničko to što predstavljaju dugotrajnu modulaciju fiziološkog i bihevioralnog odgovora.

Više doze metamfetamina (1.25 mg/mL) su efikasnije za izazivanje tolerancije, a noćna administracija (Slika 2) se pokazala boljom u odnosu na administraciju tijekom dana. CS mušice su različito osjetljive na droge tijekom 24 sata. Jače povećanje lokomotorne aktivnosti tijekom noći (Slika 2) možemo objasniti posljedicom podražujućeg efekta, jer smanjenje količine spavanja dodatno potencira aktivnost mušica. Akutni efekt metamfetamina je u skladu s literaturnim podacima, oralna administracija metamfetamina značajno povećava lokomotornu aktivnost mušica pri prvoj administraciji (6). Međutim uzastopne administracije izazivaju toleranciju na pobuđujuće utjecaje metamfetamina tako da je aktivnost mušica pri četvrtoj administraciji niža od baseline mjerenja (Slika 2). Prilikom oralne administracije metamfetamina ne možemo znati jedu li mušice manje kod narednih administracije zbog čega dolazi do razvoja tolerancije. Također, ne

možemo znati jesu li mušice naučile da će dobiti psihostimulans pa nisu jele ili je uistinu došlo do razvoja tolerancije jer mušice nisu imale mogućnost izbora.

Bihevioralna senzitivacija je u prošlosti izučavana na morskom pužu (morski zekan), *Aplysia californica*, a izazivana je *gill withdrawal reflex*-om (refleks povlačenja škrge). Lagani dodir izazivao je prirodni refleks povlačenja škrge i sifona. Senzitivacija se izaziva na način da se *Aplysiji* da električni šok na repu i nakon toga kada se da isti neutralni tactile stimulus *Aplysia* puno jače reagira. Habitucija se izaziva tako da se sifon dotakne 10-15 puta što uzrokuje smanjenje povlačenja škrge. Znači za razliku od senzitivacije koja se izaziva kratkim, snažnim podražajem (električni šok), habitucija se izaziva uzastopnim slabim podražajima (19,27). Oba oblika jednostavnog učenja, senzitivacija i habitucija, na način kako su izazivani kod *Aplysije* su relativno kratkotrajne i traju kraće od sat vremena.

Kod *Drosophile* nema mnogo istraživanja kratkotrajne senzitivacije. Iz literature je poznato da senzitivacija može biti izazvana ponavljajućim mehaničkim *startle* stimulansom u obliku mlaza zraka. Mušice koje su prethodno primile *startle* mehanički stres lokomotorno reagiraju jače na blagi podražaj nego li mušice koje ga nisu primile (25). Također, senzitivacija kod *Drosophile* može biti izazvana i kombinacijom stimulansa i mirisa. Mušice koje su vorteksirane 75 sec, a zatim su izlagane 0.5% benzaldehidu pokazuju stepenasti porast u odgovoru u odnosu na skupinu mušica koja bila izložena vorteksu (26). Oba istraživanja su pokazala da, slično kao i kod *Aplysije*, za izazivanje bihevioralne senzitivacije kod *Drosophile* treba dati kratki i jaki podražaj kako bi povećao jačinu odgovora na naredni slabi podražaj.

Dakle, za izazivanje senzitivacije potreban je kratak i snažan podražaj, a u našim eksperimentima oralne administracije metamfetamina imali smo dug i relativno slab podražaj. S obzirom na to da su se mušice hranile metamfetaminom tijekom vrlo dugog perioda od 4 ili 12 sati, ponavljanje takvih dugih podražaja dovodi do razvoja tolerancije što je u skladu s navedenom literaturom (19,27).

5.2. Kontrolne skupine imaju povećanu aktivnost

Kontrolne skupine koje su primale svježu običnu hranu u trenutku kada je i eksperimentalna skupina primala psihostimulans također povećaju odgovor (Slika 1). S obzirom na to da mušice tijekom dana imaju povećanu lokomotornu aktivnost u odnosu na aktivnost tijekom noći, ovi rezultati ukazuju da postoji mogućnost da

je sama promjena svježe hrane kod kontrolne skupine određena vrsta stimulansa. Kontrolne skupine nestabilnije su tijekom dana (Slika 1) nego tijekom noći (Slika 2), odnosno aktivnost mušica tijekom dana dodatno je potencirana promjenom svježe hrane.

Također, u eksperimentu u kojem je kontrolna skupina mirovala tijekom svih dana izvođenja pokusa dolazi do povećane lokomotorne aktivnosti (Slika 4). Moguće je da je kontrolna skupina bez promjene hrane reagirala na mehaničke vibracije unutar inkubatora, do kojih je došlo radi mijenjanja hrane i pomicanja ostalih monitora. Stoga zaključujemo da je prilikom izvedbe eksperimenata bitno proizvoditi minimalne zvukove i biti pažljiv jer su mušice vrlo osjetljive. Eksperiment prebacivanja mušica na svježiju hranu nam nije dao potpuni odgovor stoga je proveden niz eksperimenata gdje smo ispitivali utjecaj dužine i jačine trajanja mehaničkog stimulansa na lokomotorni odgovor i mogućnost razvoja kratkotrajne bihevioralne senzitivacije.

5.3. Praćenje lokomotorne aktivnosti uslijed mehaničkog stimulansa

Nakon što smo primijetili da su mušice izrazito osjetljive na vibracije krenuli smo u ispitivanje osjetljivosti na mehanički stimulans kako bi provjerili je li moguće izazvati senzitivirani odgovor u vidu povećane lokomocije na mehanički stres (Slike 5, 6, 7). Iz literature je poznato da ponavljajući mehanički *startle* stimulans, u obliku mlaza zraka, kod mušica uzrokuje senzitivirani odgovor. Mušice koje su prethodno primile *startle* mehanički stres lokomotorno reagiraju jače na blagi podražaj nego li mušice koje nisu primile *startle* (25). U ovom radu pokušali smo replicirati navedeno istraživanje na dva načina, ručno i mehanički pomoću Thermomixera, i ispitati postoji li razlika u odgovoru između divljeg tipa mušica i cirkadijalnih mutanata *per* i *tim*.

U eksperimentima koji su ručno izvođeni, rezultati pokazuju da postoji značajan efekt vrste podražaja (ST, SS1, SS2, SS3) na lokomotornu aktivnost mušica (Slika 5). Davali smo jedan *startle* i tri blaga podražaja, tako da je moguća usporedba senzitivirajućeg podražaja sa *startle* (ST) ili usporedba tri senzitivirajuća podražaja (SS1-3). Postoji značajno veća lokomotorna aktivnost nakon primljenog ST podražaja u odnosu na SS1 i SS2, što je za očekivati s obzirom da je naš *startle* podražaj po intenzitetu bio jači nego senzitivirajući podražaji. Odgovor na treći

senzitivirajući podražaj sličan je odgovoru na ST, što znači da su mušice povećale intenzitet odgovora na treći slabi podražaj. Takva vrsta odgovora upućuje na senzitivaciju, no to u ovom slučaju nije moguće tvrditi obzirom da su ovi eksperimenti podložni subjektivnom utjecaju intenziteta davanja podražaja. Uočili smo značajan efekt vremenskog intervala između danih podražaja na lokomotornu aktivnost. Mušice koje su primile podražaje u razmaku od 5 i 10 minuta pokazuju značajno višu aktivnost na podražaje u odnosu na razmak od 20 minuta. Ovi rezultati su u skladu s literaturom (25). Ova vrsta senzitivacije je kratkotrajna i povećanjem vremenskog intervala iznad 15 minuta dolazi do gubitka senzitivirajućeg odgovora kod mušica.

Eksperimenti u kojima je korišten vibracijski uređaj Thermomixer pokazuju da je lokomotorna aktivnost mušica ovisna o dužini trajanja ST podražaja (Slika 6A). Provedena je usporedba između skupine koja je primila ST i tri SS podražaja u odnosu na skupinu koja je primila samo tri SS podražaja. Ova vrsta eksperimentalnog nacrta ekvivalentna je onom publiciranom s vorteksom i mirisom (Asztalos i suradnici) (26). U eksperimentima u kojima je mjereno utjecaj trajanja ST podražaja na naknadni odgovor, ST podražaj u trajanju od 10 sekundi uzrokuje najveću, a podražaj u trajanju od 3 sekunde najmanju aktivnost mušica (Slika 6B). Što ST podražaj duže traje i intenzitet SS odgovora eksperimentalne skupine je veći. U eksperimentima u kojima smo varirali jačinu ST podražaja, mušice koje su primile ST podražaj na 350 o/min pokazuju konzistentno najveći odgovor nakon sva tri SS podražaja u odnosu na skupine koje su primile ST podražaj jačine 300, 400 i 450 o/min. ST podražaj u trajanju od 10 sekundi jačine 350 o/min uzrokuje najoptimalniji odgovor eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu koja nije primila ST podražaj.

Postoji značajan efekt vrste podražaja (ST, SS1, SS2 i SS3) podražaja na lokomotornu aktivnost u eksperimentima izvođenim mehanički pomoću Thermomixera. SS3 podražaj uzrokuje značajno višu aktivnost mušica u odnosu na ST, SS1 i SS2 podražaj (Slika 7). Kontrolna skupina koja nije primila ST podražaj pokazuje približno jednak odgovor na mehanički stimulans prilikom svakog od SS podražaja. Eksperimentalna skupina koja je primila ST podražaj svakim idućim SS podražajem pokazuje stepenasto povećanje odgovora što može ukazivati da mehanički stimulans kod mušica izaziva bihevioralnu senzitivaciju.

Slične razlike u odgovoru između eksperimentalne i kontrolne skupine uočene su u literaturi (25,26).

Senzitizirajući odgovor nije uočen kod cirkadijalnih mutanata *per* i *tim*, što upućuje na zaključak da su oba cirkadijalna gena važna u procesu razvoja bihevioralne senzitivacije. Međutim, prije nego li to sa sigurnošću tvrdimo treba provesti dodatne eksperimente gdje će se modificirati jačina ST i SS podražaja jer je moguće da cirkadijalni mutanti imaju različiti prag osjetljivosti. Također, navedeni protokol će se dalje optimizirati u divljem tipu mušica s ciljem definiranja uvjeta za konzistentno i izraženo izazivanje bihevioralne senzitivacije i habituacije.

Kako se pokazalo da mehanički stimulans zaista ima utjecaj na lokomotornu aktivnost, možemo zaključiti da je u eksperimentima oralne administracije psihostimulansa teško smanjiti odgovor kontrolnih mušica na višestruke administracije obične hrane, jer je to povezano s ponovljenim davanjima mehaničkog stimulansa. Očito je da postoji određeni stres radi vibracija prilikom administracija što uzrokuje veću aktivnost mušica i to će uvijek biti artefakt koji će utjecati na rezultate eksperimenata oralne administracije.

5.4. Povećanje lokomotorne aktivnosti uslijed administracije volatiliziranog kokaina i metamfetamina

Zahvaljujući mehanizmu povećanja dopamina uslijed blokade dopaminskih transportera (kokain) ili povećanog otpuštanja dopamina iz sinaptičkih vezikula i presinaptičkog neurona (metamfetamin) psihostimulansi imaju akutni aktivirajući i pobuđujući efekt (12,13).

U našim eksperimentima volatiliziranog kokaina mušice pokazuju odgovor ovisan o dozi i vremenu izloženosti (Slike 8A, 8B). Rezultati su u skladu s literaturom, potvrđen je akutni efekt kokaina i njegovi bihevioralni efekti ovisni o dozi (21,28). Nakon jednog minute izloženosti mušice koje su primile 150 µl pokazuju veći odgovor u odnosu na skupinu koja je bila izložena 75 µl volatiliziranog kokaina. Također, povećanjem vremena izloženosti volatiliziranom kokainu povećava se i aktivnost mušica. S obzirom na to da su naši rezultati potvrdili akutni efekt kokaina, potrebno je provesti nove eksperimente kako bi provjerili može li se putem ovog eseja razviti bihevioralna senzitivacija kod mušica. Ovakva vrsta eseja

predstavlja značajan napredak u izučavanju bihevioralne senzitivacije jer je moguće izbjeći subjektivnost dosadašnjih testova u kojima su mušice nakon izlaganja volatiliziranom kokainu bile snimane, a zatim im se bodovalo ponašanje (21). Što je još važnije, obzirom da je komora za volatilizirane droge povezana s DAMS monitorom, to omogućuje visokoprotčnost. Znači kod velikog broja mušica može se kvantificirati lokomotorni odgovor na akutni ili ponavljajući podražaj.

Za razliku od kokaina, eksperimenti volatiliziranog metamfetamina pokazuju slabije rezultate (Slike 8A, 8B). Akutni efekt uočen je tek pri dozi od 150 μ l. Pri izloženosti volatiliziranom metamfetaminu u trajanju od 3 ili 7 minuta dolazi do povećanja lokomotorne aktivnosti. S obzirom na to da akutni efekt metamfetamina nije uočen nakon 1 ili 5 minuta izloženosti, potrebno je provesti dodatne eksperimente kako bi se utvrdilo koje su optimalne doze i vrijeme izloženosti. Tek nakon prilagodbe doze i vremena trajanja izloženosti biti će moguće provesti nove eksperimente kako bi se istražilo može li volatilizirani metamfetamin izazivati bihevioralnu senzitivaciju ili toleranciju kod mušica.

Također je u eksperimentima volatiliziranog metamfetamina pokazano kako i kontrolne skupine povećavaju lokomotornu aktivnost. Naime, ovi eksperimenti su provedeni u laboratoriju u uvjetima koji nisu potpuno kontrolirani (promjena svjetla, temperature, vibracije, zvukovi). S obzirom da su prethodni eksperimenti pokazali kako su mušice izrazito osjetljive na vibracije, naredni pokusi se provode u prostoriji sa znatno bolje kontroliranim okolišnim uvjetima.

5.5. Rezultati potvrđuju dvoprocenu teoriju plastičnosti

Rezultati naših eksperimenata su u skladu s dvoprocenom teorijom (*dual-process theory*) plastičnosti odgovora na ponovljenu stimulaciju. Jačina bihevioralnog odgovora koji je izazvan ponovljenim stimulansom rezultat je dva neovisna procesa, habituacije i senzitivacije. Razvoj senzitivacije i habituacije ovisi o jačini i trajanju podražaja, senzitivacija se javlja u slučaju kada je intenzitet podražaja jak, dok se habituacija javlja u slučaju podražaja slabog intenziteta (29). U našim eksperimentima oralna administracija metamfetamina (dugotrajan podražaj slabog intenziteta) je izazvala toleranciju, dok je mehanički stres (kratkotrajan podražaj jakog intenziteta) inducirao razvoj bihevioralne senzitivacije. Također, podražaji davani putem volatiliziranog kokaina pružaju uvjete za razvoj bihevioralne senzitivacije što će se izučavati u narednim eksperimentima.

6. ZAKLJUČAK

Bihevioralnu senzitivaciju nije moguće izazvati oralnom administracijom jer višestruka administracija metamfetamina dovodi do obrnutog fenomena, tolerancije na pobuđujuće utjecaje uzastopne doze metamfetamina. Tolerancija je primijećena u lokomotornoj aktivnosti divljeg tipa *Drosophila*, soja *Canton S*, ali i cirkadijalnog mutanta *timeless (tim)*, što je u skladu s istraživanjima koja su pokazala da *tim* ne regulira bihevioralnu senzitivaciju. Za izazivanje tolerancije konzistentniji rezultati dobivaju se tijekom noći jer je i odgovor kontrolnih skupina stabilniji. Osim toga, prilikom izvođenja eksperimenata potrebno je biti vrlo pažljiv i zvukove i vibracije smanjiti na minimum jer smo pokazali da mušice reagiraju i na mehaničke stimulanse koji su neminovni prilikom mijenjanja hrane i administracije droge.

Za izazivanje kratkotrajne bihevioralne senzitivacije definirali smo uvjete i protokol. Kod divljeg tipa mušica potrebno je imati kratak i snažan podražaj, što smo dokazali primjenom mehaničkog šok stimulansa *startle*. Mehanički stimulans uzrokuje kratkotrajnu senzitivaciju jer do smanjenja odgovora dolazi nakon intervala većeg od 15 minuta. Senzitivirajući odgovor nije uočen kod cirkadijalnih mutanata *period* i *timeless*, po čemu bi se njihova funkcija u regulaciji kratkotrajne senzitivacije razlikovala od one prethodno publicirane u razvijanju dugotrajne bihevioralne senzitivacije na kokain. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima oralne administracije kojom je jedino moguće izazvati toleranciju, obzirom da je podražaj (administracija droge) dugotrajna i relativno niskog intenziteta (koncentracija).

Pokazali smo akutni aktivirajući efekt volatiliziranog kokaina i metamfetamina u novom visokoprotočnom sistemu za administraciju volatilizirane droge, koji povezuje prostor za volatilizaciju s DAMS monitorom za praćenje lokomotorne aktivnosti. Eksperimenti s kokainom pokazuju odgovor ovisan o dozi i trajanju izloženosti. Ovi eksperimenti pružili su čvrste temelje za buduća istraživanja bihevioralne senzitivacije volatiliziranim kokainom pomoću DAMS-a (Drosophila Activity Monitoring System).

7. LITERATURA

1. Kaun KR, Devineni AV, Heberlein U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Human Genetics*. 2012 Jun;131(6):959–75.
2. Devineni AV, Heberlein U. Addiction-like behavior in *Drosophila*. *Communicative&Integrative Biology*. 2010;3(4):357–359.
3. Phan NTN, Hanrieder J, Berglund EC, Ewing AG. Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry–Based Detection of Drugs and Neurotransmitters in *Drosophila* Brain. *Analytical Chemistry*. 2013 Sep 3;85(17):8448–54.
4. O’Kane CJ. *Drosophila* as a Model Organism for the Study of Neuropsychiatric Disorders. In: Hagan JJ, editor. *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cited 2016 Jun 18]. p. 37–60. Available from: http://link.springer.com/10.1007/7854_2010_110
5. Heberlein U, Tsai LT-Y, Kapfhamer D, Lasek AW. *Drosophila*, a genetic model system to study cocaine-related behaviors: A review with focus on LIM-only proteins. *Neuropharmacology*. 2009 Jan;56:97–106.
6. Andretic R, van Swinderen B, Greenspan RJ. Dopaminergic Modulation of Arousal in *Drosophila*. *Current Biology*. 2005 Jul;15(13):1165–75.
7. Roote J, Prokop A. How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for *Drosophila* Genetics. *G3 GenesGenomesGenetics*. 2013 Feb 1;3(2):353–8.
8. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron*. 1998;21(3):467–476.
9. Peru y Colón de Portugal RL, Ojelade SA, Penninti PS, Dove RJ, Nye MJ, Acevedo SF, et al. Long-lasting, experience-dependent alcohol preference in *Drosophila*: Experience-dependent alcohol preference in *Drosophila*. *Addiction Biology*. 2014 May;19(3):392–401.
10. Bainton RJ, Tsai LT, Singh CM, Moore MS, Neckameyer WS, Heberlein U. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Current Biology*. 2000;10(4):187–194.

11. Nestler EJ. The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Sci Pract Perspect* [Internet]. 2005 [cited 2016 Aug 23]; Available from: <https://archives.drugabuse.gov/pdf/Perspectives/vol3no1/Neurobiology.pdf>
12. Hyman SE. Addiction to cocaine and amphetamine. *Neuron*. 1996;16(5):901–904.
13. Adinoff B. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harvard Review of Psychiatry*. 2004;12(6):305–320.
14. Iyer EPR, Iyer SC, Cox DN. Application of Cell-Specific Isolation to the Study of Dopamine Signaling in *Drosophila*. In: Kabbani N, editor. *Dopamine* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cited 2016 Jul 2]. p. 215–25. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-251-3_13
15. Nichols CD. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology&Therapeutics*. 2006 Dec;112(3):677–700.
16. Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*. 2000;25(3):515–532.
17. Scholz H, Ramond J, Singh CM, Heberlein U. Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron*. 2000;28(1):261–271.
18. Steketee JD, Kalivas PW. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacological Reviews*. 2011 Jun 1;63(2):348–65.
19. Hawkins RD. Operant Conditioning of Gill Withdrawal in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*. 2006 Mar 1;26(9):2443–8.
20. Andretic R. Requirement of Circadian Genes for Cocaine Sensitization in *Drosophila*. *Science*. 1999 Aug 13;285(5430):1066–8.
21. McClung C, Hirsh J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Current Biology*. 1998;8(2):109–112.

22. Pandey UB, Nichols CD. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacologica Reviews*. 2011 Jun 1;63(2):411–36.
23. Carvalho GB. *Drosophila* feeding behavior and demographic mechanisms of lifespan extension [Internet]. Citeseer; 2010 [cited 2016 Aug 22]. Available from:
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.425.571&rep=rep1&type=pdf>
24. Shaw PJ. Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1991;158:241.
25. Lebestky T, Chang J-SC, Dankert H, Zelnik L, Kim Y-C, Han K-A, et al. Two Different Forms of Arousal in *Drosophila* Are Oppositely Regulated by the Dopamine D1 Receptor Ortholog DopR via Distinct Neural Circuits. *Neuron*. 2009 Nov;64(4):522–36.
26. Asztalos* Z, Asztalos* Z, Baba K, Yamamoto D, Tully T. THE *fickle* MUTATION OF A CYTOPLASMIC TYROSINE KINASE EFFECTS SENSITIZATION BUT NOT DISHABITUATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Journal of Neurogenetics*. 2007 Jan;21(1–2):59–71.
27. Bristol AS. Neural Circuit of Tail-Elicited Siphon Withdrawal in *Aplysia*. II. Role of Gated Inhibition in Differential Lateralization of Sensitization and Dishabituation. *Journal of Neurophysiology*. 2003 Oct 8;91(2):678–92.
28. Wolf ME. Cocaine addiction: clues from *Drosophila* on drugs. *Current Biology*. 1999;9(20):R770–R772.
29. Groves PM, Thompson RF. Habituation: a Dual-Process Theory. *Psychological Review*. 1970. Vol 77, No.5, 419-450

8. ŽIVOTOPIS STUDENTA

OSOBNJE INFORMACIJE

Ćoso Ira

📍 Srdoči 63, 51000 Rijeka (Hrvatska)

☎ (+385) 91 1904 091

✉ ira.coso@gmail.com

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 2014–danas **Diplomski sveučilišni studij 'Istraživanje i razvoj lijekova'**
Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
- 2011–2014 **Preddiplomski sveučilišni studij "Biotehnologija i istraživanje lijekova"**
Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
univ. bacc. biotechn. et pharm. inv. (pohvala cum laude)
- 2007–2011 **Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka**
Rijeka (Hrvatska)
opći smijer
SSS

RADNO ISKUSTVO

- 06/2016 **Stručna praksa**
Jadran - Galenski Laboratorij, JGL d.d.
Svilno 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)
- rad u odjelu 'Globalne registracije'
- Mentor: Iva Lalić
- upoznavanje s osnovama registracijskih postupaka za sve kategorije proizvoda
- 12/2015–06/2016 **Laboratorij za genetiku ponašanja**
- Diplomski rad 'Ispitivanje karakteristika bihevioralne senzitivacije u *Drosophila melanogaster*'
- mentor dr.sc. Rozi Andretić-Waldowski
- 2010–2015 **Glumac u predstavi, Biljeter**
KUC KALVARIJA, Rijeka (Hrvatska)
- Igranje uloga u osam predstava KUC Kalvarije
- Sudjelovanje u pripremi predstava
- Osmišljavanje scenarija i scenografije
- Priprema dvorane za predstave
- Slaganje rezervacija
- Prodaja karata

- 2014–2015 **Hostesa**
 Turistička zajednica Grada Zadra, Zadar (Hrvatska)
 - Hostesiranje na predstavama i koncertima
- 05/2014 **Stručna praksa**
 Jadran - Galenski Laboratorij, JGL d.d.
 Svilno 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)
 - rad u odjelu 'Istraživanje i Razvoj' na radnom mjestu 'Ekspert razvojno analitičkih procesa'
 - Mentor: Marina Kukulj Banović
 - rad u laboratoriju (oslobađanje djelatne tvari, *dissolution*)
- 2012 **Voditelj emisije**
 Radio TRSAT, Rijeka (Hrvatska)
 - Rad u eteru, emisija "Top topova"
 - Osmišljavanje i priprema emisije
- 07/2011 **Administrator**
 Ordinacija obiteljske medicine, dr. med. Nensi Bilanović Čoso, Jelenje (Hrvatska)
 - administrativni poslovi
 - prijem pacijenata

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1	C1
njemački	A2	A2	A2	A2	A2

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

Komunikacijske vještine Odgovorna, snalažljiva, znatiželjna, motivirana
 - vještine stečene tijekom glumačkog rada u KUC Kalvariji te u eteru Radia Trsat

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

Ostale vještine Završena škola glume u KUC Kalvariji, 2010. godine

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade - Stipendist Grada Rijeke od 2011. do 2016. godine

Projekti - 'Student mentor' 2014. do 2016. godine
- srpanj 2014., Eu Youth Exchange 'People', Madrid, Španjolska
- sudjelovanje u aktivnostima 14. Festivala znanosti (travanj 2016.)

Case study - Jadran Galenski Laboratorij
-2015. - rješavanje problema voditelja laboratorija
-2016. - osmišljavanje novog lijeka

Konferencije Aktivni sudionik 6. Studentskog kongresa neuroznanosti - NeuRi 2016. održanog u Rijeci i Rabu od 22. do 24. travnja 2016.
- poster - Ana Filošević, Ira Ćoso, Rozi Andretić Waldowski: Characterizing short and long-term behavioral sensitization in *Drosophila*
Aktivni sudionik XIV.simpozija 'Translation of basic immunology and neuroscience tools to therapies: Where Are We Now?'
- poster - Ana Filošević, Ira Ćoso, Rozi Andretić Waldowski: Circadian genes and mechanisms of addiction: defining the behavioral sensitization phenotype for behavioral screen

Volonterstvo - Europske sveučilišne igre 2016., attaché (domaćin ekipe)

Članstva Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci od 2014. godine