

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

Josipa Kolobarić

**Utjecaj oksidativnog stresa na razvoj lokomotorne senzitivacije
u *Drosophila melanogaster***

Diplomski rad

Rijeka, 2017.godina

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

Josipa Kolobarić

**Utjecaj oksidativnog stresa na razvoj lokomotorne senzitivacije
u *Drosophila melanogaster***

Diplomski rad

Rijeka, 2017.godina

Mentor rada: dr.sc. Rozi Andretić Waldowski

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici dr.sc.Rozi Andreć Waldowski što me je svojim smjernicama, pohvalama i kritikama motivirala i usmjeravala u svim koracima izvedbe diplomskog rada.

Najviše se zahvaljujem se svojoj obitelji, Sanjinu i prijateljima jer svakodnevno ispunjavaju moj život s ljubavlju i potporom.

Ovaj rad posvećujem svome ocu.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ves' or similar, located at the bottom center of the page.

Diplomski rad obranjen je dana 13.09.2017.

pred povjerenstvom:

1. dr.sc. Jelena Ban (predsjednik)
2. dr.sc. Antonija Jurak Begonja
3. dr.sc. Rozi Andretić Waldowski

Rad ima 63 stranice, 28 slika i 47 literaturnih navoda

SAŽETAK

Povećanje dopaminske neurotransmisije inducirano psihostimulansima predstavlja jedan od inicijalnih faktora za razvoj ovisnosti. Budući da oksidativni metabolizam dopamina stvara reaktivne kinone i slobodne radikale, istraživanja sugeriraju da oksidativni stres ima utjecaja na bihevioralne promjene uključujući lokomotornu senzitivaciju. Istraživanja na glodavcima su pokazala kako administracije kokaina (COC) ili metamfetamina (METH) povećavaju oksidativne markere u regiji mozga koja je važna za ekspresiju lokomotorne senzitivacije. Svrha diplomskog rada je definirati ulogu povećanog i smanjenog oksidativnog statusa na razvoj lokomotorne senzitivacije na modelnom organizmu vinske mušice (*Drosophila melanogaster*).

Mušice su prehranom tretirane s prooksidansima i/ili antioksidansima prije i tijekom administracije volatiliranog COC ili METH te su praćene promjene u lokomotornoj aktivnosti. Administrirane su dvije iste doze psihostimulansa kroz određeni vremenski interval kako bi pratili razvoj lokomotorne senzitivacije. Mjerenjem oksidativnih markera (aktivnost katalaze CAT i superoksid dismutaze SOD; koncentracija vodikovog peroksida H_2O_2 i superoksidnog anion radikala $O_2^{\bullet-}$) ispitivali smo kako smanjenje ili povećanje oksidativnog statusa inducirano tretmanom s prooksidansima i antioksidansima dovodi do promjena u lokomotornoj aktivnosti na ponovljene administracije psihostimulansa.

Razvoj lokomotorne senzitivacije na COC i METH je spriječen kod mušica tretiranih antioksidansima, kao i kod mušica tretiranih s prooksidansima. Dodatno, pokazali smo da kombinirani tretman s prooksidansima i antioksidansima dovodi do obnavljanja lokomotorne senzitivacije na METH. Mjerenjem parametara oksidativnog statusa uočili smo razlike između tretmana, kao i razlike između COC i METH. Naši rezultati sugeriraju da egzogena primjena prooksidansa ili antioksidansa dovodi do promjena u oksidativnom statusu što se očituje na sprječavanje lokomotorne senzitivacije. Identifikacija promjena u oksidativnom statusu koje dovode do promjena u bihevioralnom odgovoru će pomoći objasniti kompleksnost mehanizama ovisnosti te poticati razvoj učinkovitih terapija za svladavanje ovisnosti.

Ključne riječi: lokomotorna senzitivacija, psihostimulansi, *Drosophila melanogaster*, oksidativni status

SUMMARY

Psychostimulants induced increase in dopamine neurotransmission is considered to be one of the initial factors for the development of addiction. Since oxidative metabolism of dopamine produces reactive quinones and free radicals, studies suggest that oxidative stress has implications for behavioral changes including locomotor sensitization. Research on rodents has shown that administration of cocaine (COC) or methamphetamine (METH) increases oxidative markers in the brain region which is important for expression of locomotor sensitization.

The purpose of the master thesis is to define the role of increased and decreased oxidative status on the development of locomotor sensitization in fruit fly (*Drosophila melanogaster*).

Flies were fed with pro-oxidants and/or antioxidants before and during administration of volatilized COC or METH and changes in locomotor activity were examined. To monitor the development of locomotor sensitization, two doses of psychostimulant were administered over a certain time interval. By measuring oxidative markers (activity of catalase CAT and superoxide dismutase SOD; concentration of hydrogen peroxide H_2O_2 and superoxide anion radical $O_2^{\bullet-}$), we investigated how decrease or increase in oxidative status, induced by pro-oxidant or antioxidant treatment, leads to changes in locomotor activity after repeated administration of psychostimulants.

Locomotor sensitization to COC and METH is abolished in flies treated with antioxidants, as well as in flies treated with pro-oxidants. In addition, we report that combined treatment with pro-oxidants and antioxidants restores locomotor sensitization to METH. We observed differences between treatments, as well as differences between COC and METH.

Our results suggest that the exogenous exposure to pro-oxidants or antioxidants results in changes in oxidative status, which is evident in the abolished locomotor sensitization. Identifying changes in oxidative status that lead to changes in behavioral response will help explain the complexity of addiction mechanisms and encourage the development of effective therapy for addiction.

Key words: locomotor sensitization, psychostimulants, *Drosophila melanogaster*, oxidative status

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Ovisnost i lokomotorna senzitivacija.....	1
1.1.1. Mehanizam djelovanja psihostimulansa.....	3
1.1.2. Drosophila melanogaster kao model organizam za istraživanje ovisnosti.....	5
1.1.3. Kvantifikacija lokomotorne senzitivacije kod Drosophile melanogaster.....	6
1.2. Slobodni radikali i oksidativni stres.....	7
1.2.1. Oksidativni stres induciran dopaminom.....	8
1.3. Antioksidativni sustav.....	9
1.3.1. Egzogeni antioksidansi – Polifenoli.....	10
1.4. Utjecaj oksidativnog statusa na lokomotornu senzitivaciju.....	12
2. CILJ RADA.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Uzgoj i sortiranje vinske mušice (Drosophila melanogaster).....	15
3.2. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na osjetljivost i lokomotornu senzitivaciju.....	16
3.3. Određivanje markera oksidativnog statusa.....	18
3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze.....	18
3.3.2. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze.....	19
3.3.3. Mjerenje koncentracije vodikovog peroksida.....	19
3.3.4. Mjerenje koncentracije superoksidnog anion radikala.....	20
3.4. Prikaz, analiza i statistička obrada rezultata.....	20
4. REZULTATI.....	22
4.1. Lokomotorna senzitivacija na ponovljenu dozu psihostimulansa.....	22
4.2. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na razvoj lokomotorne senzitivacije.....	23
Prooksidansi: Vodikov peroksid i parakvat.....	24
Antioksidansi: Tempol, kvercetin i tirosol.....	26
4.3. Utjecaj kombiniranog tretmana s prooksidansom i antioksidansom na razvoj lokomotorne senzitivacije.....	29
4.4. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na aktivnost antioksidativnih enzima nakon administracije psihostimulansa.....	31
Katalaza.....	31
Superoksid dismutaza.....	33
4.5. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na količinu markera oksidativnog statusa nakon administracije psihostimulansa.....	35

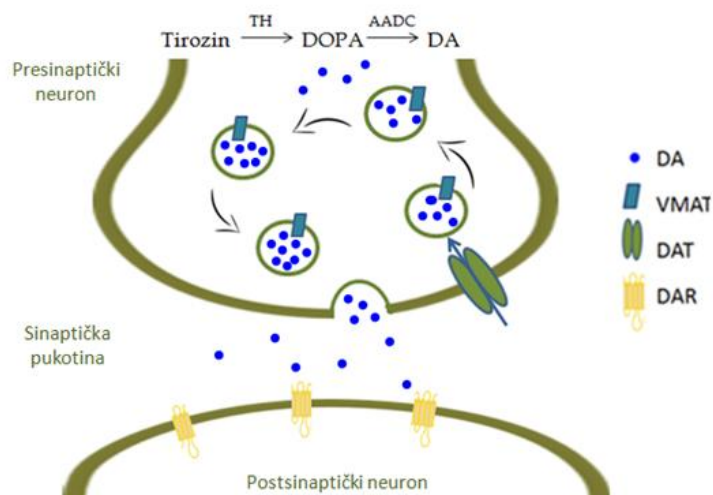
5. RASPRAVA.....	37
6. ZAKLJUČAK.....	43
7. LITERATURA.....	45
8. DODATNI MATERIJALI.....	49
9. ŽIVOTOPIS.....	61

1.UVOD

1.1. Ovisnost i lokomotorna senzitivizacija

Ovisnost predstavlja kronični recidivni poremećaj karakteriziran kompulzivnom upotrebom psihostimulansa unatoč negativnim posljedicama koje ima za ljudski organizam (1). Adiktivni psihostimulansi poput kokaina i metamfetamina uzrokuju dugoročne promjene ponašanja mijenjajući plastičnost sinapsi u određenim regijama mozga (2). Posljedica neuronalnih promjena je poremećaj homeostaze organizma na molekularnoj i staničnoj razini (3). Točan mehanizam kojim psihostimulansi vrše svoje efekte nije razjašnjen, no dosadašnja istraživanja navode povećanje dopaminergične neurotransmisije kao jedan od inicijalnih faktora za razvoj ovisnosti.

Dopamin (DA) je neurotransmiter koji modulira neuronalne funkcije uključujući lokomotorno ponašanje, spavanje, učenje, pamćenje te ponašanje povezano s nagradom i motivacijom (4). Sinteza DA započinje hidroksilacijom aminokiseline tirozina u L-dihidroksifenilalanin (DOPA) djelovanjem enzima tirozin hidroksilaze (TH) (5). Zatim dekarboksilaza aromatskih aminokiselina katalizira pretvorbu DOPA u DA. Nakon biosinteze u citosolu neurona, DA se transportira u sinaptičke vezikule pomoću vezikularnog monoaminskog transportera 2 (VMAT2) gdje ostaje pohranjen do otpuštanja iz neurona (Slika 1.). Ekscitacija presinaptičkog DA neurona uzrokuje egzocitozu vezikula u sinaptičku pukotinu što dovodi do interakcije DA sa dopaminskim receptorima (DAR) na postsinaptičkom neuronu. Signaliziranje se zaustavlja uklanjanjem DA iz sinaptičke pukotine degradacijom ili ponovnim unosom u presinaptički neuron preko dopaminskog transportera (DAT) (6). Ponovnim ulaskom u citosol presinaptičkog neurona, DA se degradira ili pohranjuje u sinaptičke vezikule pomoću VMAT2.



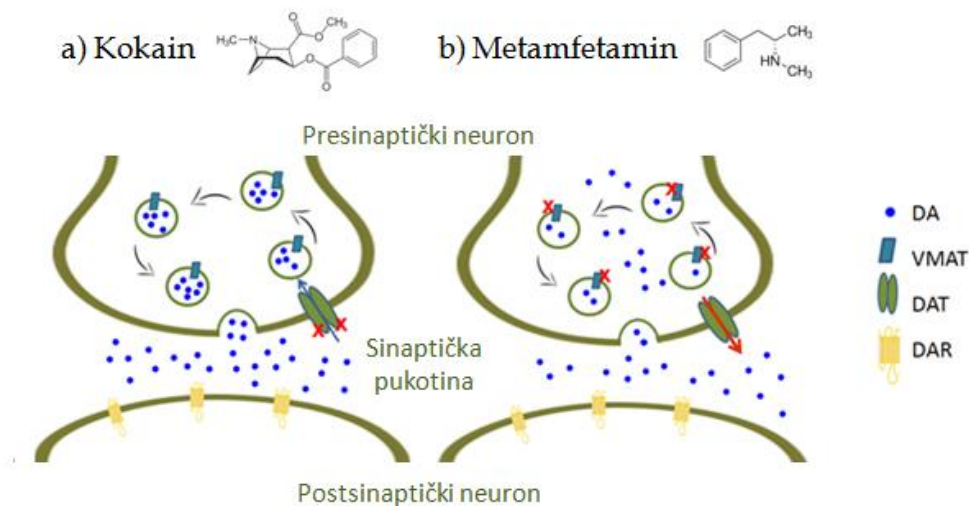
Slika 1. Shematski prikaz dopaminergične neurotransmisije (TH-tirozin hidrosilaza; AADC-dekarboksilaza aromatskih aminokiselina; DOPA-L-dihidroksifenilalanin; DA-dopamin; VMAT-vezikularni monoaminski transporter; DAT-dopaminski transporter; DAR-dopaminski receptor)

Povećanje dopaminergične signalizacije se odvija u mezokortikalnim i mezolimbičkim putevima. Mezolimbički sustav čine dopaminski neuroni koji proizlaze iz ventralnog tegmentalnog područja (VTA) i projektiraju se u nukleus akumbens (NAc) i prefrontalni korteks (1). Otpuštanje DA u mezolimbičkom sustavu je povezano s motivacijskim i nagrađujućim događajima. Kada organizam doživi novi stimulus, bio on pozitivan (hrana) ili negativan (stresor), aktivnost DA neurona u VTA se mijenja. Svojem otpuštanjem, DA daje znak organizmu da se odvija motivirajući događaj i da je potrebno prilagoditi bihevioralni odgovor (povećati ili smanjiti otpuštanje DA) (7). Dopaminski receptori su kolokalizirani sa glutamatnim receptorima u NAc i zajedno proizvode dugoročne promjene u sinaptičnoj plastičnosti. Dopaminergična neurotransmisija kao odgovor na psihostimulans proizvodi lokomotorni i nagrađujući efekt dok glutaminergična neurotransmisija rezultira učenjem i memorijom povezanom s konzumacijom psihostimulansa (8). Istraživanja na modelima glodavaca i primata s izmijenjenom funkcijom DAR su ustanovila da je podtip DAR-D2 ključni modulator lokomotorne aktivnosti (9).

Bihevioralna (lokomotorna) senzitivacija predstavlja fenomen progresivnog povećanja lokomotornog odgovora nakon ponovljenih administracija iste doze psihostimulansa (10). Razvoj bihevioralne senzitivacije se može podijeliti na inicijalnu fazu (povezanu s VTA) i ekspresijsku fazu (povezanu s NAc). Inicijalna faza predstavlja neposredne neuronalne događaje koji induciraju bihevioralnu senzitivaciju, dok ekspresijska faza predstavlja dugoročne posljedice inicijalnih događaja. Brojna istraživanja povezuju bihevioralnu senzitivaciju sa neuroadaptacijama u mezolimbičkom sustavu koji je važan posrednik nagrađujućih i lokomotornih efekata droge. Istraživanja na senzitiviranim životinjama su pokazala da se u mezolimbičkom sustavu odvijaju pre- i postsinaptičke neuroadaptacije (3). Presinaptička adaptacija predstavlja povećanje otpuštanja DA nakon primjene psihostimulansa, dok postsinaptička adaptacija uključuje povećanje osjetljivosti DAR i smanjenje osjetljivosti glutamatnih receptora. Bihevioralna senzitivacija može biti dugoročno prisutna, a na njenu snagu utječu mnogi čimbenici: spol, dob, genetika te doza psihostimulansa i vremenski interval između administracija (10).

1.1.1. Mehanizam djelovanja psihostimulansa

DAT je primarno mjesto djelovanja psihostimulansa. Uklanjanje DA iz sinaptičke pukotine u presinaptički neuron preko DAT je ključno za kontrolu i terminaciju neurotransmisije. Kokain (COC) kompetitivno inhibira DAT što rezultira povećanom koncentracijom DA u sinaptičkoj pukotini (Slika 2.) (7). Ekstracelularni DA zatim ostvaruje produljenu interakciju sa DAR što proizvodi povećani lokomotorni odgovor. Metamfetamin (METH) također povećava koncentraciju ekstracelularnog DA, ali ne inhibira DAT. Zbog strukturne sličnosti sa DA, METH ulazi u neuron kroz DAT i inhibira djelovanje VMAT2 (11). Povećava se koncentracija DA u citosolu jer se odvija reverzni transport kroz VMAT2 stoga se DA ne može pohraniti u sinaptičku vezikulu (12). Preopterećenost DAT-a sa METH-om i citosolnim DA mijenja pravac djelovanja DAT te se povećane koncentracije DA reverznim transportom otpuštaju u sinaptičku pukotinu.



Slika 2. Shematski prikaz mehanizma djelovanja a)kokaina (COC) i b)metamfetamina (METH) COC inhibira DAT i onemogućuje ponovni ulazak DA u presinaptički neuron. METH ulazi u presinaptički neuron preko DAT, inhibira funkciju VMAT2 i uzrokuje reverzni transport citosolnog DA kroz DAT. (DA-dopamin; VMAT-vezikularni monoaminski transporter; DAT- dopaminski transporter; DAR-dopaminski receptor)

Administracija psihostimulansa može inducirati lokomotorni i nagrađujući efekt kroz DAT neovisne mehanizme koji uključuju vezanje na transportere neurotransmitera serotonina (5-HT) i norepinefrina (NE). Smatra se da 5-HT i NE transporteri imaju ulogu u ponovnom unosu DA u neuron, no ti transporteri mogu biti inhibirani vezanjem psihostimulansa. Važnost DAT neovisnih mehanizama su potvrdila istraživanja na DAT *knock out* miševima gdje su COC i METH povećali ekstracelularni DA u NAc i proizveli nagrađujuće efekte (13). Istraživanja pokazuju da kompleksne interakcije između neurotransmitterskih sustava moraju biti koordinirane kako bi obrazac otpuštanja DA ostao nepromijenjen.

1.1.2. Drosophila melanogaster kao model organizam za istraživanje ovisnosti

Drosophila melanogaster (vinska mušica) se desetljećima koristi kao model organizam zbog privlačnih karakteristika poput brzog replikacijskog ciklusa, malih troškova uzgoja i jednostavne genetske manipulacije. Konzervirana biološka homologija sa čovjekom ju čini vrijednim alatom u istraživanjima patologije metaboličkih, genetskih i neurodegenerativnih bolesti. Smatra se da oko 75% gena koji su povezani s bolestima kod ljudi imaju funkcionalne ortologe kod mušice (14).

Postoji strukturna i funkcionalna konzerviranost dopaminergične neurotransmisije između vinske mušice i sisavaca. Kod mušice su karakterizirani enzimi biosinteze dopamina, VMAT, DAT te dopaminski receptori podtipa D1 i D2. Nedostatak DAT kod mušice uzrokuje pretjeranu hiperaktivnost, odnosno povećanu lokomotivnu aktivnost (4). Istraživanje na DAR-D2 transgeničnim mušicama je pokazalo da smanjena razina D2 receptora značajno smanjuje lokomotivnu aktivnost što potvrđuje konzerviranost uloge DAR na lokomotivno ponašanje kod mušice i sisavaca (9). Ipak, mušice i sisavci ne dijele jednakost u svim neurotransmiterskim sustavima. Primjerice norepinefrin, koji je dio adrenergičnog neurotransmiterskog sustava kod ljudi, ne postoji kod mušice. Fiziološku funkciju adrenergičnog sustava kod mušice obavlja neurotransmiter oktopamin (koji se kod ljudi nalazi u tragovima) (14). Također, uloge neurotransmitera glutamata i acetilkolina su suprotne kod mušice i čovjeka, stoga je potreban je oprez kod interpretacije rezultata istraživanja na mušicama i ekstrapolacije na organizam čovjeka.

Gledano s aspekta ovisnosti, pokazane su sličnosti u razvoju fenotipa lokomotorne senzitivacije kod mušica u usporedbi sa glodavcima. U obje vrste je pokazana senzitivacija ovisna o vremenskom intervalu između doza i različita osjetljivost na psihostimulanse kod mužjaka i ženki (15).

1.1.3. Kvantifikacija lokomotorne senzitivacije kod *Drosophila melanogaster*

Lokomotorna senzitivacija se eksperimentalno može kvantificirati kao povećanje lokomotornog odgovora nakon ponovljenih administracija iste doze psihostimulansa. Jednostavni eseji mjerenja lokomotorne aktivnosti na modelima glodavaca su otkrili nekoliko gena i molekularnih mehanizma za koje se smatra da su povezani s indukcijom i ekspresijom lokomotorne senzitivacije. Kod vinske mušice, prvotna metoda mjerenja lokomotornog odgovora nakon administracije psihostimulansa je uključivala snimanje mušica uz bodovanje ponašanja. Nakon jednominutne administracije volatiliziranog kokaina, mušice su prebačene u arenu za snimanje nakon čega je bihevioralni odgovor ocijenjen po određenoj bodovnoj ljestvici (0 bodova:normalna lokomocija - 5 bodova:hiperlokomocija - 7 bodova:akinezija/smrt) (16). Bihevioralni odgovori su bodovani kao blagi (normalna lokomocija i čišćenje), umjereni (sporija lokomocija cirkularnog obrasca, ubrzano zujanje) i teški (tremor bez lokomocije, smrt). Nedostatak ove metode je subjektivnost eksperimentatora prilikom ocjenjivanja i dugotrajnost eksperimenta. Također, ova metoda nije visokoprotlačna, a rukovanje životinjama nakon administracije psihostimulansa može utjecati na rezultate.

Danas je komercijalno dostupan automatizirani sustav za mjerenje lokomotorne aktivnosti – *Drosophila* Activity Monitoring System (DAMS). DAMS omogućuje identifikaciju obrazaca ponašanja (lokomocije) kroz višesatne ili višednevne periode na populacijskoj i/ili individualnoj razini. Sustav snima aktivnost individualnih mušica koje se nalaze u zatvorenim staklenim cjevčicama u monitorima za praćenje aktivnosti (14). Sredinom svake cjevčice prolazi infracrvena (IR) zraka koja se prekida svaki puta kada mušica prijeđe sredinu cjevčice. Prekid IR zrake predstavlja aktivnost detektiranu kroz određeni vremenski interval i zabilježenu za svaku mušicu u eksperimentu. Budući da jedno računalo može simultano mjeriti aktivnost stotine mušica, ovaj sustav je koristan za visoko protočne analize, poput genetskog probira za identifikaciju novih gena.

1.2. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali se definiraju kao molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskoj orbitali (17). Zbog prisutnosti nesparenog elektrona, mnogi radikali su nestabilni i visoko reaktivni. Slobodni radikali sudjeluju u redoks reakcijama primanja elektrona (redukcija) i otpuštanja elektrona (oksidacija). Najvažnija skupina slobodnih radikala su reaktivne vrste kisika (engl. *Reactive oxygen species*; ROS). Molekularni kisik može uzimati elektrone drugim molekulama te autooksidacijom prijeći u radikal (18). Redukcijom jednog elektrona kisika nastaje superoksidni anion radikal ($O_2^{\bullet-}$) dok redukcijom dva elektrona nastaje vodikov peroksid (H_2O_2). Najpotentniji prooksidans je hidrosilni radikal ($^{\bullet}OH$) koji nastaje u Fenton-ovoj reakciji kada metal željeza transferira treći elektron na vodikov peroksid. Radikal dušikovog oksida (NO^{\bullet}) pripada reaktivnim dušikovim vrstama (engl. *Reactive nitrogen species*; RNS). Reakcijom radikala dušikovog oksida i superoksidnog aniona nastaje peroksinitrit ($ONOO^-$).

Slobodni radikali svakodnevno nastaju u metaboličkim procesima koji uključuju transfer elektrona. Primarno mjesto nastanka superoksidnog anion radikala je mitohondrij, gdje slobodni kisik „krade“ elektrone koji cure iz respiratornog elektron transportnog lanca (15). Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima, dok peroksinitrit nastaje tijekom upalnih procesa. ROS-ovi mogu nastati i u enzimatskim reakcijama koje su uključene u procese fagocitoze i sinteze prostaglandina (19). Vanjski izvori ROS-ova uključuju zagađenja zraka i okoliša (npr. dim cigarete, industrijska otapala, pesticidi i zračenje).

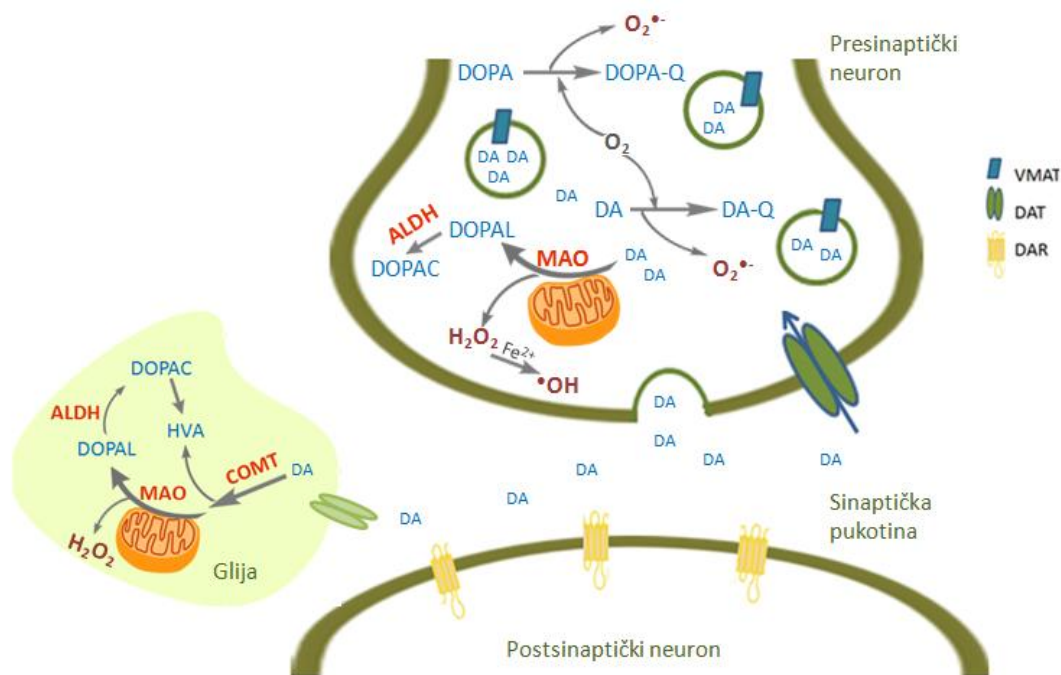
U malim koncentracijama slobodni radikali imaju povoljan utjecaj na organizam. Korisni su u procesima diferencijacije, organogeneze, regulacije imunološkog odgovora i vaskularnog tonusa (17). Pretpostavlja se da ROS-ovi djeluju kao sekundarni glasnici te su nužni za pravilno odvijanje staničnog signaliziranja. Prekomjerna proizvodnja slobodnih radikala i nedostatna eliminacija iz organizma putem antioksidativnih sustava rezultiraju poremećajem redoks homeostaze. Ovisno o tome koji su radikali povećani, stanje se naziva oksidativni ili nitrozativni stres. Suvišak ROS-ova cilja biološki važne molekule poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina te svojim djelovanjem uzrokuju

oštećenja stanice (19). Lipidna peroksidacija označava oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina koje su strukturni dio staničnih membrana. Oštećenje membrana, uključujući i membranu mitohondrija, dovodi do još većeg povećanja ROS-ova i stanične smrti. Oksidacijom aminokiselina ROS-ovi imaju utjecaj na promjenu aktivnosti enzima, receptora i membranskog transporta. Hidroksilni radikali se vežu na nukleinske baze i uzrokuju lomove nukleinskih kiselina što rezultira mutagenozom. Smatra se da oksidativni stres (OS) ima ulogu u patologiji neuroinflamatornih, neurodegenerativnih, kardiovaskularnih i gastrointestinalnih bolesti (18).

1.2.1. Oksidativni stres induciran dopaminom

Metabolizam DA je povezan s oksidativnim stresom. Pri normalnim fiziološkim uvjetima, DA je stabilan unutar sinaptičke vezikule. Prekomjerna količina citosolnog i/ili ekstracelularnog DA podliježe degradaciji pri čemu se stvaraju citotoksični ROS-ovi (Slika 3.) (6). Monoaminoooksidaza (MAO) oksidativnom deaminacijom pretvara citosolni DA u reaktivni DOPAL (3,4-dihidroksifenilacetaldehid) i H_2O_2 . Alkohol dehidrogenaza (ADH) ili aldehid dehidrogenaza (ALDH) pretvaraju DOPAL u DOPAC (3,4-dihidroksifeniloctena kiselina). Ekstracelularni DA se uklanja iz sinaptičke pukotine ponovnim unosom u neuron ili degradacijom putem glija stanica. U glija stanicama se, osim enzima MAO, ADH i ALDH, nalazi katehol-O-metiltransferaza (COMT) koja pretvara DOPAC u homovanilinsku kiselinu (HVA).

Spontanom autooksidacijom DA u citosolu nastaju reaktivni kinoni i ROS. DA i DOPA se lako oksidiraju i nastaju visoko reaktivni DA- i DOPA-kinoni (DA-Q i DOPA-Q) (20). Uz kinone nastaje superoksidni anion radikal koji posljedično povećava koncentraciju ROS i dovodi do oksidativnog stresa. Oksidacija dopamina se može katalizirati i sa enzimima koji posjeduju peroksidaznu aktivnost (npr. prostaglandin H sintaza, tirozinaza, lipooksigenaza,...) (5). Kinoni i ROS-ovi se mogu nespecifično vezati za stanične komponente stoga su potencijalno neurodegenerativni.



Slika 3. Shematski prikaz degradacije dopamina MAO enzimi se nalaze na vanjskim membranama mitohondrija u neuronima i glija stanicama, dok se COMT nalazi pretežno u glija stanicama (Sliku izradila studentica prema radu: Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. Cell Commun Signal CCS.,2013.;11(1):34, str.3)

1.3. Antioksidativni sustav

Redoks homeostaza organizma se zasniva na ravnoteži između proizvodnje i eliminacije ROS. Ravnoteža između prooksidansa i antioksidansa je važna jer uz eliminaciju i prevenciju štetnih utjecaja radikala, potrebna je i podrška korisnog utjecaja radikala na stanično signaliziranje, redoks regulaciju te obranu od patogenih mikroorganizama (21). Cilj antioksidativnog sustava je obrana organizma od štetnih učinaka slobodnih radikala na način da minimizira stvaranje i prekomjernu količinu ROS. Antioksidansi su stabilne molekule koje neutraliziraju slobodne radikale i time preveniraju oksidativna oštećenja stanice (19). Neki od glavnih mehanizama antioksidativne obrane uključuju „hvatanje“ (engl. *scavenging*) slobodnih radikala kroz doniranje elektrona ili atoma vodika. Osim hvatanja radikala, antioksidansi mogu djelovati kao kelatori metala (posebice onih koji sudjeluju u stvaranju ROS) te kao regulatori genske ekspresije (21).

U organizmu su prisutni prirodni antioksidansi koji čine enzimatske sustave obrane dok se neenzimatski i sintetički antioksidansi mogu unijeti u organizam putem hrane. Neki od najvažnijih endogenih antioksidativnih sustava čine enzimi superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) te katalaza (CAT). SOD katalizira pretvorbu superoksidnog anion radikala u vodikov peroksid kojeg zatim GPx i CAT pretvaraju u kisik i vodu (18). Egzogeni antioksidansi se uglavnom unose putem hrane ili dodataka prehrani, a najpoznatiji predstavnici su vitamin C i vitamin E (19). U mnogim modelima oksidativnog stresa, istraživano je antioksidativno djelovanje sintetski dobivenog TEMPOL-a. TEMPOL je redoks ciklirajući spoj, mimetik SOD koji uspješno eliminira superoksidne anion radikale (22). Također, pokazao je široko antioksidativno djelovanje protiv ostalih ROS i RNS uključujući hidroksil radikale i peroksinitrite.

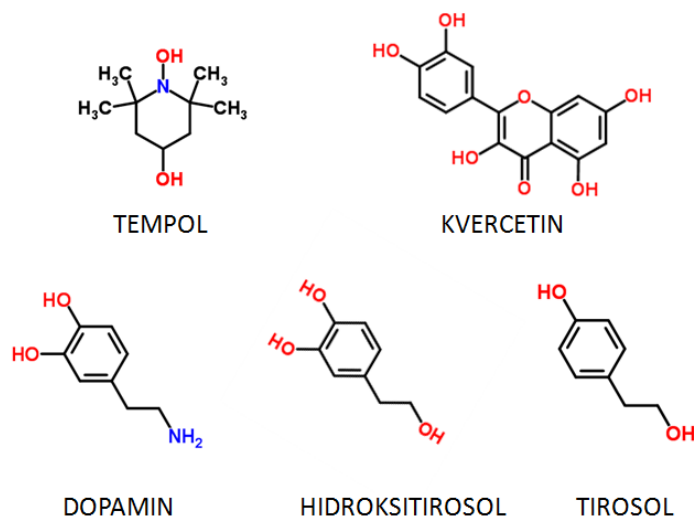
1.3.1. Egzogeni antioksidansi – Polifenoli

Smatra se da optimalan dnevni unos voća i povrća pokazuje blagotvoran utjecaj na općenito zdravlje te poboljšava antioksidativni status organizma (21). Upravo su u biljkama identificirani kemijski spojevi koje često prepoznajemo pod zajedničkim imenom polifenoli. Polifenoli su velika skupina sekundarnih metabolita biljaka koji pokazuju reducirajuća svojstva (doniraju atom vodika) i svojstva keliranja metala što ih čini potencijalnim antioksidansima (23). Osim direktnog antioksidativnog djelovanja, polifenoli mogu djelovati kao regulatori genske transkripcije i time utjecati na procese stanične smrti i starenja. Sve se više istražuje utjecaj polifenola na neurološka patološka stanja, uključujući neuroprotekciju dopaminskih neurona od oksidativnog oštećenja te utjecaj na moduliranje aktivnosti neurotransmiterskih transportera (23–25).

Flavonoidi su najbrojnija podskupina polifenola, a neki od glavnih predstavnika su kvercetin, resveratrol i kurkumin. Budući da kvercetin može prijeći krvno-moždanu barijeru, proučavana su njegova potencijalna neuroprotektivna svojstva. Kvercetin može djelovati kao direktni antioksidans (hvatanjem ROS i RNS), no može modulirati antioksidativnu obranu organizma aktivacijom Nrf2-ARE puta (26). Aktivacija Nrf2-ARE signalnog puta vodi do transkripcije brojnih antioksidativnih gena uključujući gene za SOD, GPx i CAT. Smatra se da je najbolji način za povećanje endogenih antioksidansa zapravo

sami oksidativni stres (21), stoga je moguće da se kvercetin, u slučaju aktivacije Nrf2-ARE, ponaša kao prooksidans.

Tirosol i hidroksitirosol su prirodni fenolni spojevi koji pripadaju polifenolnim antioksidansima. U istraživanjima je pokazano da hidroksitirosol sprječava citotoksičnost induciranu vodikovim peroksidom, dok tirosol smanjuje proizvodnju ROS (27). Iako su tirosol i hidroksitirosol prirodni polifenoli koji se pretežito nalaze u maslinovom ulju, istraživanja su otkrila put njihove endogene sinteze (28). U manjem putu oksidativnog metabolizma dopamina, reducira se DOPAL sa aldehyd reduktazom i nastaje DOPET, odnosno hidroksitirosol. S druge strane, endogeni tirosol se može stvoriti iz oksidativnog metabolizma tiramina, gdje se tiramin nakon deaminacije sa MAO dalje reducira u tirosol uz pomoć alkohol dehidrogenaze. Štoviše, nedavna istraživanja pokazuju da se egzogeni tirosol može biotransformirati u hidroksitirosol putem CYP enzimatskih sustava. Hidroksitirosol, kao i kvercetin ispoljava endogenu antioksidativnu aktivnost u mozgu putem aktiviranja Nrf2-ARE signalnog puta (29). Na Slici 4. su prikazane kemijske strukture neurotransmitera dopamina te antioksidativnih spojeva tempola, kvercetina, hidroksitirosola i tirosola.



Slika 4. Kemijske strukture dopamina i antioksidansa tempola, kvercetina, hidroksitirosola i tirosola

1.4. Utjecaj oksidativnog statusa na lokomotornu senzitivaciju

Povećanje lokomotorne aktivnosti nakon administracije COC i METH je primarno posredovano sa otpuštanjem DA u sinaptičku pukotinu. Već spomenuto, oksidativni metabolizam DA proizvodi ROS-ove i reaktivne DA-kinone. Mozak je posebno podložan oksidativnom oštećenju jer koristi puno kisika, posjeduje redoks metale poput željeza te ima visok udio višestruko nezasićenih masnih kiselina koje su podložne lipidnoj peroksidaciji (17). Za METH je poznato da uzrokuje neurotoksičnost dopaminskih neurona koja je vjerojatno posredovana oksidativnim stresom. Glavni mehanizmi neurotoksičnosti METH uključuju enzimatsku oksidaciju i autooksidaciju DA, aktivaciju glutamatnog NMDA receptora te mitohondrijsku disrupciju (30). Aktivacija NMDA receptora omogućava ulazak kalcija (Ca^{2+}) u neuron te dodatno povećava ROS i RNS. Povećanje radikala i akumulacija METH remeti elektron transportni lanac mitohondrija i dolazi do apoptoze dopaminergičnih neurona. Krajnji rezultat METH neurotoksičnosti je smanjena razina DA, DAT i TH (31). S druge strane, akutna i ponovljena administracija COC povećava ROS u dopaminergičnim moždanim strukturama štakora, no za razliku od METH, COC ne inducira neuronalnu apoptozu (32). Istraživanja su pokazala se tijekom oksidativnog metabolizma kokaina proizvode metaboliti (norkokain i derivati norkokaina) koji sudjeluju u redoks cikliranju i tako stvaraju slobodne radikale (8,33).

Slobodni radikali mogu biti uključeni u stanično signaliziranje i provedbu redoks procesa koji utječu na neuromodulaciju, transkripciju te transport iona. Upravo zbog utjecaja slobodnih radikala na enzime i proteine koji su osjetljivi na redoks stanje, sve se više istražuje povezanost oksidativnog stresa sa modulacijama u proteinskom signaliziranju koje mogu doprinijeti razvoju adiktivnog fenotipa. Utjecaj redoks posttranslacijskih modifikacija na proteine još uvijek nije razjašnjen u aspektu ovisnosti, no smatra se kako DA-kinoni ciljaju cisteinske ostatke proteina. Vezanjem za cisteinske ostatke, DA-kinoni inhibiraju funkciju proteina i posljedično dovode do citotoksičnosti. Na taj način, DA kinoni inaktiviraju TH i DAT što posljedično inhibira sintezu DA i ponovni unos u neuron (34,35). Istraživanja pokazuju kako se nakon administracije psihostimulansa mijenja redoks stanje neurona, osobito u dopaminergičnom sustavu nagrade te

da je povećanje oksidativnog stresa povezano sa lokomotornim odgovorom na psihostimulanse (35–38). Prethodna istraživanja su pokazala kako akutna administracija COC povećava oksidativno oštećenje u regijama mozga koje su važne za lokomotornu senzitivaciju (NAc i prefrontalni korteks) te da je povećanje lokomotornog odgovora na ponovljenu administraciju povezano s povećanjem oksidativnih markera (36,39). S obzirom da i METH dovodi do povećanja oksidativnog stresa, sve je veći fokus istraživača za potencijalnim pronalaskom povezanosti redoks stanja i bihevioralnih promjena induciranih psihostimulansima.

2. CILJ RADA

Svrha istraživačkog rada je ispitati utjecaj povećanog ili smanjenog oksidativnog statusa na razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljenu administraciju COC i METH kod vinske mušice.

Ciljevi istraživačkog rada:

- 1- Pokazati fenotip lokomotorne senzitivacije kod wt mušica koji je posljedica ponavljanih administracija COC i METH.
- 2- Istražiti utjecaj povećanog ili smanjenog oksidativnog statusa na promjenu lokomotorne aktivnosti nakon administracije COC i METH.

S obzirom na literaturne podatke, očekujemo da je oksidativni status povezan s promjenama u lokomotornoj aktivnosti koju induciraju COC i METH te da će povećanje i/ili smanjenje oksidativnog statusa dovesti do moduliranja lokomotornog odgovora. Naša hipoteza je bila da će egzogena primjena prooksidansa povećati oksidativni stres te će lokomotorni odgovor na COC i METH biti veći kod tretiranih mušica u odnosu na kontrolu. Sukladno tome, egzogena primjena antioksidansa će smanjiti oksidativni stres te će lokomotorni odgovor biti manji kod tretiranih mušica u odnosu na kontrolu.

- 3- Istražiti da li administracija psihostimulansa dovodi do promjena u razini oksidativnih markera: aktivnost enzima SOD i CAT i relativna koncentracija H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$. Kako bi ispitali da li predtretmani s prooksidansima i antioksidansima utječu na oksidativni status te tako mijenjaju bihevioralni fenotip, mjeriti ćemo navedene parametre kod predtretiranih mušica nakon ponovljene administracije COC i METH.
- 4- Usporediti bihevioralni (lokomotorna aktivnost) i biokemijski (oksidativni markeri) odgovor na opetovanu administraciju COC i METH kod mušica predtretiranih s prooksidansima i antioksidansima sa netretiranim mušicama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj i sortiranje vinske mušice (*Drosophila melanogaster*)

U ovom istraživanju kao model organizam je korištena vinska mušica divljeg tipa (engl. *wild type*, wt) - *Drosophila melanogaster*, soja Canton S. U svrhu razmnožavanja, mušice su uzgajane u plastičnim bocama na hrani koja sadrži vodu, šećer, agar, kukuruzno brašno i suhi kvasac uz dodatak antifungicida propionske kiseline i nipagina. Mušice su uzgajane na hrani s kukuruznim brašnom na 25°C uz 60-75% vlažnosti u 12-satnim svjetlo/mrak ciklusima.

Najmanje jedan dan prije predviđenog eksperimenta, provedena je anestezija s ugljikovim dioksidom (CO₂) s ciljem prikupljanja dovoljnog broja mušica određenog spola. Mušice su iz plastičnih boca prebačene u praznu plastičnu tubu gdje su prvo anestezirane, a zatim postavljene na poroznu podlogu koja otpušta CO₂. Sortiranje mužjaka i ženki je provedeno pod svjetlosnim mikroskopom pomoću kista. Sortirane mušice su prebačene u plastične tube na hranu koja sadrži vodu, šećer, agar, melasu, suhi kvasac, propionsku kiselinu i nipagin. Mušice su na hrani s melasom uzgajane u istim kontroliranim uvjetima koji su određeni za uzgoj na hrani s kukuruznim brašnom.

Priprema hrane sa suplementima

Utjecaj oksidativnog stresa se istraživao na mušicama hranjenim prooksidansima i/ili antioksidansima koji su dodani u standardnu hranu s melasom. Za pripremu hrane sa suplementima najprije je u plastičnu tubu dodana otopina suplementa, a zatim 10 ml otopljene standardne hrane s melasom. Smjesa je vorteksirana jednu minutu.

Volumeni suplementa koji su dodani u 10ml standardne hrane su 133µl 30% otopine vodikovog peroksida (H₂O₂), 500µl otopine 80mM parakvata (PQ), 500µl otopine 60mM tempola (TML), 480µl otopine 0,1mM kvercetina (QUE) i 124,5µl otopine 1 mM tirozola (TYR).

Konačne koncentracije suplementa u hrani za istraživanje prooksidativnog djelovanja su iznosile 0,4% vodikov peroksid (H₂O₂) i 4mM parakvat (PQ).

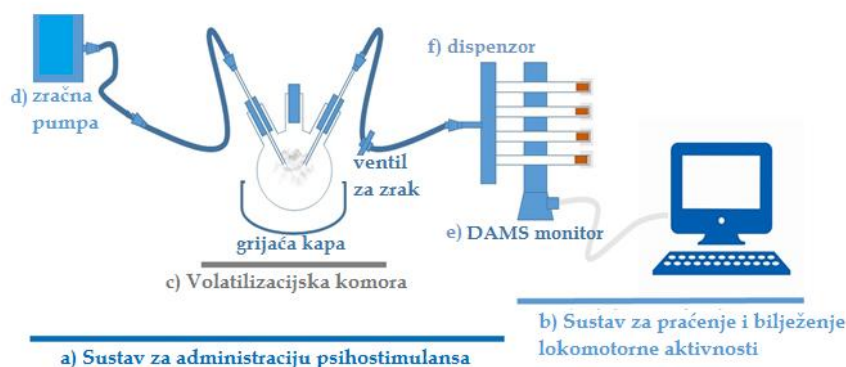
Konačne koncentracije suplementa u hrani za istraživanje antioksidativnog djelovanja su iznosile 3mM tempol (TML), 4,8mM kvercetin (QUE) i 12,45μM tirosol (TYR).

3.2. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na osjetljivost i lokomotornu senzitivaciju

Fly Bong platforma je korištena za administraciju psihostimulansa te praćenje lokomotornog odgovora prije, nakon prve i nakon druge administracije. Osjetljivost predstavlja povećanje lokomotornog odgovora na akutnu (prvu) dozu psihostimulansa u odnosu na lokomotorni odgovor prije administracije. Lokomotorna senzitivacija predstavlja povećanje lokomotornog odgovora nakon opetovane (druge) administracije psihostimulansa u odnosu na povećanje nakon prve doze.

Opis platforme

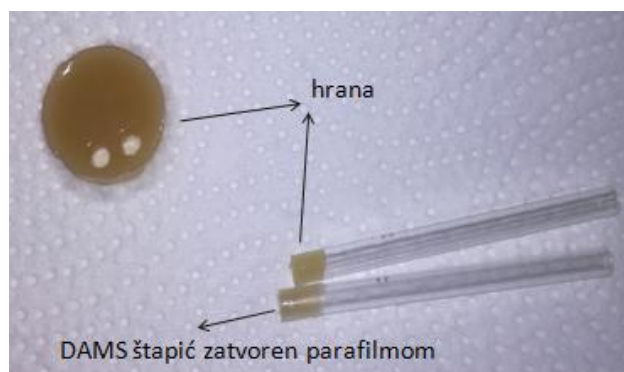
Slika 5. prikazuje shemu visokoprotočne Fly Bong platforme. Platformu čini sustav za administraciju psihostimulansa (a) i sustav za praćenje i bilježenje lokomotorne aktivnosti (b). Volatilizacijska komora (c) je dio sustava za administraciju, a sastoji se od grijaće kape i trogrle tikvice. Trogrla tikvica je sustavom cjevčica spojena na zračnu pumpu (d) s jednim otvorom, a s drugim otvorom je spojena na DAMS (Drosophila Activity Monitoring System) monitor (f) preko dispensora (g). DAMS monitor je spojen na računalo konektorima i telefonskim žicama. U DAMS monitoru se nalaze 32 plastična štapića sa hranom te se u svakom nalazi jedna mušica.



Slika 5. Shema FlyBong platforme za administraciju volatiliziranog psihostimulansa i praćenje linearne lokomocije

Priprema DAMS štapića

DAMS štapići su otvoreni s oba kraja te se na jednom kraju nalaze odvodne rupice za zrak. Kraj štapića na kojem su odvodne rupice se umetne u hranu i zatvori parafilmom kako se hrana ne bi osušila (Slika 6.). Ovim postupkom pripremljeni su štapići sa standardnom hranom na bazi melase i sa standardnom hranom sa suplementima (H_2O_2 , PQ, TML, QUE i TYR). Pomoću aspiratora upuhuje se po jedna mušica u svaki štapić te se prazni kraj štapića umetne u dispensor koji je spojen na DAMS monitor.

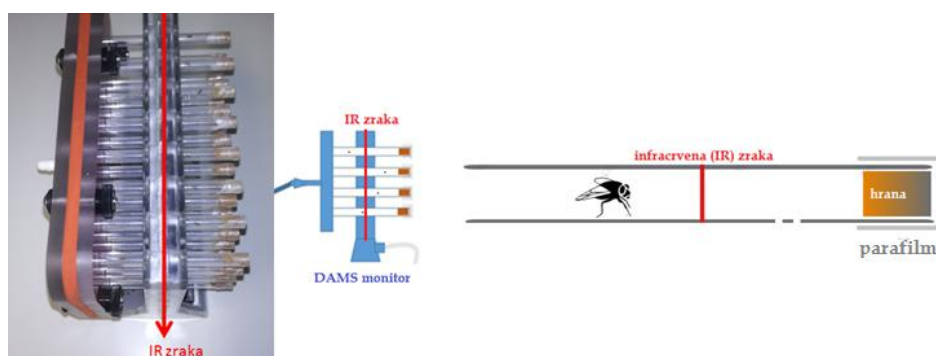


Slika 6. Priprema DAMS štapića

Administracija psihostimulansa

Svi eksperimenti su provedeni na mužjacima wt starim tri do pet dana. Netretirane (kontrolne) mušice su hranjene sa standardnom hranom dok su tretirane hranjene s 0,4% H_2O_2 , 4mM PQ, 3mM TML, 4,8mM QUE i/ili 12,45 μ M TYR. Tretirane mušice (H_2O_2 , PQ, TML, QUE i TYR) su prebačene na hranu sa suplementima 17-18 sati prije administracije te su ostale na istoj hrani tijekom obje administracije odnosno do kraja eksperimenta. Korišteni su psihostimulansi kokain (COC) i metamfetamin (METH). Otopina COC je dobivena otapanjem 10mg kokain hidroklorida u 1ml 100% etanola. Otopina METH je dobivena otapanjem 10mg metamfetamin hidroklorida u 1ml 100% etanola. Otopina psihostimulansa u koncentraciji od 75 μ g je dodana u trogrlu tikvicu najmanje četiri sata prije administracije kako bi etanol ishlapio prije početka eksperimenta i tako ne bi dodatno utjecao na ishode eksperimenata. Zagrijavanje psihostimulansa i pretvorba u volatilizirani oblik (aerosol) traje osam minuta i izvodi se pomoću grijaće kape koja dostiže temperaturu od 100-120°C. Nakon

zagrijavanja, otvara se ventil za zrak i pali se zračna pumpa koja dostavlja aerosol u dispensor koji ga ravnomjerno raspoređuje u 32 štapića. Duljina izlaganja volatiliziranom psihostimulansu iznosila je 1 minutu. Štapići u kojima se nalaze mušice u DAMS monitoru su postavljeni tako da po sredini štapića prolazi infracrvena (IR) zraka (Slika 7.). Svaki put kada mušica prijeđe sredinu štapića, IR zraka se prekida i prekid se u računalu bilježi kao lokomotorna aktivnost. Prva administracija 75 μ g COC je bila u 9:00, a druga administracija iste doze u 15:00 (interval između administracija je 6 sati). Prva administracija 75 μ g METH je bila u 9:00, a druga administracija iste doze u 19:00 (interval između administracija je 10 sati).



Slika 7. Shema prolaska IR zrake u DAMS monitoru i način postavljanja DAMS štapića

3.3. Određivanje markera oksidativnog statusa

3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze

Za svaku eksperimentalnu skupinu određena je enzimska aktivnost katalaze (CAT) prije, nakon prve i nakon druge administracije psihostimulansa. Enzimski ekstrakti su pripremljeni homogenizacijom 5 odraslih mušica u 800 μ l homogenizacijske otopine. Homogenizacijska otopina se sastoji od 0,05M kalijevog fosfata (pH 6,9) i 0,1% neionskog detergenta Triton X-100. Ekstrakti su centrifugirani 20 min na 14000rpm pri 4°C. Nakon centrifugiranja, 300 μ l supernatanta je razrijeđeno sa 600 μ l homogenizacijske otopine. U mikrotitarsku pločicu koja ima 48 jažica odpipetirano je 450 μ l otopine supstrata koja sadrži 0,05M fosfatni pufer (pH 6,9) i 15mM H₂O₂. Spektrofotometrom (infinite m200-Pro) je mjerena apsorbancija pri 240nm što predstavlja koncentraciju vodikovog peroksida prije dodanog enzimskog ekstrakta mušica. Rađeni su triplikati

enzimskih ekstrakata mušica u koncentracijama od 10,15,20 i 25 μ l. Nakon dodatka enzimskih ekstrakata u otopinu supstrata, mjerena je apsorbancija pri 240nm u periodu od 5 minuta. Dodatkom enzima, smanjuje se koncentracija vodikovog peroksida i računa se promjena u optičkoj gustoći (OD_{240}) tijekom 5 minuta. Izmjerene vrijednosti su dobivene u programu Tecan i-control. Kao rezultat je uzet prosjek vrijednosti OD_{240} triplikata za svaku dodanu koncentraciju ekstrakta zajedno sa pripadajućom standardnom pogreškom. Aktivnost enzima CAT je prikazana kao promjena OD_{240} po minuti i po 0,1 mikrogramu enzimskog ekstrakta ($OD_{240}/\text{minuta}/0,1 \text{ mg}$).

3.3.2.Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze

Za svaku eksperimentalnu skupinu određena je enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) prije, nakon prve i nakon druge administracije psihostimulansa. Enzimski ekstrakti su pripremljeni na isti način kao za mjerenje aktivnosti enzima CAT. U mikrotitarsku pločicu koja ima 48 jažica odpipetirano je 450 μ l otopine supstrata koja sadrži 20mM fosfatnog pufera (pH 10), 0,8mM TEMED-a, 0,8mM EDTA-e i 0,5mM kvercetina. Spektrofotometrom (infinite m200-Pro) je mjerena apsorbancija pri 406nm što predstavlja koncentraciju kvercetina. Rađeni su triplikati enzimskih ekstrakata u koncentracijama od 10,15,20 i 25 μ l. Nakon dodatka enzimskih ekstrakata u otopinu supstrata, mjerena je apsorbancija pri 406nm u periodu od 10 minuta. Dodatkom enzima, smanjuje se oksidacija kvercetina u prisutnosti TEMED-a i računa se promjena u optičkoj gustoći (OD_{406}) tijekom 10 minuta. Izmjerene vrijednosti su dobivene u programu Tecan i-control. Aktivnost SOD je mjera u kojoj je oksidacija kvercetina u prisutnosti TEMED-a inhibirana sa enzimskim ekstraktom. Kao rezultat je uzet prosjek vrijednosti OD_{406} triplikata za svaku dodanu koncentraciju ekstrakta zajedno sa pripadajućom standardnom pogreškom. Aktivnost enzima SOD je prikazana kao % inhibicije oksidacije kvercetina po minuti i po 0,1 mikrogramu enzimskog ekstrakta (%inhibicije oksidacije QUE/minuta/0,1 mg).

3.3.3.Mjerenje koncentracije vodikovog peroksida

Za svaku eksperimentalnu skupinu, određena je koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) u ekstraktima cijelih mušica prije, nakon prve i nakon druge administracije psihostimulansa. Za mjerenje koncentracije vodikovog peroksida, korišten je 2',7'-diklorofluorescein (H_2DCF). U prisutstvu vodikovog peroksida,

H₂DCF se konvertira u fluorescentni spoj. Homogenizirane su tri mušice u 150μl ekstracijskog pufera RIPA. Uzorci su centrifugirani 20 min na 14000 rpm pri 4°C. Na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica, odpipetirano je 10μl homogenata u triplikatu i dodano je 140μl PBS koji sadrži 50μM H₂DCF. Reakcija je inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi. Spektrofotometrom (infinite m200-Pro) je mjerena fluorescencija na 515nm ekscitacije i 680nm emisije. Relativni intenzitet fluorescencije je normaliziran sa koncentracijom proteina. Koncentracija vodikovog peroksida je prikazana kao relativni intenzitet fluorescencije pri 515nm/680nm.

3.3.4. Mjerenje koncentracije superoksidnog anion radikala

Za svaku eksperimentalnu skupinu, određena je koncentracija superoksidnog anion radikala (O₂^{•-}) u ekstraktima cijelih mušica prije, nakon prve i nakon druge administracije psihostimulansa. Za mjerenje koncentracije superoksidnog anion radikala, korišten je dihidroetidij (DHE). U prisutstvu superoksidnog anion radikala, DHE se konvertira u fluorescentni spoj. Homogenizirane su tri mušice u 150μl pufera za lizu (50mM HEPES pH 7,4, 5mM CHAPS i 5mM DTT). Uzorci su centrifugirani na 14000rpm kroz 20 minuta na 4°C. Na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica, odpipetirano je 10μl homogenata u triplikatu i dodano je 140μl PBS koji sadrži 10μM DHE. Reakcija je inkubirana u mraku na sobnoj temperaturi u periodu od 10minuta. Spektrofotometrom (infinite m200-Pro) je mjerena fluorescencija na 485nm ekscitacije i 585nm emisije. Relativni intenzitet fluorescencije je normaliziran sa koncentracijom proteina. Koncentracija superoksidnog anion radikala je prikazana kao relativni intenzitet fluorescencije pri 485nm/585nm.

3.4. Prikaz, analiza i statistička obrada rezultata

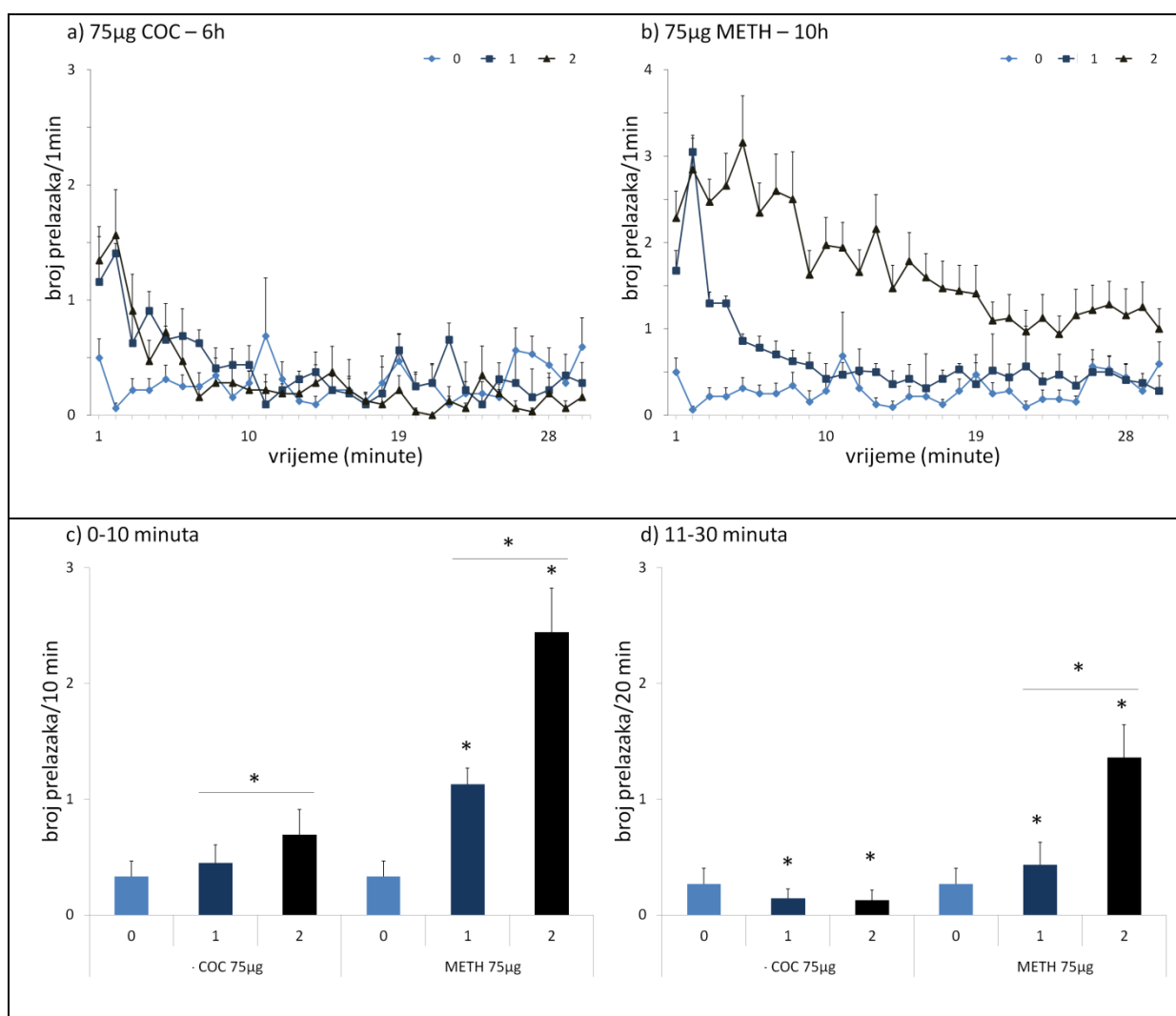
Analiza izlaznih podataka DAMS sustava o lokomotornoj aktivnosti je obrađena u programima Actogram J i Excel. Analizom podataka je utvrđena lokomotorna aktivnost prije, nakon prve i nakon druge administracije psihostimulansa kod svih eksperimentalnih skupina. Rezultati su prikazani histogramom kao populacijski odgovor mušica 10 ili 20 minuta prije te nakon prve i nakon druge administracije psihostimulansa. Histogrami koji prikazuju populacijski odgovor u 10 minuta, označavaju period od 0. do 10. minute, dok

populacijski odgovor u 20 minuta označava period od 11. do 30. minute prije ili nakon administracije. Prosječni lokomotorni odgovor mušica 10 minuta nakon prve administracije predstavlja mjeru osjetljivosti, dok prosječni lokomotorni odgovor mušica 10 minuta nakon druge administracije predstavlja prisutstvo/odsutstvo lokomotorne senzitivacije. Također, rezultati su prikazani kao linijske krivulje koje predstavljaju prosječni broj prelazaka mušica u pojedinoj minuti. U daljnjem tekstu, pojam „netretirane“ se odnosi na vrstu hrane na kojoj su mušice uzgajane, a ne na administraciju psihostimulansa (netretirane ili kontrolne mušice su hranjene sa standardnom hranom na bazi melase). Izlazni podaci o promjeni apsorbancije za mjerenje biomarkera oksidativnog statusa su dobiveni u programu Tecan i-control, a analiza je obrađena u Excel-u. Statistički testovi su provedeni u programu Statistica 8. Za usporedbu lokomotornog odgovora unutar ispitivane skupine korišten je t-test za zavisne uzorke. Za usporedbu lokomotornog odgovora između različitih ispitivanih skupina korišten je t-test za nezavisne uzorke. Za usporedbu aktivnosti antioksidativnih enzima korištena je One way ANOVA (*post hoc*: Tukey multiple comparison test). Određen je Pearsonov koeficijent korelacije za određivanje korelacije između markera oksidativnog statusa i antioksidativnih enzima te je interpretacija provedena po Petzovoj ljestvici. Razina statističke značajnosti iznosi $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Lokomotorna senzitivacija na ponovljenu dozu psihostimulansa

Testirali smo utjecaj volatiliziranog COC i METH na promjenu lokomotorne aktivnosti nakon akutne (prve) i ponovljene (druge) administracije kod wt mušica. S obzirom na prethodna saznanja, vremenski interval između dvije administracije iste doze COC za izazivanje lokomotorne senzitivacije je iznosio 6 sati, a za METH 10 sati. Ista doza psihostimulansa, administrirana u navedenim vremenskim intervalima dovodi do progresivnog povećanja lokomotornog odgovora što je vidljivo iz Slike 8.a i b.



Slika 8. Ponovljena administracija iste doze METH razvija lokomotornu senzitivaciju kod wt mušica DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica prije

i nakon dvije administracije 75 μ g volatiliziranog COC ili METH. Prosječna lokomotorna aktivnost je prikazana kao prosječni broj prelazaka DAMS štapića po minuti tijekom 30 minuta za populaciju mušica izloženih COC (a), ili izloženih METH (b), a isti rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška za period od prvih 10 (c) i drugih 20 (d) minuta. Mušice su hranjene sa standardnom hranom na bazi melase (n=64). Prva administracija COC i METH je provedena u 09:00. Druga administracija za COC je provedena u 15:00, a za METH u 19:00. 0-10 (c) ili 11-30 minuta (d) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test za zavisne uzorke)

Slika 8.c prikazuje prosječnu lokomotornu aktivnost 10 minuta prije i 10 minuta nakon administracije COC ili METH. wt mušice pokazuju osjetljivost na prvu dozu METH, a ponovljena administracija iste doze dovodi do povećanja lokomotorne aktivnosti što se naziva lokomotorna senzitivacija. Iako nije statistički značajno, prva administracija COC dovodi do povećanja lokomocije u usporedbi s bazalnim odgovorom (lokomotorna aktivnost prije administracije). Opetovana administracija COC dovodi do značajnog povećanja lokomotorne aktivnosti u odnosu na aktivnost nakon prve administracije.

Slika 8.d prikazuje prosječnu lokomotornu aktivnost u periodu od 20 minuta, odnosno lokomotorni odgovor od 11.-30. minute prije te nakon administracije COC ili METH. Mušice koje su primile METH pokazuju perzistentnu lokomotornu senzitivaciju i nakon 10 minuta, dok mušice koje su primile COC pokazuju značajno smanjenje lokomotorne aktivnosti nakon obje administracije. Ovi rezultati pokazuju da METH u koncentraciji od 75 μ g pokazuje jači i dugotrajniji utjecaj na povećanje lokomotorne aktivnosti i razvoj lokomotorne senzitivacije u usporedbi s istom koncentracijom COC.

4.2. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na razvoj lokomotorne senzitivacije

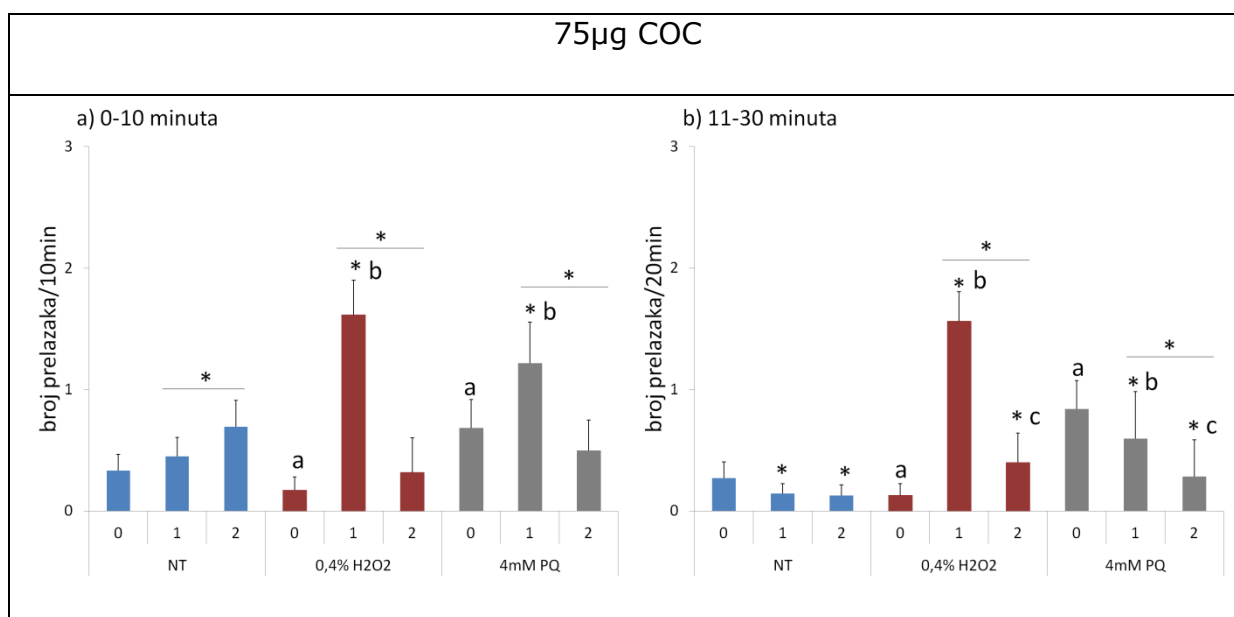
Evaluirali smo utjecaj oksidativnog statusa na lokomotornu aktivnost prije i nakon primjene volatiliziranog COC ili METH. Kako bi testirali hipotezu da će oksidativni status promijeniti lokomotorni odgovor na prvu i ponovljenu dozu psihostimulansa u odnosu na kontrolu, mušice su hranjene standardnom hranom uz dodatak prooksidansa ili antioksidansa. Za induciranje oksidativnog stresa

korišteni su vodikov peroksid (H_2O_2) i parakvat (PQ), a za suprimiranje tempol (TML), kvercetin (QUE) i tirozol (TYR).

Prooksidansi: Vodikov peroksid i parakvat

Budući da se literaturno navodi da je oksidativni stres induciran COC ili METH povezan sa razvojem lokomotorne senzitivacije (35–39), očekivali smo da će tretman s prooksidansima povećati lokomotornu aktivnost nakon administracija psihostimulansa u odnosu na kontrolu.

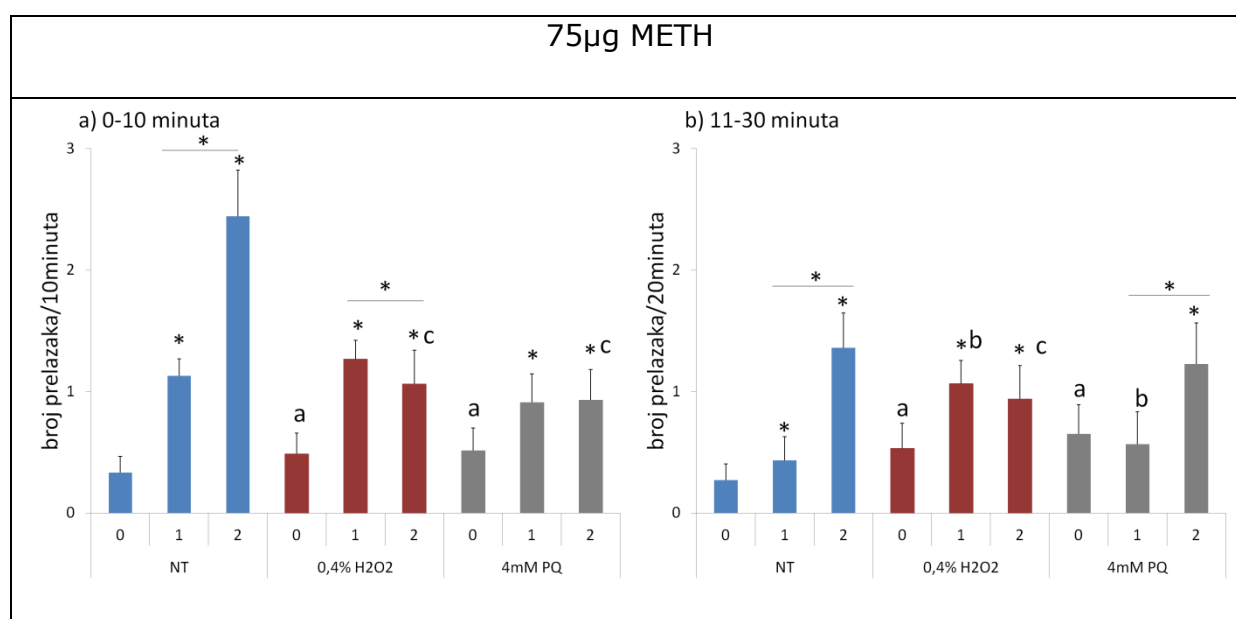
Tretman s prooksidansima je spriječio razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljenu administraciju COC (Slika 9.). U odnosu na kontrolne netretirane mušice, lokomotorni odgovor na prvu administraciju je značajno veći kod oba prooksidativna tretmana dok je odgovor na drugu administraciju značajno manji u odnosu na prvu administraciju. Prooksidansi održavaju povećani lokomotorni odgovor na prvu administraciju te povećavaju odgovor na drugu administraciju u odnosu na kontrolu (Slika 9.b). Razlike između djelovanja H_2O_2 i parakvata su te da parakvat podiže bazalnu aktivnost tijekom 30 minuta, dok H_2O_2 povećava lokomotorni odgovor na prvu administraciju (dodatni materijali: Slika 1.).



Slika 9. Vodikov peroksid (H_2O_2) i parakvat (PQ) sprječavaju razvoj lokomotorne senzitivacije na opetovanu administraciju COC DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica prije i nakon dvije administracije 75 μ g

volatiliziranog COC u razmaku od 6 sati. Određen je prosječni lokomotorni odgovor prije, nakon prve i nakon druge administracije COC za netretirane NT (n=64) i tretirane mušjake s 0,4% H₂O₂ (n=64) i 4mM PQ (n=32). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina ± standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test unutar skupine za zavisne uzorke), a = p<0,05 u odnosu na NT prije administracije, b = p<0,05 u odnosu na NT nakon prve administracije, c = p<0,05 u odnosu na NT nakon druge administracije (a,b i c – t-test između skupina za nezavisne uzorke)

Slično kao kod COC, tretman s prooksidansima je spriječio razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljenu administraciju METH (Slika 10.). U prvih 10 minuta, prva administracija METH ne dovodi do značajnih razlika u lokomotivnosti između kontrolnih i tretiranih mušica te ne dovodi do povećanja odgovora na drugu administraciju (Slika 10.a). U drugih 20 minuta, oba prooksidansa pokazuju veći lokomotorni odgovor na prvu administraciju u odnosu na kontrolu (Slika 10.b). Tretman s parakvatom pokazuje konzistentno povećanje bazalne aktivnosti u odnosu na kontrolu, dok u usporedbi s H₂O₂ pokazuje manju lokomotornu aktivnost nakon prve administracije (dodatni materijali: Slika 4.).



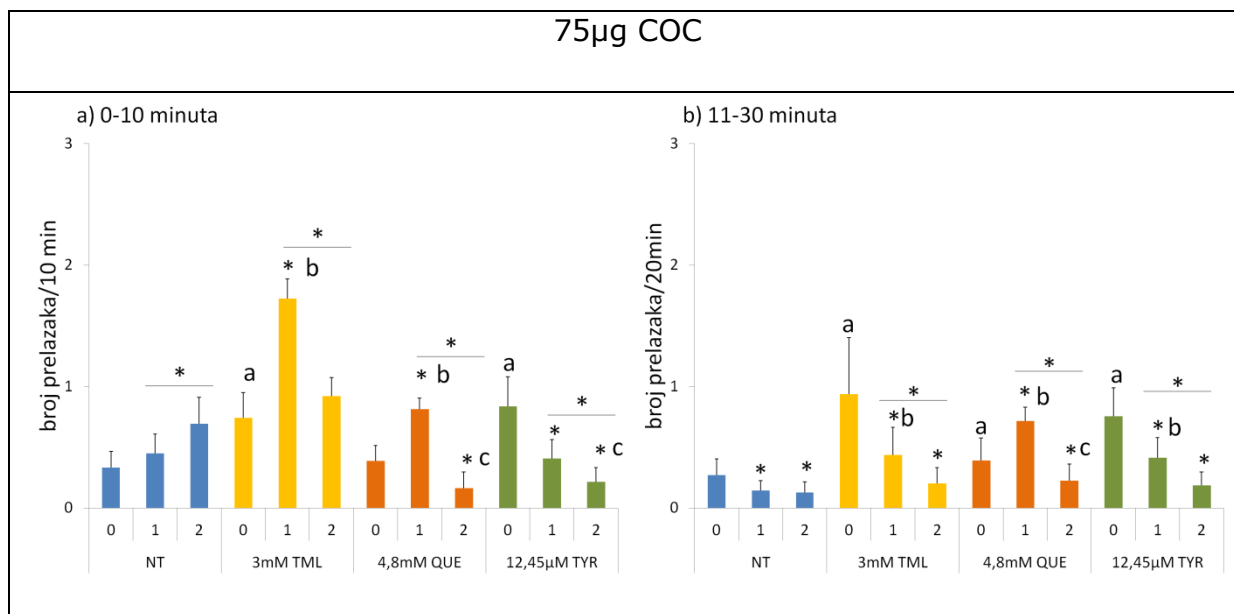
Slika 10. Vodikov peroksid (H₂O₂) i parakvat (PQ) sprječavaju razvoj lokomotorne senzitivacije na opetovanu administraciju METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica prije i nakon dvije administracije 75µg

volatiliziranog METH u razmaku od 10 sati. Određen je prosječni lokomotorni odgovor prije, nakon prve i nakon druge administracije METH za netretirane NT (n=64) i tretirane mužjake s 0,4% H₂O₂ (n=64) i 4mM PQ (n=32). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina ± standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test unutar skupine za zavisne uzorke), a = p<0,05 u odnosu na NT prije administracije, b= p<0,05 u odnosu na NT nakon prve administracije, c= p<0,05 u odnosu na NT nakon druge administracije (a,b i c – t-test između skupina za nezavisne uzorke)

Antioksidansi: Tempol, kvercetin i tirosol

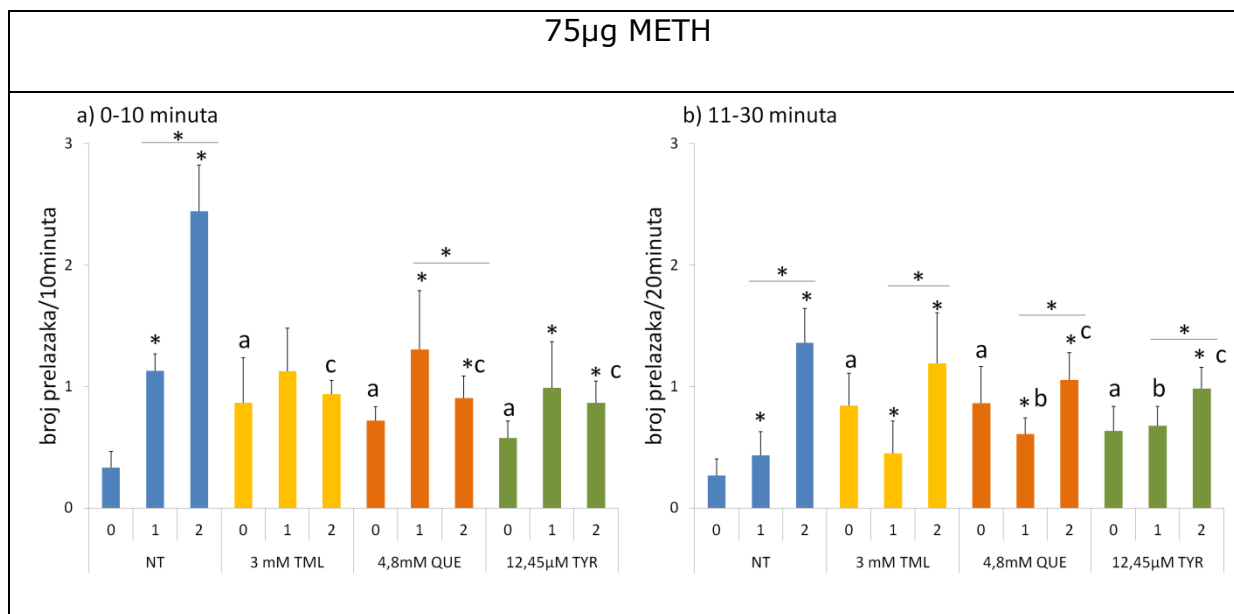
Kako bi testirali hipotezu da li će egzogena primjena antioksidansa smanjiti oksidativni status induciran COC i METH te spriječiti lokomotornu senzitivaciju, mušice smo tretirali s antioksidansima prije i tijekom dvije administracije COC ili METH.

Svi tretmani s antioksidansima su spriječili razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljenu administraciju COC (Slika 11.). Postoje razlike između antioksidativnih tretmana u lokomotornoj aktivnosti prije te nakon prve administracije. Bazična aktivnost mušica tretiranih s tempolom i tirosolom je značajno veća od kontrole tijekom 30 minuta. U prvih 10 minuta, lokomotorni odgovor na prvu administraciju je značajno veći kod mušica tretiranih tempolom i kvercetinom u odnosu na kontrolu. Usporedbom antioksidativnih tretmana, uočeno je da tempol značajno povećava lokomotornu aktivnost u prvih 10 minuta nakon obje administracije COC u odnosu na kvercetin i tirosol (dodatni materijali: Slika 6.). S obzirom da je lokomotorni odgovor na COC kod kontrolnih mušica gotov u prvih 10 minuta, količina lokomocije u drugih 20 minuta je jako niska. U odnosu na kontrolu, svi antioksidativni tretmani su značajno povećali bazalnu aktivnost te aktivnost nakon prve administracije (Slika 11.b).



Slika 11. Tempol (TML), kvercetin (QUE) i tirosol (TYR) sprječavaju razvoj lokomotorne senzitivacije na opetovanu administraciju COC DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica prije i nakon dvije administracije 75 μ g volatiliranog COC u razmaku od 6 sati. Određen je prosječni lokomotorni odgovor prije, nakon prve i nakon druge administracije COC za netretirane NT (n=64) i tretirane mužjake s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test unutar skupine za zavisne uzorke), a = p<0,05 u odnosu na NT prije administracije, b= p<0,05 u odnosu na NT nakon prve administracije, c= p<0,05 u odnosu na NT nakon druge administracije (a,b i c – t-test između skupina za nezavisne uzorke)

Kao i kod COC, tretmani s antioksidansima su spriječili razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljenu administraciju METH (Slika 12.). U prvih 10 minuta svi tretmani značajno ne povećavaju lokomotornu aktivnost nakon prve administracije, iako je bazalna razina lokomocije veća nego kod kontrola. Usporedbom antioksidativnih tretmana u prvih 10 minuta, nisu uočene značajne razlike u lokomotornoj aktivnosti nakon druge administracije, dok je kvercetin pokazao najveći odgovor na prvu administraciju (dodatni materijali: Slika 8.). U drugih 20 minuta, svi antioksidansi pokazuju sličan obrazac promjena lokomotorne aktivnosti (Slika 12.b).



Slika 12. Tempol (TML), kvercetin (QUE) i tirozol (TYR) sprječavaju razvoj lokomotorne senzitivacije na opetovanu administraciju METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica prije i nakon dvije administracije 75 μ g volatiliziranog METH u razmaku od 10 sati. Određen je prosječni lokomotorni odgovor prije, nakon prve i nakon druge administracije METH za netretirane NT (n=64) i tretirane mužjake s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test unutar skupine za zavisne uzorke), a = p<0,05 u odnosu na NT prije administracije, b= p<0,05 u odnosu na NT nakon prve administracije, c= p<0,05 u odnosu na NT nakon druge administracije (a,b i c – t-test između skupina za nezavisne uzorke)

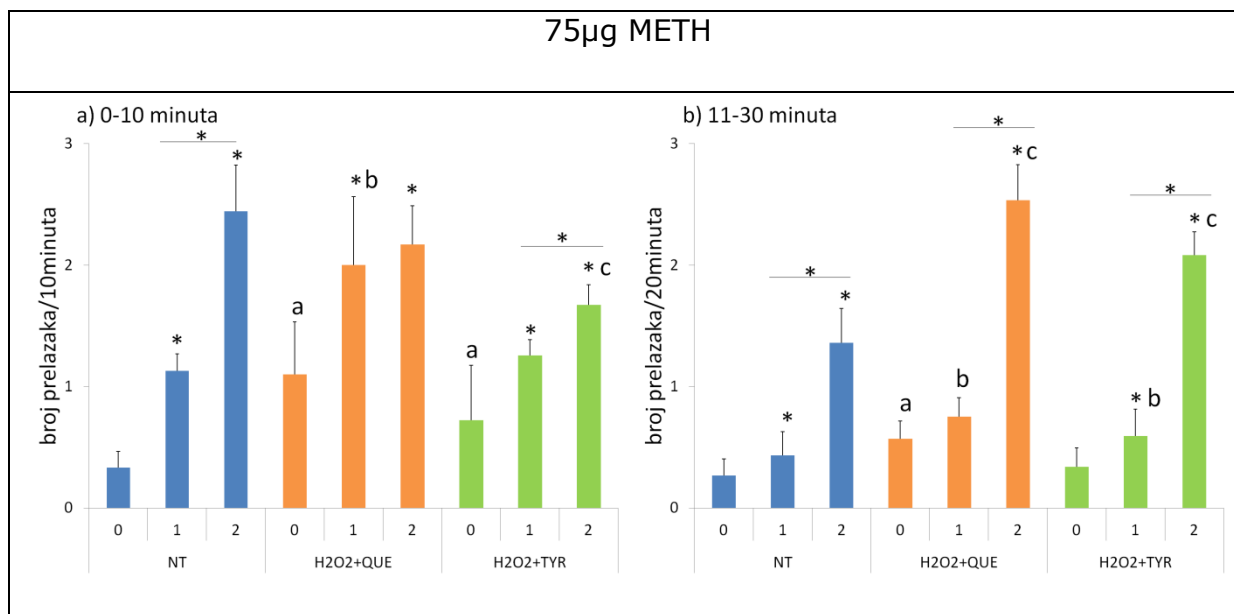
4.3. Utjecaj kombiniranog tretmana s prooksidansom i antioksidansom na razvoj lokomotorne senzitivacije

Tretmani s prooksidansima i tretmani s antioksidansima su doveli do neočekivanih rezultata, gdje su i povećanje i smanjenje oksidativnog statusa spriječili lokomotornu senzitivaciju. Stoga smo postavili hipotezu da je za razvoj lokomotorne senzitivacije važna redoks ravnoteža. Kako bi to testirali, mušice smo istovremeno tretirali sa kombinacijom prooksidansa i antioksidansa. Tretirane mušice su hranjene standardnom hranom uz dodatak vodikovog peroksida i kvercetina (H_2O_2+QUE) ili vodikovog peroksida i tirosola (H_2O_2+TYR) prije i tijekom dvije administracije COC ili METH.

Tretman koji sadrži kombinaciju prooksidansa i antioksidansa dovodi do obnavljanja lokomotorne senzitivacije što je vidljivo iz Slike 13. koja uspoređuje lokomotorni odgovor prije te nakon prve i ponovljene administracije METH. Iako oba kombinirana tretmana pokazuju povećanje bazalne aktivnosti, METH povećava lokomotornu aktivnost nakon prve administracije u prvih 10 minuta kod H_2O_2+QUE i H_2O_2+TYR tretiranih mušica (Slika 13.a). Nakon druge administracije dolazi do razvoja lokomotorne senzitivacije slično kao kod kontrole. U odnosu na kontrolu, intenzitet promjena lokomotorne aktivnosti je slabiji u prvih 10 minuta, a jači u ostalih 20 minuta.

Kombinirani tretman s H_2O_2+QUE značajno povećava lokomotivnost nakon prve administracije u odnosu na kontrolu pa ponovljena administracija nema značajan efekt. Slično, u periodu od 11. do 30. minute, bazalna razina lokomotivnosti kod H_2O_2+QUE je veća od kontrole pa prva administracija ne dovodi do značajnog povećanja lokomotivnosti. Međutim, i kod H_2O_2+QUE i H_2O_2+TYR , odgovor na drugu administraciju tijekom drugih 20 minuta je vrlo intenzivan te je veći u odnosu na prvu administraciju i u odnosu na kontrolu (Slika 13.b.).

Kombinirani tretman s H_2O_2+QUE pokazuje veću lokomotivnost u svim segmentima usporedbe (bazalna te aktivnost nakon prve i druge administracije) u odnosu na tretman s H_2O_2+TYR (dodatni materijali; Slika 10.).



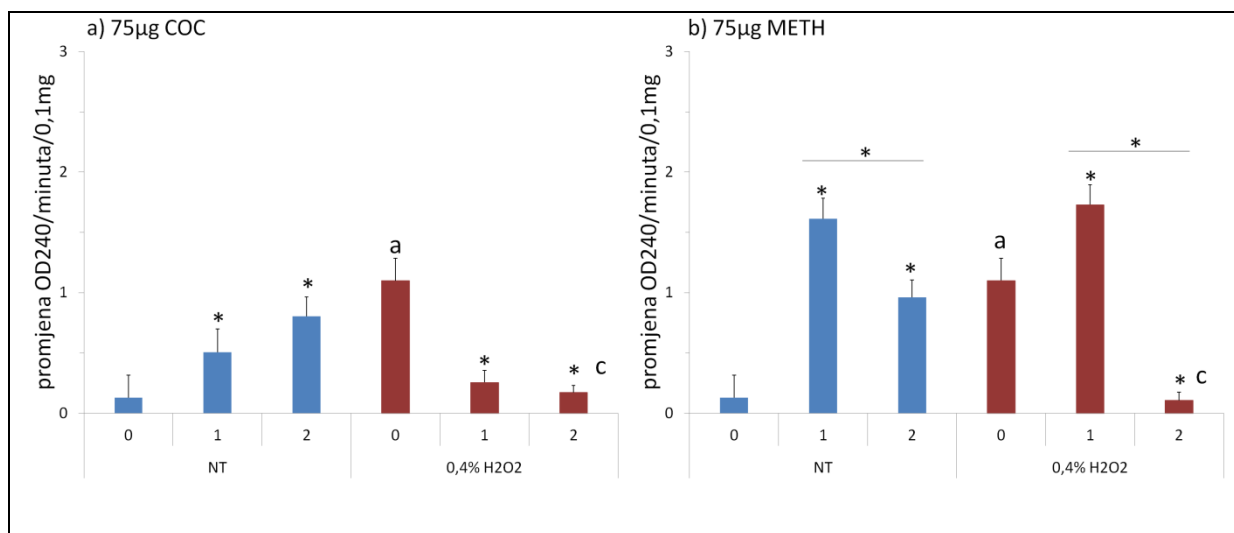
Slika 13. Kombinirani tretman s H₂O₂ i TYR obnavlja lokomotornu senzitivaciju na opetovanu administraciju METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica prije i nakon dvije administracije 75 μ g volatiliranog METH u razmaku od 10 sati. Određen je prosječni lokomotorni odgovor prije, nakon prve i nakon druge administracije METH za netretirane NT (n=64) i tretirane mušjake s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test unutar skupine za zavisne uzorke), a = p<0,05 u odnosu na NT prije administracije, b= p<0,05 u odnosu na NT nakon prve administracije, c= p<0,05 u odnosu na NT nakon druge administracije (a,b i c – t-test između skupina za nezavisne uzorke)

4.4. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na aktivnost antioksidativnih enzima nakon administracije psihostimulansa

Mjerali smo aktivnost antioksidativnih enzima prije i nakon dvije administracije COC i METH kod netretiranih i tretiranih skupina (H_2O_2 , QUE i TYR) kako bi vidjeli da li psihostimulansi dovode do promjena u njihovoj aktivnosti. Također, zanimalo nas je da li će uočene promjene ići u istom smjeru kod tretmana s prooksidansom kao i tretmana s antioksidansima budući da su pokazali slično djelovanje na lokomotornu senzitivaciju.

Katalaza

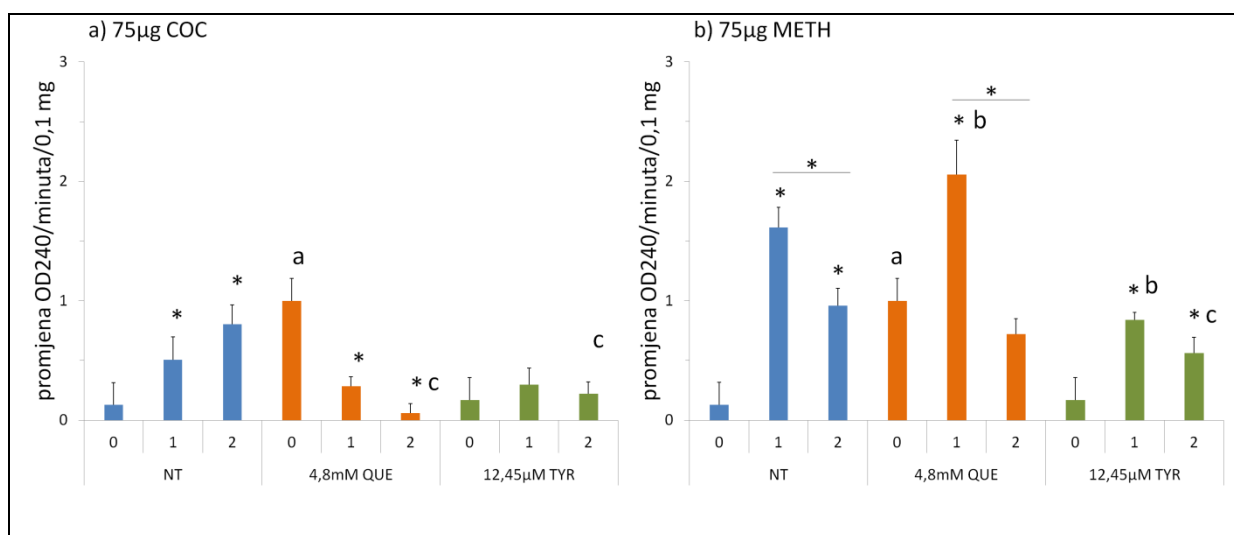
Administracija COC i METH dovodi do povećanja aktivnosti katalaze (CAT) kod netretiranih, kontrolnih mušica (Slika 14 i 15.a i b). Prva administracija METH dovodi do značajnog povećanja aktivnosti CAT, a ista se smanjuje nakon ponovljene administracije. Za razliku od METH, COC slabije inducira aktivnost CAT, ali je povećanje progresivno. Povećanje nakon druge administracije COC ili METH je slično bazalnoj aktivnosti CAT koju pokazuju mušice tretirane s H_2O_2 . Kod tretiranih mušica, oba psihostimulansa nakon druge administracije smanjuju aktivnost CAT (Slika 14.a i b).



Slika 14. Psihostimulansi povećavaju, a u kombinaciji s vodikovim peroksidom (H_2O_2) smanjuju aktivnost CAT Određena je aktivnost katalaze (CAT) prije (0), nakon prve (1) i nakon druge (2) administracije COC (a) i METH (b) za netretirane NT i tretirane mušjake s 0,4% H_2O_2 (n=5 za svaku eksperimentalnu skupinu). Aktivnost CAT je određena mjerenjem promjene apsorbancije H_2O_2 (pri 240nm) u periodu od 5 minuta u

enzimskim ekstraktima cijelih mušica. * $p < 0,05$ (One way ANOVA, Tukey multiple comparison test); a = $p < 0,05$ u odnosu na NT prije administracije, b = $p < 0,05$ u odnosu na NT nakon prve administracije, c = $p < 0,05$ u odnosu na NT nakon druge administracije

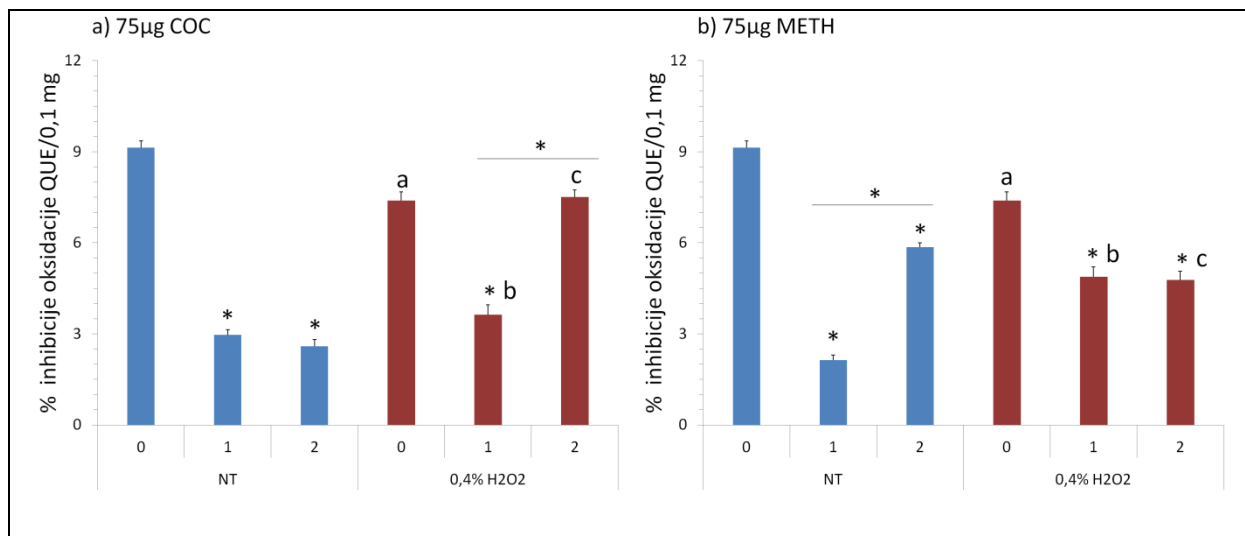
Promjene aktivnosti CAT nakon administracije COC i METH idu u istom smjeru kod mušica tretiranih s H_2O_2 i kod mušica tretiranih s kvercetinom (Slika 15.a i b). Administracije COC smanjuju aktivnost CAT kod mušica tretiranih kvercetinom, dok kod tirosola nema značajnih promjena u odnosu na bazalnu aktivnost (Slika 15.a). Nakon administracija METH, tretman s tirosolom pokazuje sličan obrazac promjena kao kontrola, ali je intenzitet promjena slabiji (Slika 15.b).



Slika 15. Aktivnost CAT nakon administracije METH je slična kod netretiranih i mušica tretiranih tirosolom (TYR) Određena je aktivnost katalaze (CAT) prije (0), nakon prve (1) i nakon druge (2) administracije COC (a) i METH (b) za netretirane NT i tretirane mušjake s 4,8mM QUE i 12,45µM TYR (n=5 za svaku eksperimentalnu skupinu). Aktivnost CAT je određena mjerenjem promjene apsorbancije H_2O_2 (pri 240nm) u periodu od 5 minuta u enzimskim ekstraktima cijelih mušica. * $p < 0,05$ (One way ANOVA, Tukey multiple comparison test); a = $p < 0,05$ u odnosu na NT prije administracije, b = $p < 0,05$ u odnosu na NT nakon prve administracije, c = $p < 0,05$ u odnosu na NT nakon druge administracije

Superoksid dismutaza

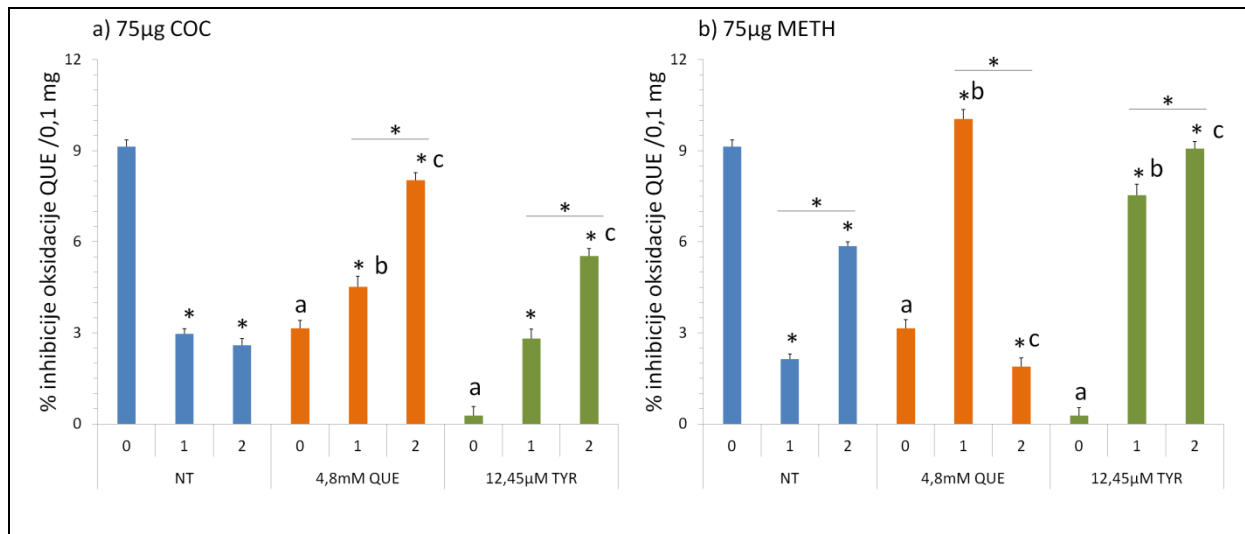
Administracija COC i METH dovodi do smanjenja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod netretiranih, kontrolnih mušica (Slika 16 i 17.a i b). Tretman s H_2O_2 mijenja bazalnu aktivnost SOD u odnosu na kontrolu (Slika 16.a i b). Kod mušica tretiranih s H_2O_2 , prva administracija COC ili METH uzrokuje značajno smanjenje aktivnosti SOD, slično kontroli, dok druga administracija COC povećava aktivnost SOD u usporedbi s kontrolom.



Slika 16. Promjene aktivnosti SOD nakon administracije COC i METH su slične kod netretiranih i mušica tretiranih s vodikovim peroksidom (H_2O_2) Određena je aktivnost superoksid dismutaze (SOD) prije (0), nakon prve (1) i nakon druge (2) administracije COC (a) i METH (b) za netretirane NT i tretirane mužjake s 0,4% H_2O_2 (n=5 za svaku eksperimentalnu skupinu). Aktivnost SOD je određena mjerenjem promjene apsorbancije kvercetina (pri 406nm) u periodu od 10 minuta u enzimskim ekstraktima cijelih mušica. * $p < 0,05$ (One way ANOVA, Tukey multiple comparison test); a = $p < 0,05$ u odnosu na NT prije administracije, b = $p < 0,05$ u odnosu na NT nakon prve administracije, c = $p < 0,05$ u odnosu na NT nakon druge administracije

Za razliku od utjecaja prooksidansa (H_2O_2), tretmani s antioksidansima djeluju suprotno na aktivnost SOD od samih psihostimulansa. Tretmani s kvercetinom i tirosolom pokazuju progresivno povećanje aktivnosti SOD nakon administracije COC u odnosu na kontrolu (Slika 17.a). Nakon administracije METH, tretman s kvercetinom u potpunosti mijenja smjer promjena aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu, dok se kod tirosola to primjećuje samo nakon prve

administracije (Slika 17.b). Oba antioksidansa konzistentno smanjuju aktivnost SOD prije administracije COC i METH u usporedbi s kontrolom.



Slika 17. Mušice tretirane s kvercetinom (QUE) i tirosolom (TYR) pokazuju suprotne promjene aktivnosti SOD nakon administracije COC i METH u odnosu na netretirane mušice Određena je aktivnost superoksid dismutaze (SOD) prije (0), nakon prve (1) i nakon druge (2) administracije COC (a) i METH (b) za netretirane NT i tretirane mužjake s 4,8mM QUE i 12,45µM TYR (n=5 za svaku eksperimentalnu skupinu). Aktivnost SOD je određena mjerenjem promjene apsorbancije kvercetina (pri 406nm) u periodu od 10 minuta u enzimskim ekstraktima cijelih mušica. *p<0,05 (One way ANOVA, Tukey multiple comparison test); a = p<0,05 u odnosu na NT prije administracije, b= p<0,05 u odnosu na NT nakon prve administracije, c= p<0,05 u odnosu na NT nakon druge administracije

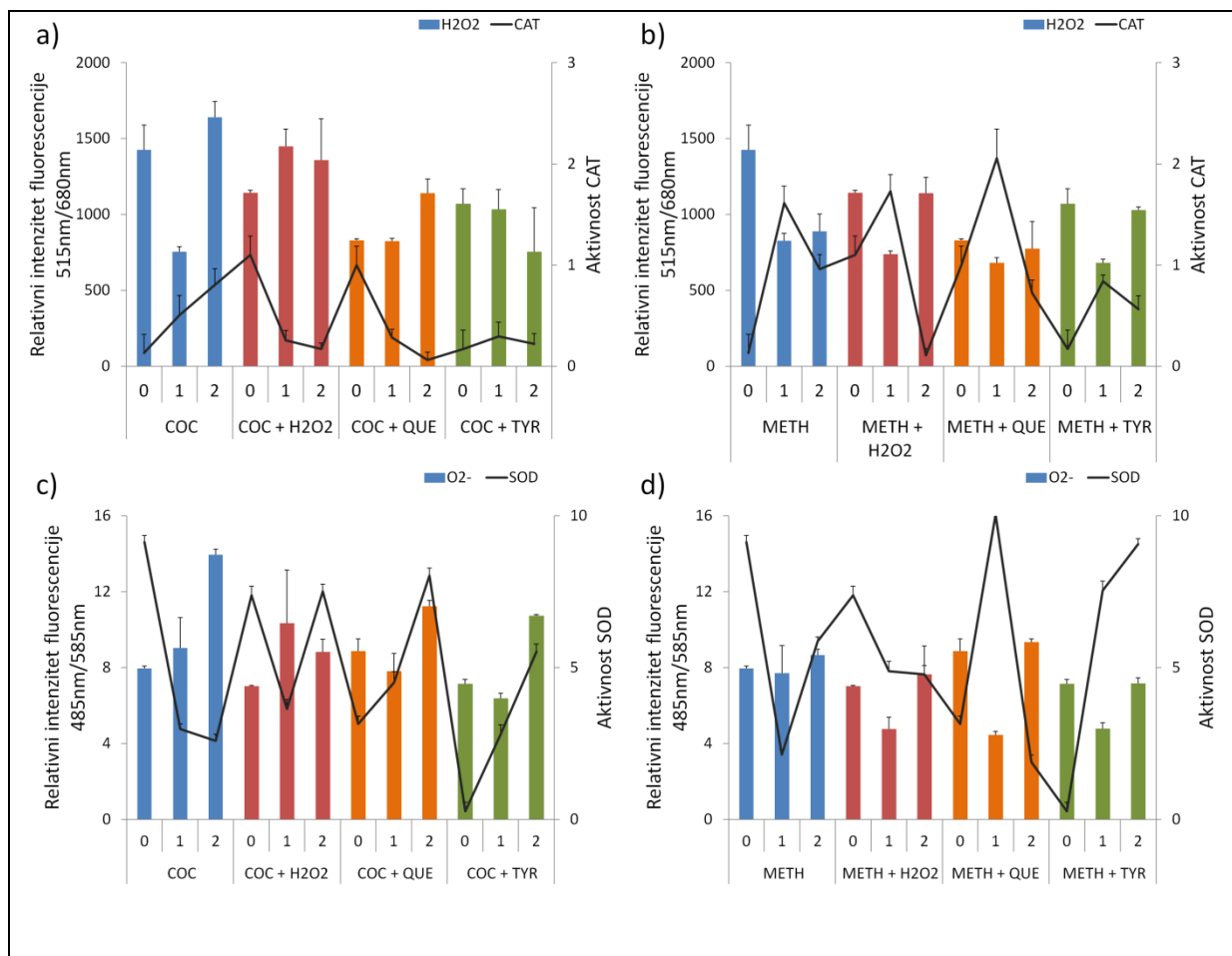
4.5. Utjecaj prooksidansa i antioksidansa na količinu markera oksidativnog statusa nakon administracije psihostimulansa

Kako bi dobili bolji uvid u promjene oksidativnog statusa koje su inducirane administracijom psihostimulansa, mjerili smo koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2) i superoksidnog anion radikala ($O_2^{\bullet-}$) u ekstraktima cijelih mušica kod netretiranih i tretiranih skupina (H_2O_2 , QUE i TYR). Krivulje aktivnosti antioksidativnih enzima (CAT i SOD) su plotirane radi interpretacije dinamike i smjera promjena koncentracije H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$.

Kako bi uvidjeli moguću povezanost između markera oksidativnog statusa i aktivnosti antioksidativnih enzima, korelirali smo aktivnost CAT sa koncentracijom H_2O_2 te aktivnost SOD sa koncentracijom $O_2^{\bullet-}$. Pronađena je jaka negativna korelacija između vrijednosti koncentracija oksidativnih markera i aktivnosti enzima nakon administracija COC (Pearsonov koeficijent korelacije $r = -0,89$; $p < 0,001$) i METH (Pearsonov koeficijent korelacije $r = -0,72$; $p < 0,001$). Negativna korelacija znači da je smanjenje koncentracije oksidativnih markera praćeno povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima i obrnuto.

Prva administracija COC smanjuje, dok ponovljena povećava koncentraciju H_2O_2 kod kontrolnih mušica (Slika 18.a). Bazalne koncentracije i koncentracije H_2O_2 nakon druge administracije COC su manje kod svih tretmana u usporedbi s kontrolom. U slučaju METH, prva i druga administracija smanjuju koncentraciju H_2O_2 kod kontrolnih mušica (Slika 18.b). Bazalne koncentracije H_2O_2 su manje kod svih tretmana, a tretman s H_2O_2 i tirosolom povećava koncentraciju H_2O_2 nakon druge administracije METH u odnosu na kontrolu.

Kontrolne mušice pokazuju progresivno povećanje koncentracije $O_2^{\bullet-}$ nakon administracija COC (Slika 18.c). Kod svih tretiranih mušica, uočeno je smanjenje koncentracije $O_2^{\bullet-}$ nakon druge administracije, u odnosu na kontrolu, dok ni prva ni druga administracija METH ne uzrokuje značajno povećanje koncentracije $O_2^{\bullet-}$ kod kontrolnih mušica (Slika 18.d). Kod svih tretmana je uočeno smanjenje koncentracije $O_2^{\bullet-}$ nakon prve administracije METH u odnosu na kontrolu.



Slika 18. Koncentracije H₂O₂ (a,b) i O₂⁻ (c,d) su u korelaciji sa promjenama aktivnosti antioksidativnih enzima nakon administracija volatiliziranog COC i METH Određena je koncentracija vodikovog peroksida i superoksidnog radikala prije (0), nakon prve (1) i nakon druge (2) administracije 75µg COC i 75µg METH kod netretiranih i tretiranih skupina. Mušice su tretirane s 0,4% H₂O₂, 4,8mM QUE ili 12,45µM TYR (n=3 za svaku eksperimentalnu skupinu). Apscisa prikazuje koncentraciju vodikovog peroksida kao relativni intenzitet fluorescencije pri 515nm/680nm, dok sekundarna ordinata prikazuje aktivnost CAT (a i b). Apscisa prikazuje koncentraciju superoksidnog radikala kao relativni intenzitet fluorescencije pri 485nm/585nm, dok sekundarna ordinata prikazuje aktivnost SOD (c i d).

5. RASPRAVA

Glavni rezultati ovog istraživanja su pokazali da kod vinske mušice tretman s prooksidansima ili antioksidansima sprječava lokomotornu senzitivizaciju na ponovljenu administraciju COC ili METH. Sukladno promjenama lokomotorne aktivnosti, pokazali smo da se mijenja razina antioksidativnih enzima SOD i CAT i razina oksidativnih markera H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$. Naši rezultati sugeriraju da oksidativne promjene reguliraju neuralnu plastičnost, odnosno utječu na promjene u lokomotornoj aktivnosti koje su inducirane psihostimulansima.

COC i METH su psihostimulansi čija administracija uzrokuje povećanje lokomotornog odgovora, a ponovljena administracija iste doze dovodi do lokomotorne senzitivizacije gdje je lokomotorni odgovor na ponovljenu dozu jači u usporedbi s odgovorom na prvu dozu (3). S obzirom da prethodna saznanja iz našeg laboratorija, wt mušicama smo inducirali lokomotornu senzitivizaciju sa psihostimulansima i pokazali smo da METH ima jači utjecaj na povećanje lokomotorne aktivnosti i razvoj lokomotorne senzitivizacije u usporedbi s istom koncentracijom COC. Kod wt mušica, ponovljena doza METH nakon 10 sati je razvila dugotrajnu lokomotornu senzitivizaciju koja je prisutna tijekom 30 minuta. Za razliku od METH, lokomotorna senzitivizacija kod COC je inducirana u vremenskom intervalu od 6 sati, a povećanje lokomotorne aktivnosti je prisutno u prvih 10 minuta eksperimenta. Moguće objašnjenje ove razlike je da COC uzrokuje stereotipna ponašanja poput cirkularne lokomocije mušica te zujanja na jednom mjestu koja DAMS sustav ne detektira kao linearno povećanje lokomotorne aktivnosti.

Mi smo postavili hipotezu da će tretman s prooksidansima (H_2O_2 i PQ) kod vinskih mušica ojačati lokomotorni odgovor na ponovljenu administraciju COC ili METH te da će lokomotorna senzitivizacija biti intenzivnija u odnosu na kontrolu (wt). Budući da administracija COC i METH povećava oksidativne markere, smatrali smo da će egzogeno povećanje oksidativnog statusa, uz hipotezu da ima utjecaja na lokomotornu senzitivizaciju, dovesti do pojačanja lokomotorne senzitivizacije. Kao prooksidans smo koristili H_2O_2 jer on nastaje u metaboličkim reakcijama koje uključuju slobodne radikale i metabolizam DA. PQ se u istraživanjima koristi za induciranje oksidativnog stresa i dobivanje modela

Parkinsonove bolesti koju karakterizira gubitak DA neurona (40), stoga smo pretpostavili da neurotoksičnost PQ može biti slična onoj koju inducira METH.

Suprotno očekivanjima, tretmani s prooksidansima su spriječili razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljene administracije COC ili METH. Iako do sada nije ispitivan utjecaj prooksidansa na lokomotorni odgovor na psihostimulanse, istraživana je utjecaj prooksidansa na lokomotornu aktivnost. Tako H₂O₂ inicijalno povećava lokomotornu aktivnost, no nakon 12 sati supresira dnevni lokomotorni ritam – mušice su bile više aktivne tijekom perioda spavanja i manje aktivne tijekom perioda budnosti u odnosu na kontrolu (41). Ti rezultati sugeriraju ulogu H₂O₂ u lokomotornom ponašanju kod mušica, a budući da H₂O₂ nastaje nakon administracije psihostimulansa pretpostavljamo da on djeluje na promjenu lokomotornog odgovora na COC i METH.

Nadalje, pronađeno je da višak H₂O₂ reverzibilno inhibira DAT (35), a taj mehanizam je ovisan o Ca²⁺ (42). Naši rezultati pokazuju da tretman s H₂O₂ značajno povećava lokomotivnost nakon prve administracije COC. Možemo pretpostaviti kako povećana lokomotivnost nakon prve administracije COC kod H₂O₂ tretiranih mušica dovodi do inhibicije DAT koja ostaje prisutna i u odsustvu kokaina, stoga ekstracelularni DA još uvijek pretjerano stimulira DAR. S druge strane, prva administracija METH nije dovela do značajnih promjena u lokomotornoj aktivnosti mušica tretiranih s H₂O₂ i netretiranih mušica. Pretpostavljamo da zbog inhibicije DAT, druga administracija METH ne može ispoljiti svoje djelovanje na reverzni transport citosolnog DA kroz DAT stoga je i stimulacija DAR receptora manja, a s time i lokomotivnost. Za METH je već spomenuto kako kroz aktivaciju glutamatnih NMDA receptora omogućuje ulazak Ca²⁺ u neuron što vjerojatno može posredovati djelovanju H₂O₂.

Smatra se da PQ uzrokuje neurotoksičnost DA neurona zbog povećanja ROS-a u mitohondriju, ponajviše superoksidnog anion radikala (43,44). Istraživanja pokazuju da PQ utječe na funkciju DA kroz smanjenje DOPAC i HVA, povećavanje podložnosti DA autooksidaciji i u konačnici smanjenju lokomotorne aktivnosti (40,44,45). U literaturi, PQ utječe na smanjenje lokomotivnosti, no naši rezultati pokazuju da tretman s PQ povećava bazalnu aktivnost prije administracije COC ili METH. Mogući razlog neslaganja je efekt doze, jer smo mi koristili značajno manju koncentraciju PQ u usporedbi s literaturnim. Zbog toga

pretpostavljamo kako u malim koncentracijama PQ može utjecati na ekspresiju endogenih antioksidativnih sustava što će smanjiti učinak neurotoksičnosti.

Radi toga što psihostimulansi induciraju oksidativni stres postavili smo hipotezu da će tretman s antioksidansima smanjiti oksidativni stres i tako umanjiti lokomotornu senzitivaciju, a naši rezultati na COC i na METH su to i potvrdili. Naši rezultati se slažu s literaturnim, gdje je pokazano da kod glodavaca predtretman s TML smanjuje oksidativno oštećenje te sprječava razvoj lokomotorne senzitivacije na ponovljenu administraciju COC i METH (36,39,46). Istraživanja pokazuju da kod štakora TML smanjuje povećanje lokomotorne aktivnosti inducirane METH-om, ali bez utjecaja na bazalnu aktivnost (37). Međutim, naši rezultati pokazuju da svi antioksidativni tretmani (TML, QUE i TYR) povećavaju bazalnu aktivnost prije administracije METH, dok je u slučaju COC bazalna aktivnost povećana kod TML i TYR tretmana. Iako postoje pojedine razlike između antioksidativnih tretmana, njihovo djelovanje na lokomotornu senzitivaciju je konzistentno stoga možemo pretpostaviti da imaju sličan mehanizam antioksidativnog djelovanja.

U istraživanju na miševima, autori su pratili utjecaj sulforafana (antioksidans iz povrća) na lokomotornu senzitivaciju na METH (31). Antioksidans sulforafan je spriječio razvoj lokomotorne senzitivacije, kao i antioksidansi iz našeg istraživanja, a sugerira se da neuroprotektivni učinak ispoljava kroz aktivaciju Nrf2-ARE puta. Stoga pretpostavljamo da je jedan od potencijalnih mehanizama djelovanja antioksidansa u našim eksperimentima aktivacija Nrf2-ARE puta, što je i literaturno potvrđeno za polifenol QUE (26). Jedno od objašnjenja naših rezultata, gdje su prooksidansi i antioksidansi pokazali sličan učinak, je da se polifenoli (antioksidansi) u danim koncentracijama zapravo ponašaju kao prooksidansi. U stanju blagog oksidativnog stresa, događa se aktivacija Nrf2-ARE puta i povećava se endogena antioksidativna obrana.

Kako bi ispitali da je za razvoj lokomotorne senzitivacije važna ravnoteža u redoks statusu pratili smo učinak kombiniranog tretmana s prooksidansom i antioksidansom na promjenu lokomotorne aktivnosti nakon administracije METH. Kombinirani tretmani s H₂O₂ i QUE, odnosno H₂O₂ i TYR su obnovili lokomotornu senzitivaciju na ponovljenu administraciju METH. Iako je bazalna aktivnost bila veća kod tretiranih mušica, došlo je do progresivnog povećanja

odgovora na ponovljenu administraciju METH. Bazalna aktivnost je bila povećana i kod samostalnih tretmana s prooksidansima ili antioksidansima te je ostala povećana i kod kombiniranog tretmana. Samostalni tretmani s prooksidansima i antioksidansima su pokazali sličan obrazac promjena lokomocije, a s obzirom da se antioksidansi mogu ponašati kao prooksidansi, moguće objašnjenje je da kombinirani tretman dovodi do pojačanog prooksidativnog djelovanja. To može odgovoriti na našu postavljenu hipotezu da će povećanje prooksidativnog djelovanja dovesti do pojačane lokomotorne senzitivizacije. Međutim, budući da su prooksidansi i antioksidansi zajedno stavljeni u hranu, postoji mogućnost međusobne interakcije već u hrani, a manjak interakcije u organizmu mušice. Mi sugeriramo da postoji i alternativno objašnjenje da se prooksidansi i antioksidansi već u hrani neutraliziraju stoga se nakon administracije METH pokazuje wt fenotip lokomotorne senzitivizacije.

Istraživanja pokazuju da polifenoli mogu stupati u interakciju sa DAT i time regulirati DA neurotransmisiju (23). QUE povećava ponovni unos DA kroz DAT što objašnjava njegovu potencijalnu neuroprotektivnu ulogu (25). Pretpostavka je da polifenoli mogu pružiti pozitivnu ulogu kod ovisničkog fenotipa jer uklanjaju prekomjerni ekstracelularni DA iz sinaptičke pukotine, čime se sprječava stimulacija receptora i lokomotorna senzitivizacija. S obzirom na literaturne podatke, povećanje antioksidativne obrane u mozgu administracijom egzogenih antioksidansa dovodi do smanjenja lokomotorne senzitivizacije što sugerira da su ključni proteini uključeni u ovisnička ponašanja, primjerice DAT, mogući redoks senzori koji su osjetljivi na promjene oksidativnog statusa.

Naša mjerenja su provedena na ekstraktima cijelim mušica, stoga ne znamo koje se promjene događaju u mozgu. Ipak, značajan dio DA se proizvodi i izvan mozga (6), a kod vinske mušice DA je jednako prisutan u cijelom tijelu (4). Moguće je da se promjene oksidativnog statusa događaju u cijelom organizmu te da psihostimulansi imaju značajan utjecaj na oksidativni status izvan mozga što objašnjava našu konzistentnost i korelaciju između antioksidativnih enzima i oksidativnih markera.

Naši rezultati pokazuju da se s porastom aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i CAT smanjuje koncentracija oksidativnih markera H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$, i obrnuto. Kod wt kontrolnih mušica, prva administracija COC ili METH povećava aktivnost

CAT, dok druga administracija COC povećava, a METH smanjuje koncentraciju H_2O_2 . Ti rezultati se slažu sa istraživanjima koja pokazuju da METH inhibira enzim MAO stoga ne dolazi do prekomjerne pretvorbe H_2O_2 (34).

Zanimljivo je da tretman s QUE pokazuje sličan efekt kao tretman s H_2O_2 na smanjenje aktivnosti CAT nakon administracije COC i METH. U isto vrijeme, koncentracija H_2O_2 se povećava pa možemo pretpostaviti da se QUE ponaša kao prooksidans. Tretman s TYR je pokazao najmanju koncentraciju H_2O_2 stoga pretpostavljamo da TYR posjeduje direktna antioksidativna svojstva jer istovremeno održava bazalnu razinu CAT kao i kod kontrole, te antagonizira povećanje CAT nakon administracije COC ili METH.

Rezultati su pokazali da je aktivnost SOD smanjena kod kontrolnih mušica nakon ponovljene administracije COC ili METH. I u ovom slučaju su uočene razlike između psihostimulansa, gdje administracija COC progresivno povećava koncentraciju $O_2^{\bullet-}$, dok METH ne uzrokuje značajne promjene koncentracije $O_2^{\bullet-}$.

Naši rezultati su pokazali da prooksidansi imaju sličan učinak na aktivnost SOD kao i sami psihostimulansi (kod kontrolnih mušica) gdje je aktivnost SOD nakon administracije smanjena. Interesantno je da su tretmani s antioksidansima pokazali suprotne učinke na aktivnost SOD od prooksidansa i netretiranih mušica. QUE i TYR su pokazali značajno smanjenje aktivnosti SOD prije administracije psihostimulansa u odnosu na kontrolu, što sugerira njihovo konzistentno djelovanje na endogenu aktivnost SOD.

Budući da je TML kao mimik SOD u prethodno navedenim istraživanjima doveo do smanjenja oksidativnih markera te je spriječio razvoj lokomotorne senzitivacije na COC i METH, smatra se da je $O_2^{\bullet-}$ važan za promjene lokomocije inducirane psihostimulansima.

Nadalje, administracija METH povećava DA autooksidaciju u neuronima što dovodi do nastanka DA kinona i $O_2^{\bullet-}$, a uz utjecaj METH na mitohondrij dodatno se povećava $O_2^{\bullet-}$. U istraživanjima su pronašli da su NAc neuroni glavni izvor ROS nakon administracije COC i METH, dok u glija stanicama nisu pronašli značajna povećanja (36,37). Uz inhibiciju enzima MAO, pretpostavka je da dolazi do prekomjerne proizvodnje $O_2^{\bullet-}$ i DA-kinona koji svojim djelovanjem na redoks osjetljive proteine mogu utjecati na dopaminergičnu neurotransmisiju.

Važno je za spomenuti kako se smatra da SOD može djelovati kao semikinon oksidoreduktaza čime prevenira proizvodnju DA kinona te da aktivacija Nrf2-ARE puta pokazuje isti učinak (47). Nadalje, istraživanja pokazuju kako apoptoza DA neurona može biti spriječena sa dodatkom SOD, ali ne i CAT što ide u prilog potencijalnoj ulozi $O_2^{\bullet-}$ u lokomotornom odgovoru na psihostimulans (20).

Nerazmjernost u korelaciji između koncentracija oksidativnih markera i antioksidativnih enzima je najčešće uočena nakon druge administracije COC ili METH. Pretpostavka je da antioksidativni enzimi nisu u mogućnosti nositi se s prevelikom količinom radikala koja dolazi nakon administracije psihostimulansa, no ne možemo isključiti potencijalni mehanizam direktnog djelovanja na „hvatanje“ slobodnih radikala. Štoviše, budući da smo u nekim slučajevima uočili da tretmani s antioksidansima smanjuju koncentracije oksidativnih markera nakon administracije psihostimulansa, može se pretpostaviti da posjeduju i direktna antioksidativna svojstva. S druge strane, nestabilnost radikala dovodi do njihove brze pretvorbe u druge vrste radikala gdje primjerice $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 mogu prijeći u peroksinitrite i hidroksil radikale te je moguće da su izmjene radikala razlog smanjenja koncentracije u našim rezultatima. Smjernice za buduća istraživanja uključuju dodatna mjerenja više vrsta slobodnih radikala, ROS i RNS i njihovo međusobno koreliranje prije te nakon administracije psihostimulansa.

6. ZAKLJUČAK

Naši rezultati pokazuju da promjene oksidativnog statusa moduliraju neuralnu plastičnost induciranu administracijom psihostimulansa. Iznenadujuće otkriće je sličnost između djelovanja prooksidansa i antioksidansa na sprječavanje lokomotorne senzitivacije, stoga je moguće objašnjenje da posjeduju sličan mehanizam koji uključuje povećanje ekspresije endogene antioksidativne obrane. Alternativno objašnjenje je da su stanice osjetljive na promjenu oksidativnog statusa te da povećanje ili smanjenje dovodi do sličnog bihevioralnog odgovora. To potvrđuju ishodi naših rezultata gdje smo kombinacijom prooksidansa i antioksidansa obnovili lokomotornu senzitivaciju.

Sljedeća istraživanja će se usmjeriti na optimiziranje koncentracija prooksidansa i antioksidansa kako bi se potencijalno ustanovile koncentracije koje neće utjecati na bazalnu lokomotornu aktivnost. S tako optimiziranih koncentracijama se nadamo dobiti bolji uvid u mehanizme djelovanja prooksidansa i antioksidansa na lokomotornu aktivnost. Zbog kratkog poluživota slobodnih radikala, stabilnija mjera posljedica djelovanja slobodnih radikala bi bilo mjeriti produkte oksidativnog oštećenja, primjerice produkte lipidne peroksidacije.

Iz naših mjerenja nije poznato koliko je bihevioralni i biokemijski fenotip posljedica oksidativnih promjena u mozgu u odnosu na cijeli organizam, stoga bi se sljedeća istraživanja trebala bazirati na mjerenju oksidativnih markera na razini mozga i mitohondrija mišice. Jedan od ključnih enzima u DA neurotransmisiji je DAT, za kojeg je literaturno pokazano da se ponaša kao redoks senzor te se njegova funkcija mijenja ovisno o indukciji ili supresiji oksidativnog statusa. Daljnje poboljšanje specifičnosti i anatomske lokalizacije relevantnih biokemijskih promjena biti će moguće korištenjem mišićama koje posjeduju mutaciju u genima koji su ključni za dopaminergičnu neurotransmisiju (TH,DAT,VMAT) te za antioksidativnu obranu (CAT,SOD).

U ovom radu nije identificiran precizan mehanizam kojim prooksidansi ili antioksidansi dovode do sprječavanja lokomotorne senzitivacije, no budući da se naši rezultati djelomično slažu s literaturnim možemo zaključiti da je vinska mušica dobar model za ispitivanje povezanosti oksidativnih i bihevioralnih

promjena koje nastaju kao posljedica administracije psihostimulansa. Smatramo da bi nova saznanja mogla dovesti do identifikacije mehanizama kojim promjene u oksidativnom statusu dovode do promjena u DA neurotransmisiji te da bi pronalaskom optimalnog polifenola (antioksidansa) mogli dobiti potencijalni tretman za smanjenje negativnih efekata psihostimulansa.

7. LITERATURA

1. Nestler EJ. Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci.* 2013.;15(4):431–43.
2. Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2007.;8(11):844–58.
3. Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addict Abingdon Engl.* 2000.;95 Suppl 2:S91-117.
4. Hanna ME, Bednářová A, Rakshit K, Chaudhuri A, O'Donnell JM, Krishnan N. Perturbations in dopamine synthesis lead to discrete physiological effects and impact oxidative stress response in *Drosophila*. *J Insect Physiol.* 2015.;73:11–9.
5. Muñoz P, Oz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. Dopamine Oxidation and Autophagy. *Park Dis.* 2012.;2012:e920953.
6. Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal CCS.* 2013.;11(1):34.
7. Kalivas PW. Cocaine and amphetamine-like psychostimulants: neurocircuitry and glutamate neuroplasticity. *Dialogues Clin Neurosci.* 2007.;9(4):389–97.
8. Womersley JS, Uys JD. S-Glutathionylation and Redox Protein Signaling in Drug Addiction. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016.;137:87–121.
9. Draper I, Kurshan PT, McBride E, Jackson FR, Kopin AS. Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. *Dev Neurobiol.* 2007.;67(3):378–93.
10. Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev.* 2011.;63(2):348–65.
11. Zahniser NR, Sorkin A. Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction? *Neuropharmacology.* 2004.;47 Suppl 1:80–91.
12. Moszczynska A, Callan SP. Molecular, Behavioral and Physiological Consequences Methamphetamine Neurotoxicity: Implications for Treatment. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017.; 362 (3) 474-488
13. dela Peña I, Gevorkiana R, Shi W-X. Psychostimulants affect dopamine transmission through both dopamine transporter-dependent and independent mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2015.;764:562–70.
14. Pandey UB, Nichols CD. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev.* 2011.;63(2):411–36.

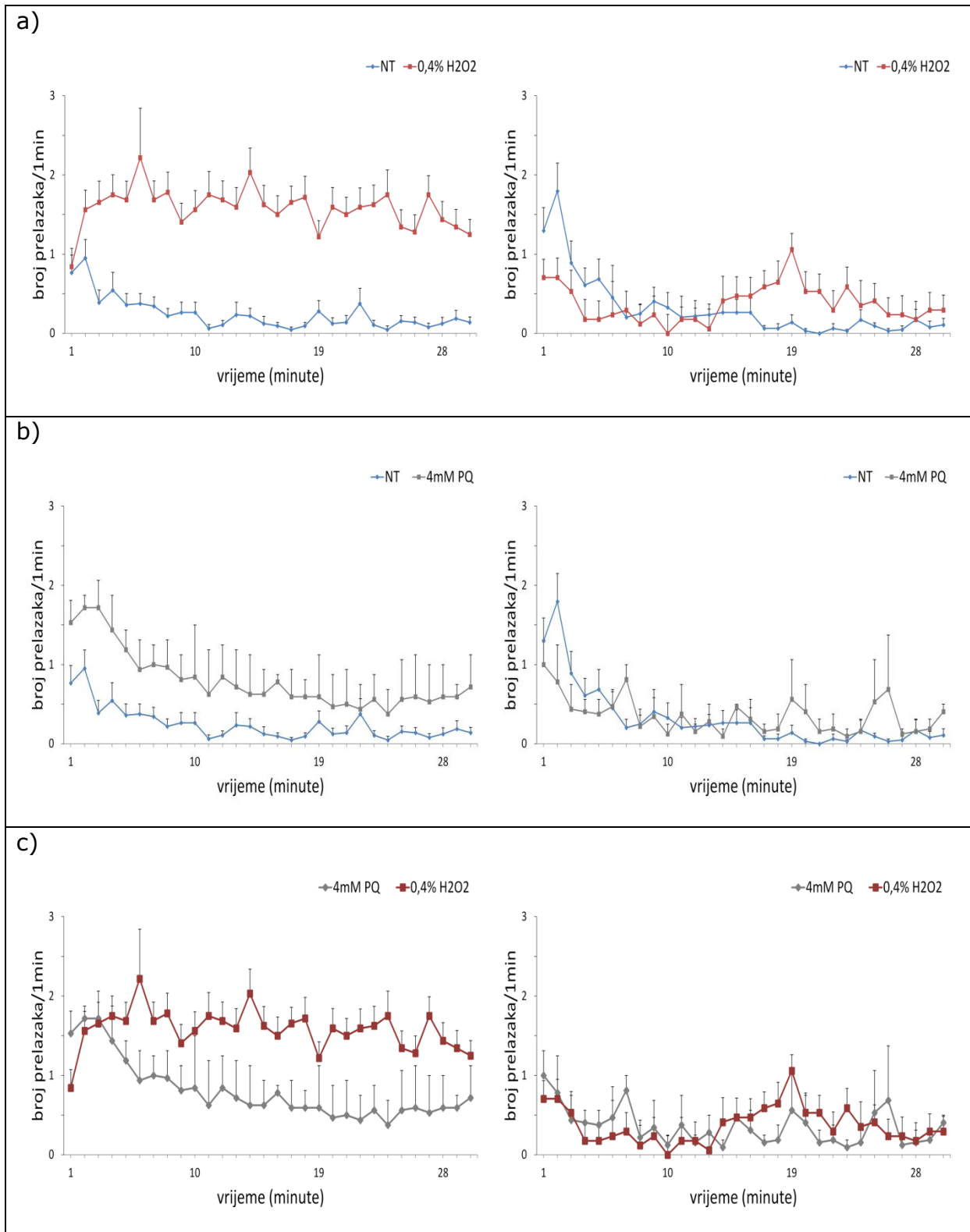
15. Wolf ME. Cocaine addiction: clues from *Drosophila* on drugs. *Curr Biol CB*. 1999.;9(20):R770-772.
16. McClung C, Hirsh J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Curr Biol CB*. 1998.;8(2):109–12.
17. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007.;39(1):44–84.
18. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000.;108(8):652–9.
19. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010.;4(8):118–26.
20. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama*. 2008.;62(3):141–50.
21. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013.;2013:956792.
22. Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2010.;126(2):119–45.
23. Hussain SA, Sulaiman AA, Alhaddad H, Alhadidi Q. Natural polyphenols: Influence on membrane transporters. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016.;5(1):97–104.
24. Sun D, Yue Q, Guo W, Li T, Zhang J, Li G, i ostali. Neuroprotection of resveratrol against neurotoxicity induced by methamphetamine in mouse mesencephalic dopaminergic neurons. *BioFactors Oxf Engl*. 2015.;41(4):252–60.
25. Meireles M, Moura E, Vieira-Coelho MA, Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, i ostali. Flavonoids as dopaminergic neuromodulators. *Mol Nutr Food Res*. 2016.;60(3):495–501.
26. Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, Pellacani C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.; (2016): 2986796
27. Anter J, Tasset I, Demyda-Peyrás S, Ranchal I, Moreno-Millán M, Romero-Jimenez M, i ostali. Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product „alperujo“, hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014.;772:25–33.
28. Rodríguez-Morató J, Boronat A, Kotronoulas A, Pujadas M, Pastor A, Olesti E, i ostali. Metabolic disposition and biological significance of simple phenols

- of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metab Rev.* 2016.;48(2):218–36.
29. Farooqui AA. *Phytochemicals, Signal Transduction, and Neurological Disorders.* Springer Science & Business Media; 2012. Str.371
 30. Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001.;36(1):1–22.
 31. Chen H, Wu J, Zhang J, Fujita Y, Ishima T, Iyo M, i ostali. Protective effects of the antioxidant sulforaphane on behavioral changes and neurotoxicity in mice after the administration of methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl).* 2012.;222(1):37–45.
 32. Dietrich J-B, Mangeol A, Revel M-O, Burgun C, Aunis D, Zwiller J. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology.* 2005.;48(7):965–74.
 33. Kovacic P. Role of oxidative metabolites of cocaine in toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. *Med Hypotheses.* 2005.;64(2):350–6.
 34. Kita T, Miyazaki I, Asanuma M, Takeshima M, Wagner GC. Dopamine-induced behavioral changes and oxidative stress in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Int Rev Neurobiol.* 2009.;88:43–64.
 35. Shin E-J, Dang D-K, Tran T-V, Tran H-Q, Jeong JH, Nah S-Y, i ostali. Current understanding of methamphetamine-associated dopaminergic neurodegeneration and psychotoxic behaviors. *Arch Pharm Res.* 2017.;40(4):403–28.
 36. Jang EY, Ryu Y-H, Lee BH, Chang S-C, Yeo MJ, Kim SH, i ostali. Involvement of reactive oxygen species in cocaine-taking behaviors in rats. *Addict Biol.* 2015.;20(4):663–75.
 37. Jang EY, Yang CH, Hedges DM, Kim SP, Lee JY, Ekins TG, i ostali. The role of reactive oxygen species in methamphetamine self-administration and dopamine release in the nucleus accumbens. *Addict Biol.* 2016.; doi: 10.1111/adb.12419
 38. Fukami G, Hashimoto K, Koike K, Okamura N, Shimizu E, Iyo M. Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 2004.;1016(1):90–5.
 39. Numa R, Kohen R, Poltyrev T, Yaka R. Tempol diminishes cocaine-induced oxidative damage and attenuates the development and expression of behavioral sensitization. *Neuroscience.* 2008.;155(3):649–58.
 40. Shepherd KR, Lee E-SY, Schmued L, Jiao Y, Ali SF, Oriaku ET, i ostali. The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)

on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006.;83(3):349–59.

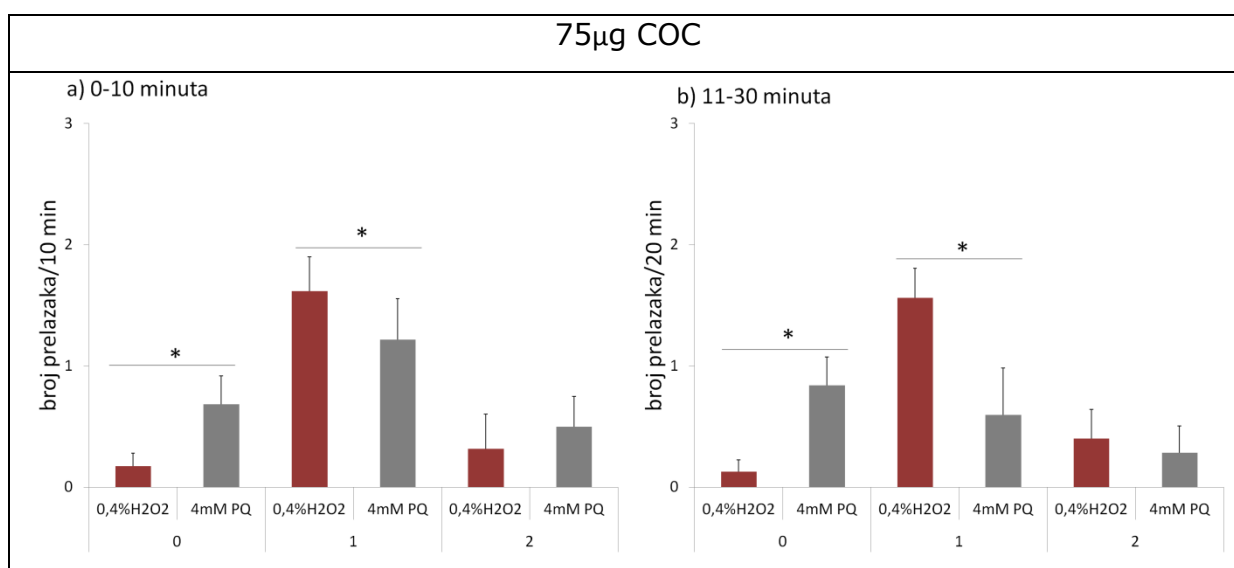
41. Grover D, Ford D, Brown C, Hoe N, Erdem A, Tavaré S, i ostali. Hydrogen Peroxide Stimulates Activity and Alters Behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE.* 2009.;4(10):e7580.
42. Huang C-L, Huang N-K, Shyue S-K, Chern Y. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. *J Neurochem.* 2003.;86(5):1247–59.
43. Fahim MA, Shehab S, Nemmar A, Adem A, Dhanasekaran S, Hasan MY. Daily subacute paraquat exposure decreases muscle function and substantia nigra dopamine level. *Physiol Res.* 2013.;62(3):313–21.
44. Jimenez-Del-Rio M, Guzman-Martinez C, Velez-Pardo C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. *Neurochem Res.* 2010.;35(2):227–38.
45. Chaudhuri A, Bowling K, Funderburk C, Lawal H, Inamdar A, Wang Z, i ostali. Interaction of Genetic and Environmental Factors in a *Drosophila* Parkinsonism Model. *J Neurosci.* 2007.;27(10):2457–67.
46. Shiba T, Yamato M, Kudo W, Watanabe T, Utsumi H, Yamada K. In vivo imaging of mitochondrial function in methamphetamine-treated rats. *NeuroImage.* 2011.;57(3):866–72.
47. Miyazaki I, Asanuma M. Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity. *Neurochem Res.* 2009.;34(4):698–706.

8. DODATNI MATERIJALI

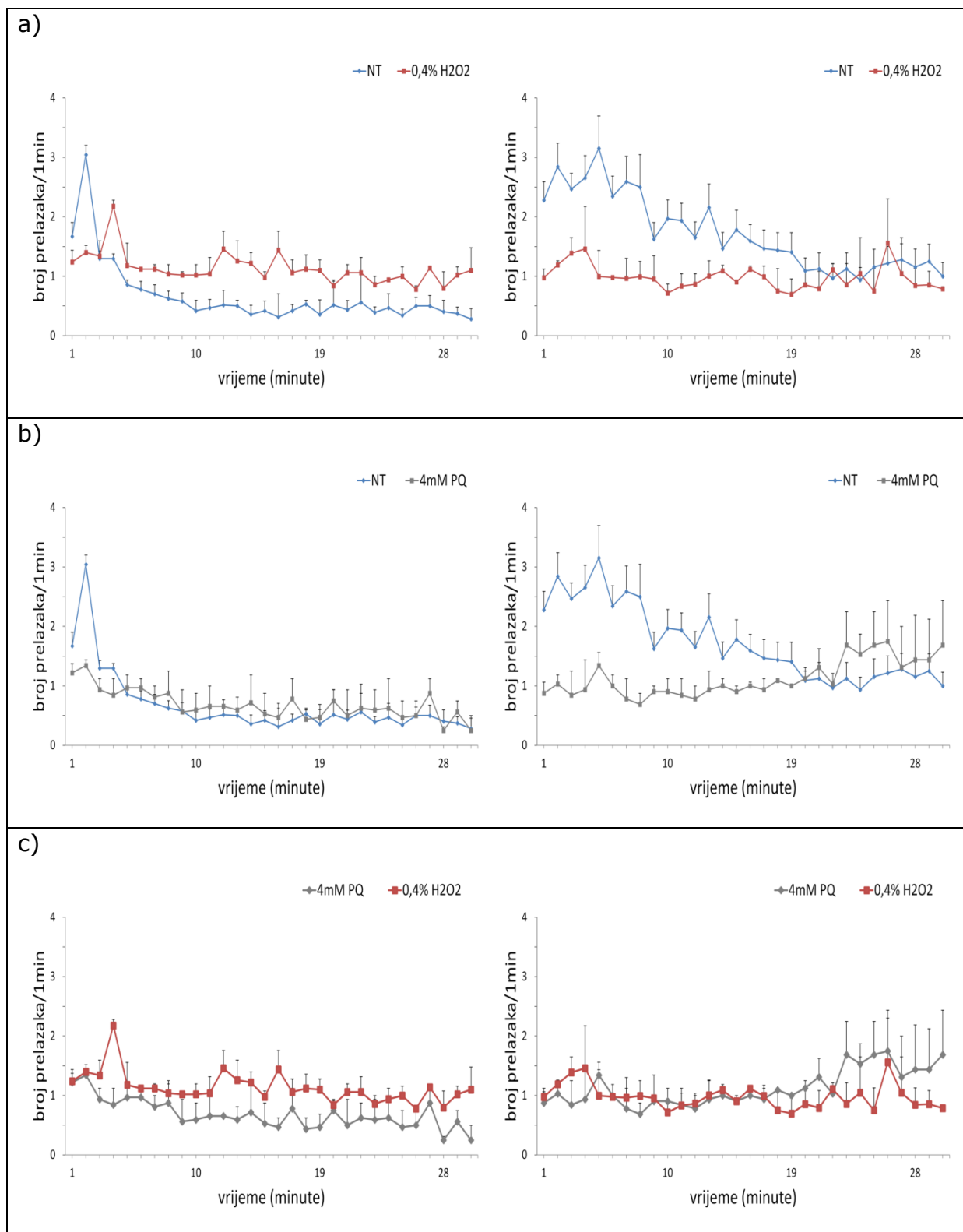


Slika 1. Utjecaj vodikovog peroksida (H₂O₂) i parakvata (PQ) na lokomotornu aktivnost mušica tijekom 30 minuta nakon prve i druge administracije volatiliziranog COC DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon

prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog COC kod netretiranih NT (n=64) i tretiranih mužjaka s 0,4% H₂O₂ (n=64) i 4mM PQ (n=32). Prosječni lokomotorni odgovor mušica je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u pojedinoj minuti za populaciju mušica tijekom 30 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška za usporedbu između NT i tretiranih s H₂O₂ (a), NT i tretiranih s PQ (b) i usporedbu tretiranih s H₂O₂ i PQ (c); prva administracija – lijevi stupac, druga administracija – desni stupac

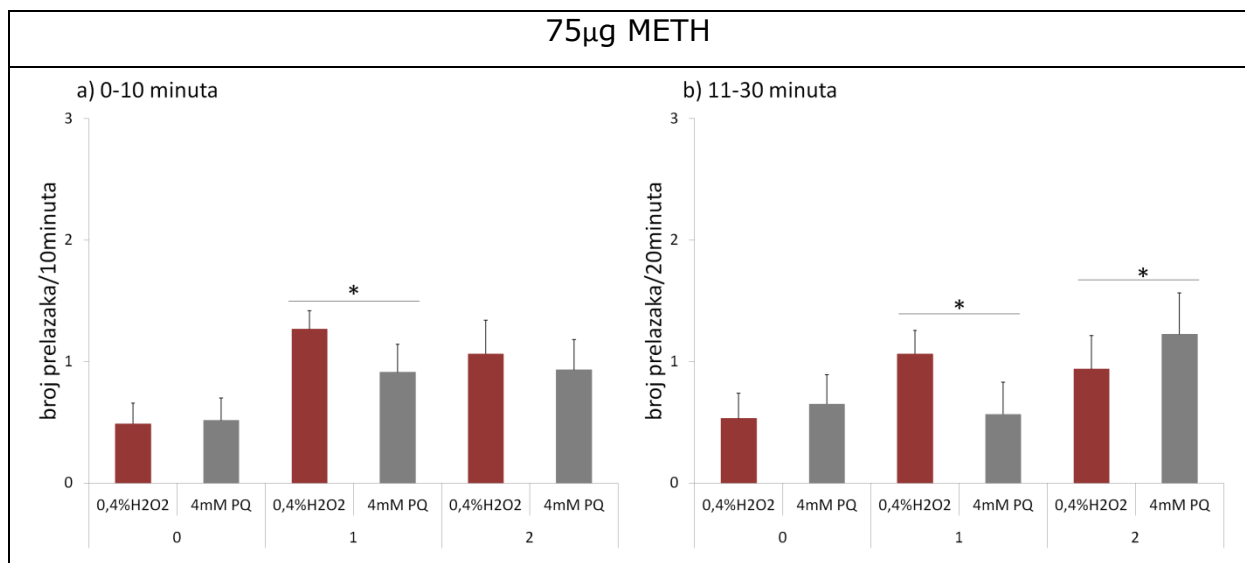


Slika 2. Usporedba djelovanja vodikovog peroksida (H₂O₂) i parakvata (PQ) na bazičnu lokomotornu aktivnost (0) i lokomotornu aktivnost induciranu prvom (1) i drugom (2) administracijom volatiliziranog COC DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog COC kod tretiranih mužjaka s 0,4% H₂O₂ (n=64) i 4mM PQ (n=32). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test između skupina za nezavisne uzorke)



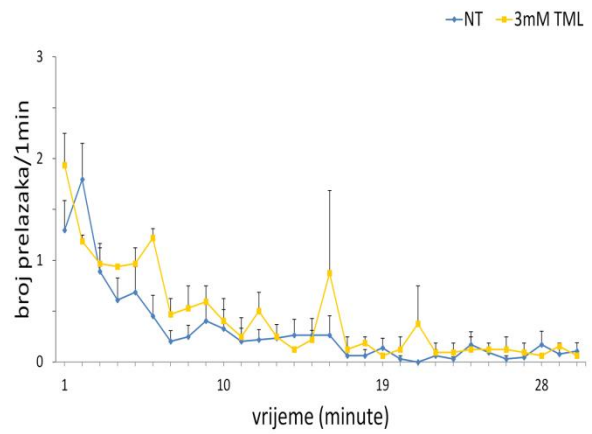
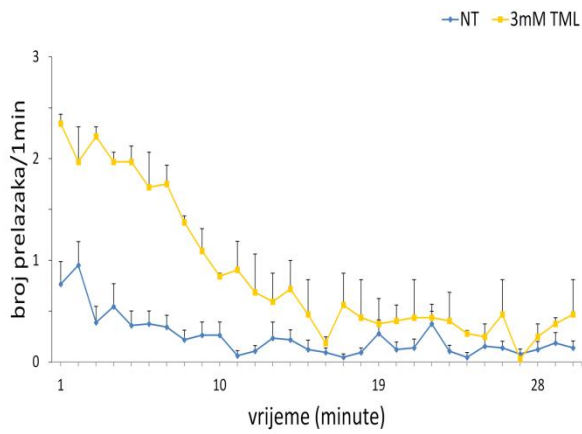
Slika 3. Utjecaj vodikovog peroksida (H₂O₂) i parakvata (PQ) na lokomotornu aktivnost mušica tijekom 30 minuta nakon prve i druge administracije volatiliziranog METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75µg volatiliziranog METH kod netretiranih NT (n=64) i tretiranih mužjaka s 0,4% H₂O₂ (n=64) i 4mM PQ (n=32). Prosječni lokomotorni odgovor mušica je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u pojedinoj minuti za

populaciju mušica tijekom 30 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina±standardna pogreška za usporedbu između NT i tretiranih s H₂O₂ (a), NT i tretiranih s PQ (b) i usporedbu tretiranih s H₂O₂ i PQ (c); prva administracija – lijevi stupac, druga administracija – desni stupac

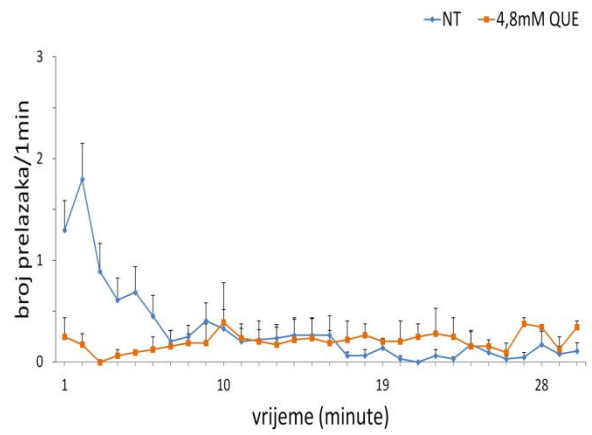
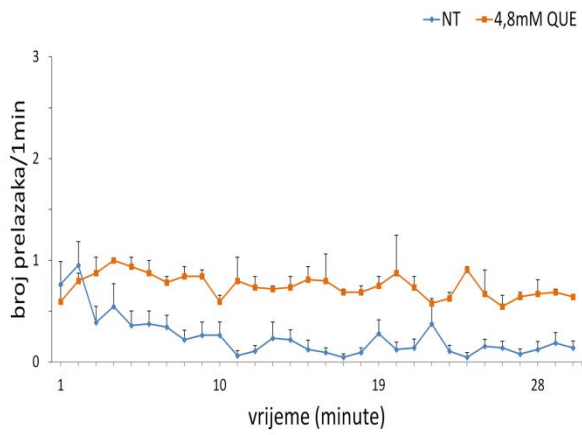


Slika 4. Usporedba djelovanja vodikovog peroksida (H₂O₂) i parakvata (PQ) na bazičnu lokomotornu aktivnost (0) i lokomotornu aktivnost induciranu prvom (1) i drugom (2) administracijom volatiliziranog METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75µg volatiliziranog METH kod mužjaka tretiranih s 0,4% H₂O₂ (n=64) i 4mM PQ (n=32). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina± standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test između skupina za nezavisne uzorke)

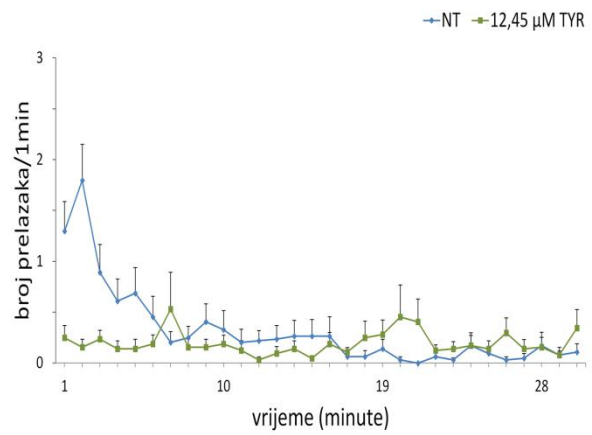
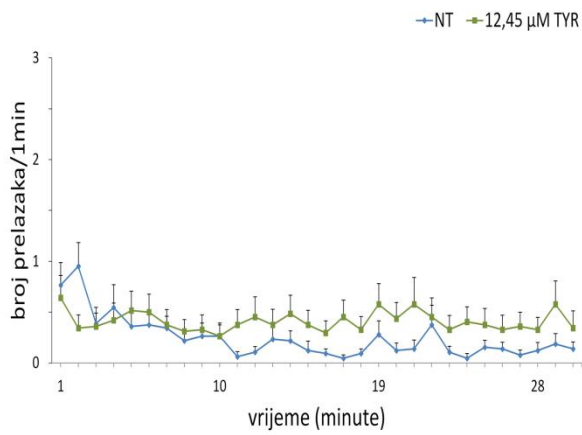
a)

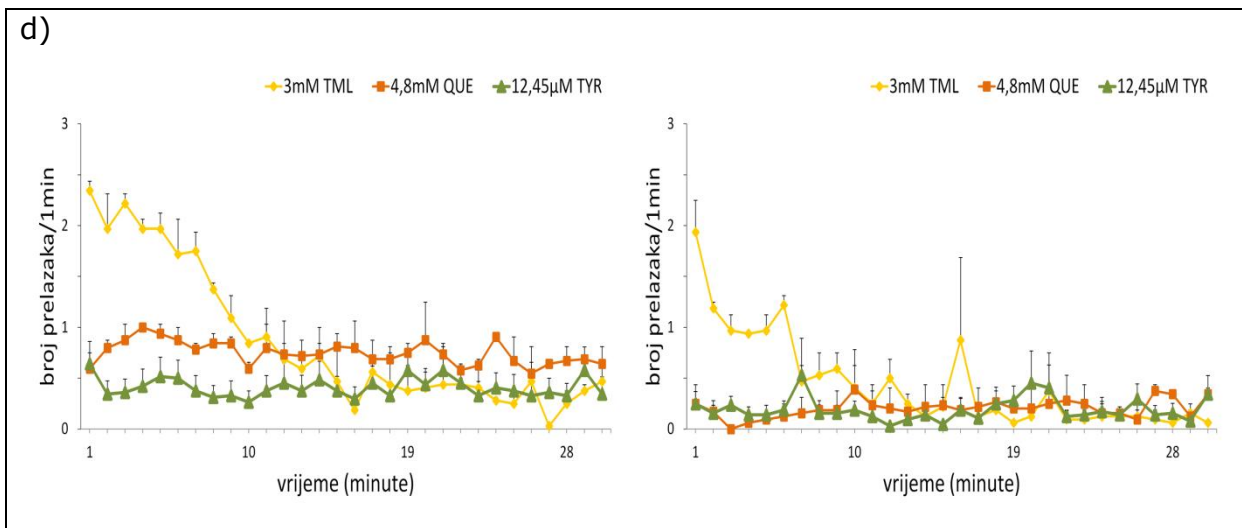


b)

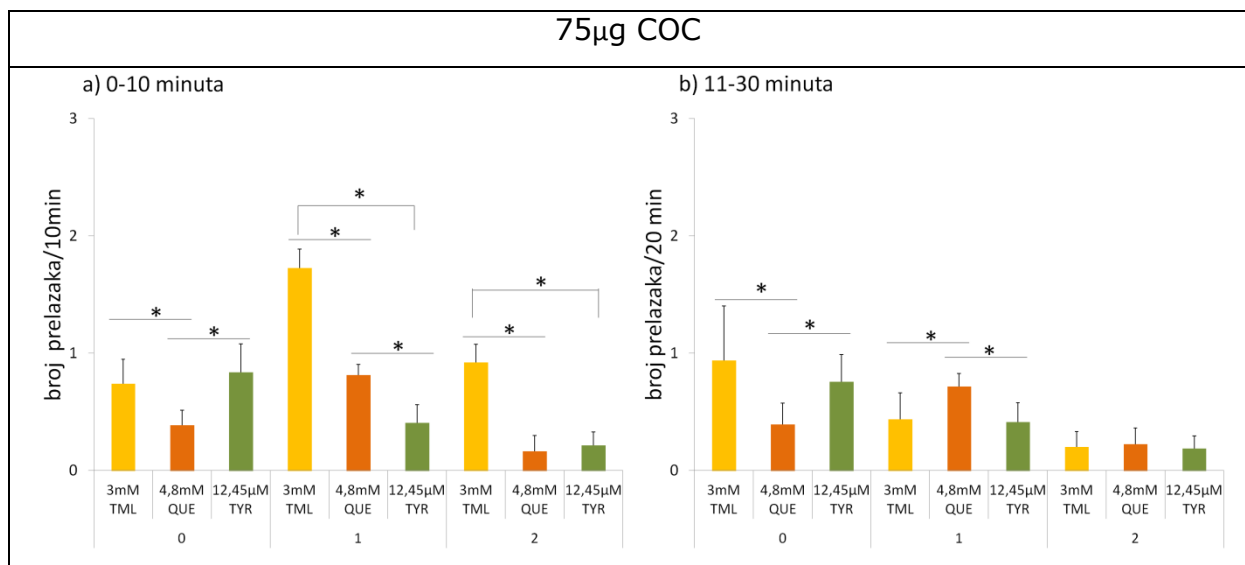


c)



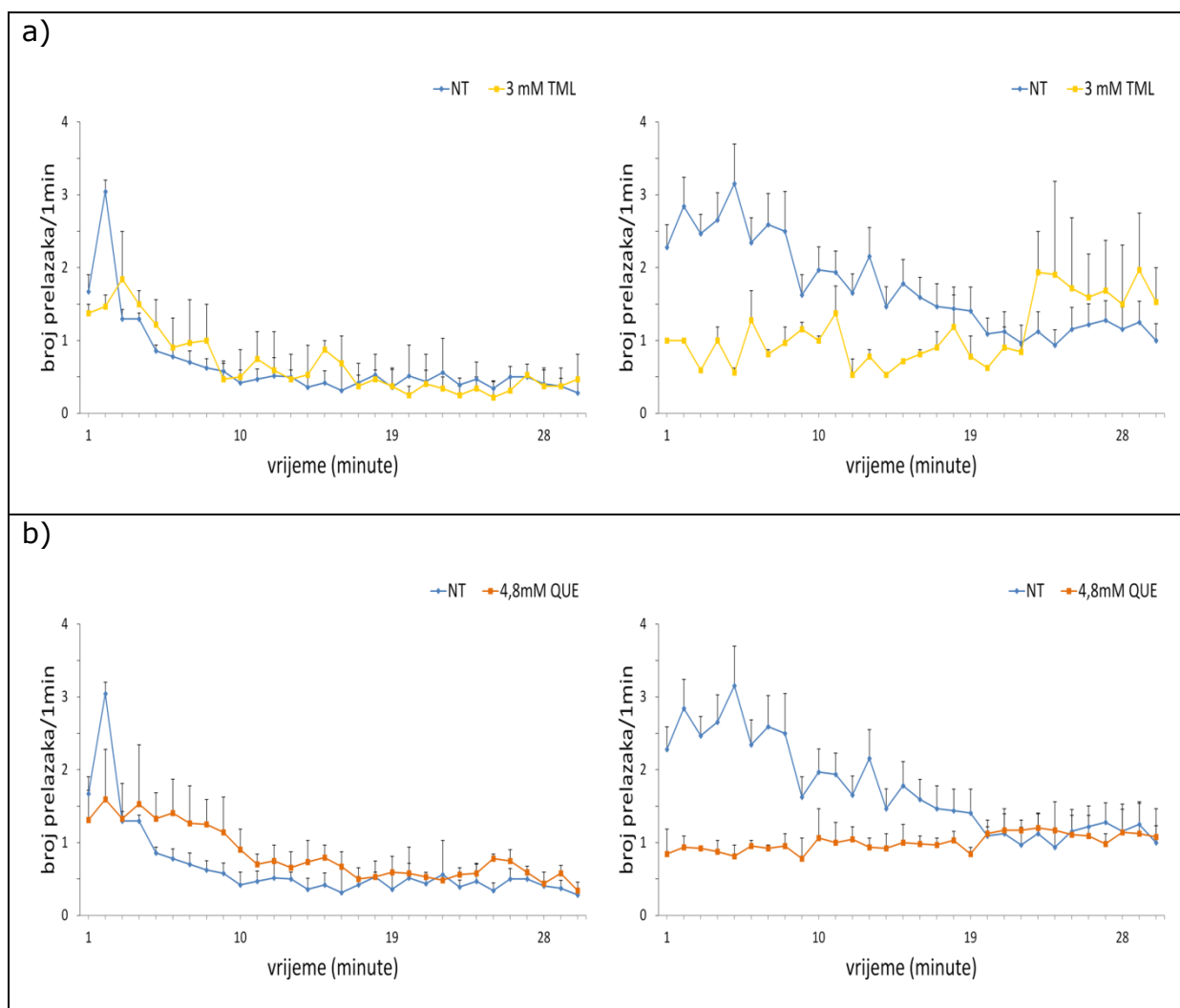


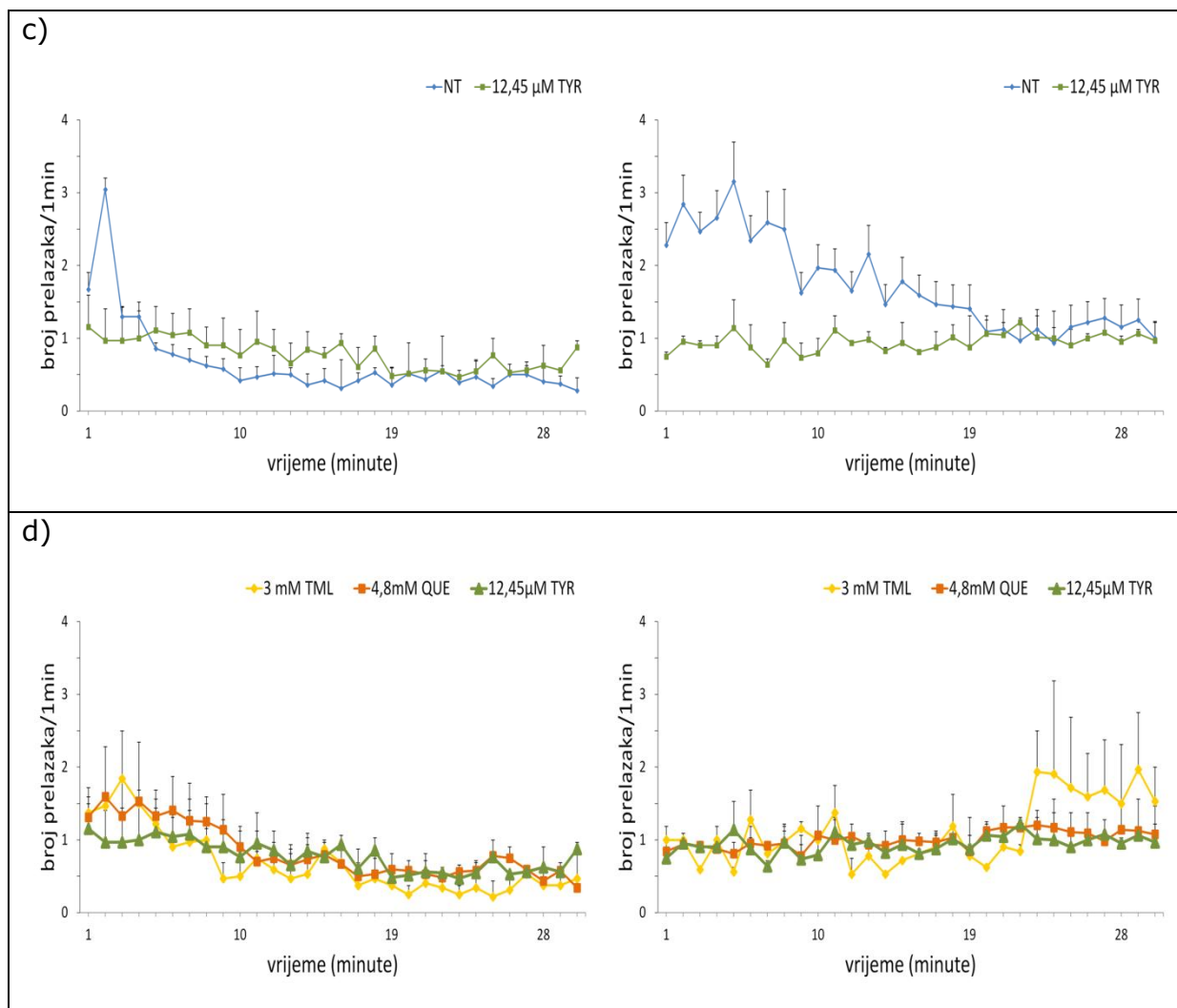
Slika 5. Utjecaj tempola (TML), kvercetina (QUE) i tirosola (TYR) na lokomotornu aktivnost mušica tijekom 30 minuta nakon prve i druge administracije volatiliziranog COC DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75µg volatiliziranog COC kod netretiranih NT (n=64) i tretiranih mužjaka s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45µM TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor mušica je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u pojedinoj minuti za populaciju mušica tijekom 30 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina±standardna pogreška za usporedbu između NT i tretiranih s TML (a), NT i tretiranih s QUE (b), NT i tretiranih s TYR (c) i usporedbu tretiranih s TML, QUE i TYR (d); prva administracija – lijevi stupac, druga administracija – desni stupac



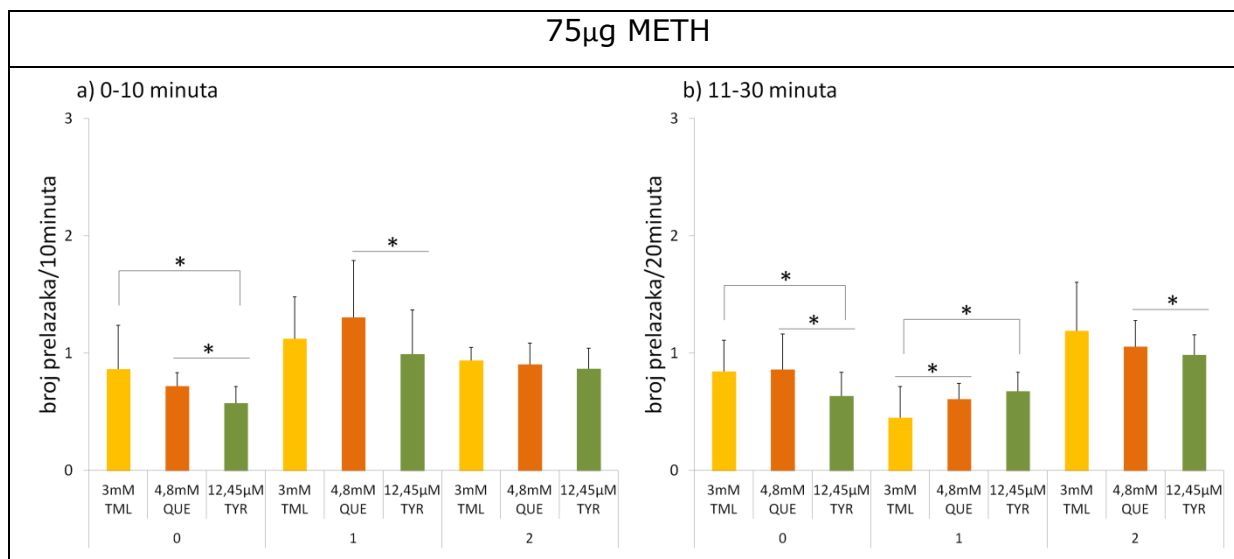
Slika 6. Usporedba djelovanja tempola (TML), kvercetina (QUE) i tirosola (TYR) na bazičnu lokomotornu aktivnost (0) i lokomotornu aktivnost induciranu prvom (1) i drugom (2) administracijom volatiliziranog COC DAMS sustavom se mjerila

lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog COC kod mužjaka tretiranih s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test između skupina za nezavisne uzorke)

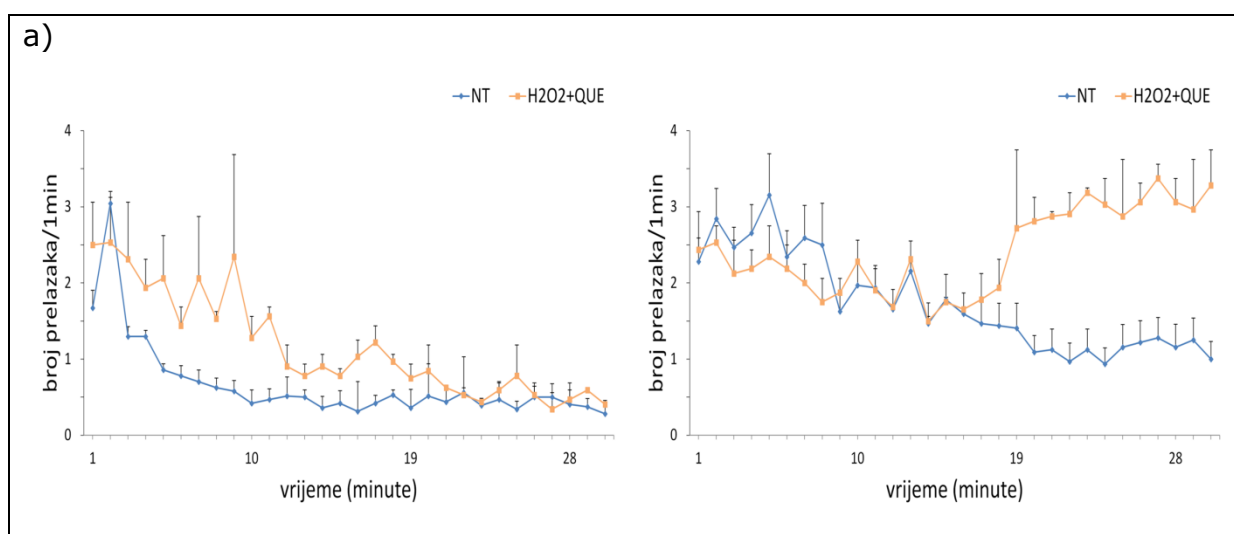


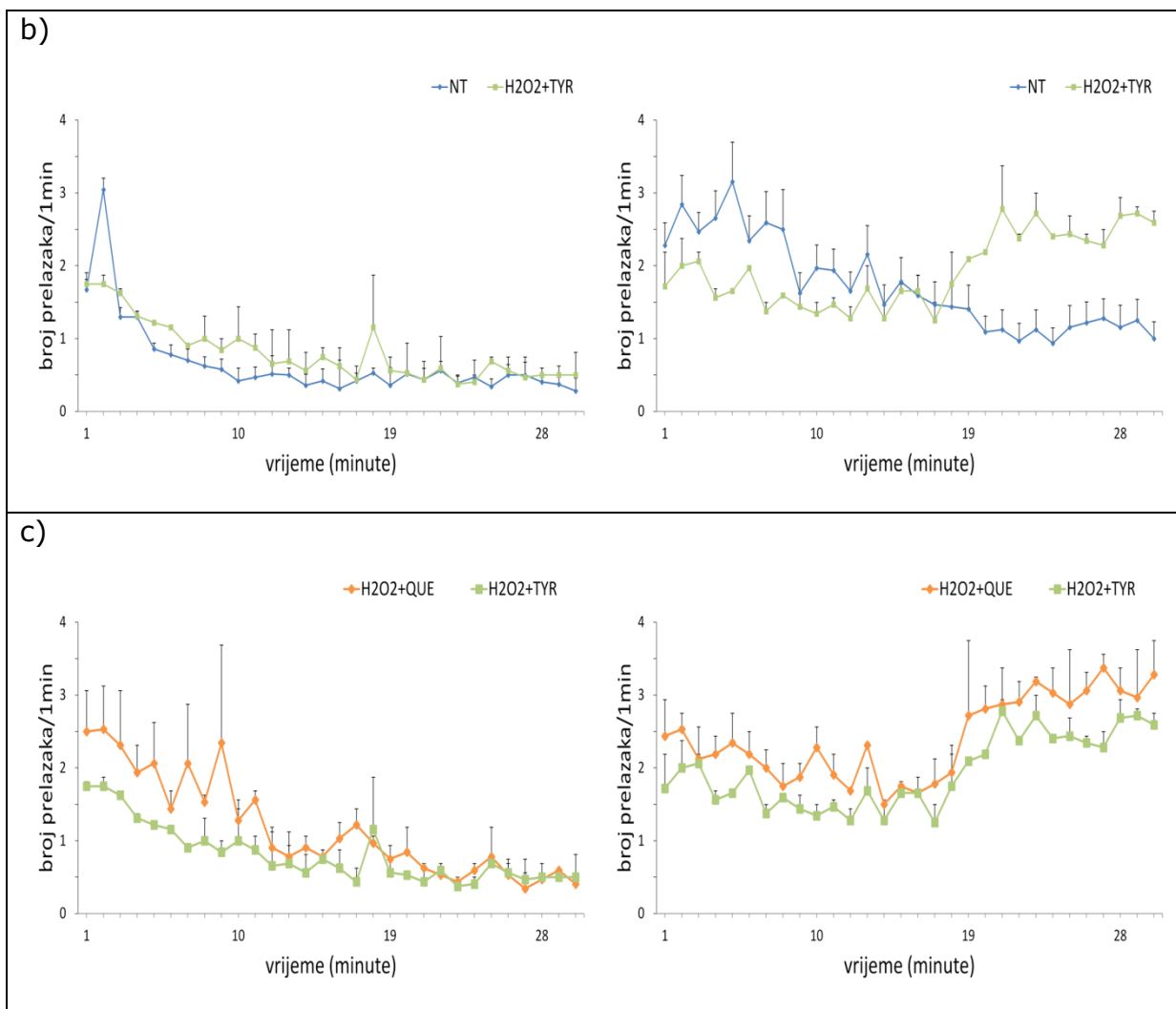


Slika 7. Utjecaj tempola (TML), kvercetina (QUE) i tirosola (TYR) na lokomotornu aktivnost mušica tijekom 30 minuta nakon prve i druge administracije volatiliziranog METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog METH kod netretiranih NT (n=64) i tretiranih mužjaka s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor mušica je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u pojedinoj minuti za populaciju mušica tijekom 30 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška za usporedbu između NT i tretiranih s TML (a), NT i tretiranih s QUE (b), NT i tretiranih s TYR (c) i usporedbu tretiranih s TML, QUE i TYR (d); prva administracija – lijevi stupac, druga administracija – desni stupac

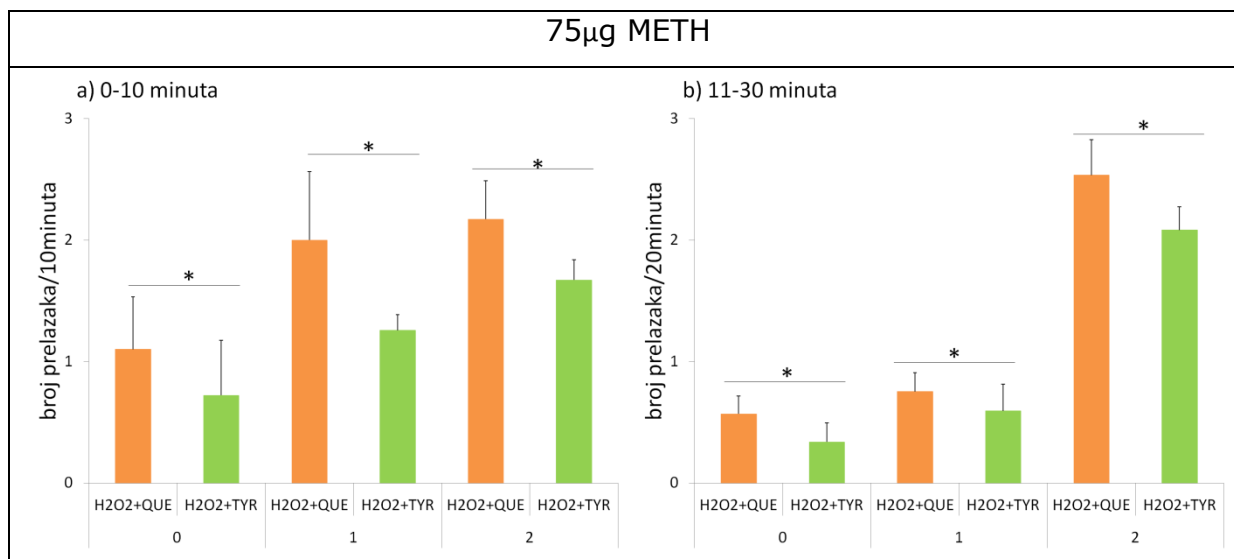


Slika 8. Usporedba djelovanja tempola (TML), kvercetina (QUE) i tirosola (TYR) na bazičnu lokomotornu aktivnost (0) i lokomotornu aktivnost induciranu prvom (1) i drugom (2) administracijom volatiliziranog METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog METH kod mužjaka tretiranih s 3mM TML (n=32), 4,8mM QUE (n=64) i 12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test između skupina za nezavisne uzorke)





Slika 9. Utjecaj kombiniranog tretmana s vodikovim peroksidom i kvercetinom (H_2O_2+QUE) ili tirosolom (H_2O_2+TYR) na lokomotornu aktivnost mušica tijekom 30 minuta nakon prve i druge administracije volatiliziranog METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog METH kod netretiranih NT (n=64) i tretiranih mužjaka s 0,4% $H_2O_2+4,8$ mM QUE (n=64) i 0,4% $H_2O_2+12,45\mu$ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor mušica je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u pojedinoj minuti za populaciju mušica tijekom 30 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška za usporedbu između NT i tretiranih s H_2O_2+QUE (a), NT i tretiranih s H_2O_2+TYR (b) i usporedbu tretiranih s H_2O_2+QUE i H_2O_2+TYR (c); prva administracija – lijevi stupac, druga administracija – desni stupac



Slika 10. Usporedba djelovanja kombiniranog tretmana s vodikovim peroksidom i kvercetinom (H₂O₂+QUE) ili tirosolom (H₂O₂+TYR) na bazičnu lokomotornu aktivnost (0) i lokomotornu aktivnost induciranu prvom (1) i drugom (2) administracijom volatiliziranog METH DAMS sustavom se mjerila lokomotorna aktivnost mušica nakon prve i druge administracije 75 μ g volatiliziranog METH kod mužjaka tretiranih s 0,4%H₂O₂+4,8mM QUE(n=64) i 0,4%H₂O₂+12,45 μ M TYR (n=64). Prosječni lokomotorni odgovor pojedine mušice po minuti je izražen kao broj prelazaka sredine DAMS štapića u periodu od prvih 10 i drugih 20 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina \pm standardna pogreška. 0-10 (a) ili 11-30 minuta (b) prije administracije (0), nakon prve administracije (1) ili nakon druge administracije (2); *p<0,05 (t-test između skupina za nezavisne uzorke)

Diplomski rad je financiran iz Istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ - Definiranje uloge cirkadijurnih gena kod bihevioralne senzitivacije na psihostimulaciju kod *Drosophila melanogaster* (HRZZ-IP-2013-11-4920).

Korištena je oprema projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR).

9. ŽIVOTOPIS

OSOBN INFORMACIJE

Josipa Kolobarić

📍 Pletenci 4/2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

☎ (+385) 958783204

✉ jkolobar@gmail.com

OBRAZOVANJE

- | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2015–danas | Diplomski sveučilišni studij "Istraživanje i razvoj lijekova"
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
www.biotech.uniri.hr |
| 2012–2015 | Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
www.biotech.uniri.hr |
| 2008–2012 | Tehničar nutricionist
Medicinska škola u Rijeci (Hrvatska) |

RADNO ISKUSTVO

- | | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12/2017–07/2017 | Izrada diplomskog rada

Laboratorij za bihevioralnu genetiku, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
Tema: Utjecaj oksidativnog statusa na razvoj lokomotorne senzitivacije u <i>Drosophila melanogaster</i>
Mentor: dr.sc.Rozi Andrečić Waldowski |
| 06/2015–06/2015 | Stručna praksa
Jadran galenski laboratorij JGL d.d.
Pulac 4A, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Djelatnost ili sektor Istraživanje i razvoj lijekova |

OSOBN VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

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

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

- Komunikacijske vještine
- Komunikativna i spremna na timski rad
 - Sposobna sam brzo se prilagoditi u novo okruženje te samostalno i odgovorno pristupiti rješavanju problema
 - Studentski posao promotora kozmetike u ljekarnama mi je omogućio upoznavanje s osnovnim prodajnim vještinama te iskustvo u komunikaciji s kupcima

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](#)

Vozačka dozvola

B

DODATNE INFORMACIJE

Projekti

- 1) Suradnica na projektu: Definiranje uloge cirkadijurnih gena kod bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse kod *Drosophila melanogaster*
 Financijska potpora: Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ br.4920)
- 2) Suradnica na projektu: FlyHigh - utjecaj oksidativnog stresa
 Financijska potpora: Studentski zbor Sveučilišta u Rijeci - SZSUR

Kongresi

- Aktivni sudionik na poster sekciji 7. Studentskog kongresa neuroznanosti NeuRI - Rijeka/Rab (Hrvatska) 2017.
 Ime postera: Role of oxidative stress in behavioral sensitization to psychostimulants in *Drosophila*

Autori: Sabina Al-samarai, Josipa Kolobarić, Ana Filošević, Rozi Andrečić Waldowski

- Aktivni sudionik na poster sekciji 6. hrvatskog kongresa neuroznanosti - Osijek (Hrvatska) 2017.

Ime sažetka: Interaction between redox status and psychostimulants-induced neuronal plasticity in *Drosophila*

Autori: Ana Filošević, Josipa Kolobarić, Sabina Al-samarai, Rozi Andrečić Waldowski

Kongresi bez prisustvovanja:

- 19th Annual Genes, Brain and Behavior Meeting of IBANGS - Madrid (Španjolska) 2017.

Ime sažetka: Measuring short- and long-term sensitization and habituation in *Drosophila*

Autori: Ana Filošević, Josipa Kolobarić, Sabina Al-samarai, Rozi Andrečić Waldowski

Advances in Biomedical Research, MedILS – Split (Hrvatska) 2017.

Ime sažetka: Circadian genes and redox regulate neuroplasticity to psychostimulants in *Drosophila*

Autori: Ana Filošević, Josipa Kolobarić, Sabina Al-samarai, Rozi Andrečić Waldowski

Prezentacije

- Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju 2017.

kratko znanstveno izlaganje : Uvod u oksidativni stres i mjerenje respiracije kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*)

Priznanja i stipendije

Završen preddiplomski studij s pohvalom CUM LAUDE

Višegodišnja korisnica Državne stipendije

Erasmus stipendija za stručnu praksu 2017./2018.