

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

Sabina Al-samarai

**Razlike u razvoju bihevioralne senzitivacije na kokain u odnosu
na metamfetamin kod *Drosophila melanogaster***

Diplomski rad

Rijeka, 2017. godina

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

Sabina Al-samarai

**Razlike u razvoju bihevioralne senzitivacije na kokain u odnosu
na metamfetamin kod *Drosophila melanogaster***

Diplomski rad

Rijeka, 2017. godina

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

Diplomski rad obranjen je dana _____,
pred povjerenstvom:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 71 stranicu, 42 slike, 1 tablicu i 55 literaturnih navoda.

Sažetak

Psihomotorički stimulansi, poput kokaina i metamfetamina utječu na neuronsku mrežu mijenjajući dopaminergičnu i serotonergičnu transmisiju uzrokujući neuroadaptivne promjene moždanih funkcija koje rezultiraju promijenjenim motoričkim sposobnostima. Istraživanja na vinskoj mušici - *Drosophila melanogaster* pokazuju da opetovana administracija volatiliziranog kokaina izaziva progresivno povećanje lokomotornog odgovora definirano kao lokomotorna senzitivacija. Ponovljenom administracijom, kokain aktivira dopaminsku transmisiju, no posljedice akutne ili ponovljenih administracija volatiliziranog metamfetamina kod *Drosophila* još nije poznat. Iako postoji nekoliko metoda za mjerenje lokomotorne senzitivacije u *Drosophila*, niti jedna nije u potpunosti zadovoljila sve uvjete za kvantitativno, reproducibilno, objektivno i visokoprotočno mjerenje.

U ovom diplomskom radu razvili smo i validirali novu visokoprotočnu platformu koja će objektivno i reproducibilno inducirati i na individualnoj razini kvantificirati lokomotornu senzitivaciju *Drosophila melanogaster* na kokain i metamfetamin. Definirali smo razlike u mehanizmu djelovanja kokaina i metamfetamina te ulogu cirkadijalnih gena i gena dopaminskog sustava u regulaciji razvoja lokomotorne senzitivacije u odgovoru na te psihostimulanse. Naši rezultati potvrđuju kako važnu ulogu u regulaciji lokomotorne senzitivacije na kokain imaju *Clock*, *period* i *cycle* geni, te potencijalno VMAT u dopaminskim i *Clock* pozitivnim neuronima. Lokomotorna senzitivacija na metamfetamin ovisi o različitim genima od senzitivacije na kokain - *Clk^{irk}* te potencijalno D1 receptoru i VMAT u dopaminskim neuronima. Dakle, regulacija senzitivacije na kokain i metamfetamin se razlikuje u genetskim mehanizmima. Utvrdili smo da su za razvoj senzitivacije na oba psihostimulansa važni dopaminski transporter - DAT te VMAT u *period* pozitivnim neuronima. *Drosophila melanogaster* kao modelni organizam u ispitivanju razvoja lokomotorne senzitivacije doprinijet će genetskom probiru i identifikaciji potencijalno ključnih gena koji sudjeluju u regulaciji razvoja bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse što će u budućnosti pomoći razumijevanju molekularnih mehanizama u podlozi razvoja ovisnosti.

Ključne riječi: psihostimulansi, lokomotorna senzitivacija, *Drosophila melanogaster*, ponovljena administracija

Summary

Title: The differences in the development of behavioral sensitization to cocaine compared to methamphetamine in *Drosophila melanogaster*

Psychomotor stimulants, such as cocaine and methamphetamine, affect the neuronal network by altering dopaminergic and serotonergic transmission causing neuroadaptive brain function changes resulting in oscillations in motor abilities. Recent research work on *Drosophila melanogaster* shows that repeated administration of stimulants causes a progressive increase in locomotor response defined as locomotor sensitization. With repetitive administration, cocaine activates dopamine transmission causing locomotor sensitization but the mechanism underlying development of methamphetamine-induced sensitization in *Drosophila* is yet to be known. Although there are many methods for measuring locomotor sensitization, none has utterly fulfilled all the conditions for quantitative, reproducible, objective and high-throughput measurements.

In this thesis we have developed and validated a new high-throughput platform that will objectively and reproducibly induce and individually quantify the locomotor sensitization of *Drosophila melanogaster* to cocaine and methamphetamine. We defined the differences in the mechanism of cocaine and methamphetamine action and the role of the circadian genes and the dopaminergic system genes in regulating the development of locomotor sensitization in response to these psychostimulants. Our results confirm that an important role in regulating locomotor sensitization on cocaine have *Clock*, *period* and *cycle* genes, potentially VMAT in dopaminergic and *Clock* positive neurons. Locomotor sensitization to methamphetamine depends on genes that differ from sensitization to cocaine – *Clock*, potentially D1 receptor and VMAT in dopaminergic neurons. Thus, regulation of sensitization to cocaine and methamphetamine differs in genetic mechanisms. We have found that dopamine transporter DAT and VMAT in *per* positive neurons are important for the development of sensitization to both psychostimulants. *Drosophila melanogaster* as a model organism in the research of locomotor sensitization development will contribute to the genetic screening and identification of potentially critical genes involved in the regulation of behavioral sensitization on psychostimulants, which

in the future will help to understand the molecular mechanisms underlying addiction.

Keywords: psychostimulants, locomotor sensitization, *Drosophila melanogaster*, repeated administration

Sadržaj:

1.	UVOD	1
1.1.	Što je ovisnost?.....	1
1.2.	Uloga dopamina i dopaminergična neurotransmisija	2
1.2.1.	Utjecaj kokaina (COC) i metamfetamina (METH) na dopaminergičnu transmisiju	4
1.3.	Uloga cirkadijalnih gena u ovisnosti	7
1.4.	Bihevioralna senzitivizacija	9
1.4.1.	Načini administracije psihostimulansa i dosadašnje metode mjerenja bihevioralnog fenotipa	11
1.4.2.	Bihevioralni fenotip glodavaca na kokainu i metamfetaminu	13
1.4.3.	Bihevioralni fenotip <i>Drosophila</i> na kokainu i metamfetaminu.....	14
2.	CILJ RADA	17
3.	MATERIJALI I METODE	18
3.1.	Soj i uzgoj <i>Drosophila melanogaster</i>	18
3.2.	Platforma za administraciju volatiliziranog kokaina i metamfetamina	19
3.3.	Optimizacija platforme za administraciju psihostimulansa	21
3.3.1.	Optimizacija vremena izlaganja mušica struji vrućeg zraka.....	21
3.3.2.	Analiza distribucije psihostimulansa u DAMS cjevčicama	21
3.3.3.	Optimizacija koncentracije kokaina i metamfetamina.....	22
3.4.	Bihevioralni testovi.....	22
3.4.1.	Optimizacija vremenskog intervala između dvije administracije psihostimulansa.....	22
3.4.2.	Lokomotorna senzitivizacija cirkadijalnih mutanata	22
3.4.3.	Lokomotorna senzitivizacija mutanata u dopaminskom transporteru (<i>fmn</i>), receptoru tipa 1 (<i>dumb</i>) i vezikularnom monoaminskom transporteru (VMAT).....	23
3.5.	Statistička obrada rezultata	23
4.	REZULTATI	25
4.1.	Optimizacija metode za induciranje i kvantifikaciju lokomotorne senzitivizacije	25
4.1.1.	Optimizacija vremena izlaganja <i>wt</i> mužjaka <i>Drosophila</i> vrućem zraku	25
4.1.2.	Analiza distribucije droge u pojedinoj cjevčici	27

4.2. Akutni odgovor na volatilizirani kokain i metamfetamin	28
4.2.1. Akutni odgovor na 75 µg volatiliziranog kokaina	28
4.2.2. Akutni odgovor na 75 µg volatiliziranog metamfetamina	29
4.2.3. Dozna ovisnost volatiliziranog kokaina na lokomotorni odgovor.....	30
4.2.4. Dozna ovisnost volatiliziranog metamfetamina na lokomotorni odgovor	31
4.3. Optimizacija uvjeta za postizanje lokomotorne senzitivacije	32
4.3.1. Optimizacija vremenskog intervala između dvije administracije 75 µg volatiliziranog kokaina.....	32
4.3.2. Optimizacija vremenskog intervala između dvije administracije 75 µg volatiliziranog metamfetamina.....	34
4.4. Genetski utjecaj na lokomotornu senzitivaciju na kokain i metamfetamin	36
4.4.1. Lokomotorna senzitivacija cirkadijalnih mutanata na 75 µg kokaina	36
4.4.2. Lokomotorna senzitivacija cirkadijalnih mutanata na 75 µg metamfetamina	38
4.4.3. Lokomotorna senzitivacija mutanata dopaminske transmisije na 75 µg kokaina	41
4.4.4. Lokomotorna senzitivacija mutanata dopaminske transmisije na 75 µg metamfetamina	43
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČAK	53
7. LITERATURA.....	55
8. DODATNI MATERIJALI	60
9. ŽIVOTOPIS	69

1. UVOD

1.1. Što je ovisnost?

Ovisnost podrazumijeva psihopatološki obrazac ponašanja koji uključuje kompulzivno traženje (eng. *drug-seeking*) i uporabu psihostimulansa (eng. *drug-taking*) unatoč negativnim posljedicama (1). Ovisnost kao kronični poremećaj podrazumijeva 3 glavne karakteristike, a tu spadaju kompulzivno traženje i konzumacija droge, gubitak kontrole pri ograničavanju konzumacije i negativna emocionalna stanja kada droga nije dostupna (iritabilnost, anksioznost, disforija) (2). Droge koje uzrokuju ovisnost imaju aktivirajući, nagrađujući (mozak ih interpretira kao pozitivne) te pojačivački efekt (eng. *reinforcing*) tako što potiču na opetovanu konzumaciju. One utječu na neuronsku transmisiju regija u mozgu odgovornih za osjećaj ugone i nagrade (eng. *brain reward system*) te je neuroadaptivna promjena funkcije tih regija povezana sa ovisničkim fenotipom (3). Glavni cilj u razumijevanju ovisnosti jest rasvijetliti na koji način dolazi do promjena u živčanom sustavu i neuroadaptacija koje doprinose ovisnosti (4). Istraživanje ovisnosti se osobito usredotočilo na molekularne mehanizme koji leže u podlozi neuroadaptivnih promjena uzrokovanih konzumacijom droge. Modulacija dopaminergične transmisije i regulacija genske ekspresije je predstavljena kao jedan od mehanizama odgovornih za takve promjene i razvoj ovisnosti (5). Trenutno dostupne terapije uspješne su kod nekih ovisnika, no nemaju zadovoljavajuće rezultate. Stoga je glavni izazov trenutnih istraživanja identificirati stanične i molekularne mehanizme koja će doprinijeti pronalasku novih terapija za sprječavanje ili liječenje ovisnosti. Da bi u tome uspjeli te da bi razumjeli patofiziologiju ovisnosti, potrebno je razvijati životinjske modele koji oponašaju bihevioralni fenotip karakterističan za ovisnost o psihostimulansima (3).

1.2. Uloga dopamina i dopaminergična neurotransmisija

U neuroznanosti, dopamin je poznat kao ključan neurotransmitter koji posreduje u mehanizmu djelovanja psihostimulansa na živčani sustav. Provođenjem eksperimenata u sisavaca, okarakterizirale su se regije u mozgu i signalni putevi odgovorni za ponašanja povezana sa ovisnosti u kojima ključnu ulogu ima dopamin. Dopaminergična transmisija igra važnu ulogu u procesuiranju motoričke aktivacije i bihevioralnog učinka psihomotoričkih stimulansa poput kokaina i metamfetamina. Bazirajući se na teoriji da je dopaminergični put ključan za aktivirajući učinak droge, mnogi terapijski lijekovi za suzbijanje ovisnosti bili su usmjereni upravo na dopaminsku signalizaciju (4).

Neuroni koji sintetiziraju, skladište i otpuštaju monoamine (norepinefrin, dopamin, serotonin (5-HT)) široko su rasprostranjeni u CNS-u sisavaca (6). Ekvivalent norepinefrina u mušica je neurotransmitter oktopamin. U studiji na *Drosophili* pokazana je njegova moguća povezanost s razvojem bihevioralne senzitivacije na volatilizirani kokain (7).

Dopaminergični neuroni sintetiziraju, otpuštaju, reapsorbiraju i metaboliziraju dopamin (DA) koristeći većinu enzima i transportera evolucijski konzerviranih između čovjeka i *Drosophile* (slika 1). Otpušteni DA veže se na receptore postsinaptičkih neurona i modulira unutarstaničnu signalnu kaskadu (8). Uspoređujući sa ljudskim stanjima, dopaminski sustav *Drosophile* također je uključen u kontrolu lokomocije i bihevioralnog fenotipa, iako detalji neuronske kontrole nisu poznati (9) (8). Iz literature je poznato da je pobuđujući i aktivirajući učinak psihostimulansa, primjerice oralno administriranog metamfetamina na spavanje i lokomociju kod *Drosophile* bio povezan sa razinom otpuštenog dopamina (10).

Dopamin je kateholaminski neurotransmitter koji vrši ulogu u motornoj koordinaciji, sinaptičkoj modulaciji i bihevioralnoj plastičnosti (11). Sinteza DA kreće iz aminokiseline tirozin pretvorbom u preteču dopamina, L-Dopa enzimom tirozin hidroksilaza (TH) koji je kodiran genom *pale* u *Drosophili*. Slijedi pretvorba L-Dopa u dopamin Dopa dekarboksilazom (DDC). Nakon sinteze DA u citoplazmi, pakira se u egzocitozne sinaptičke vezikule.

Transport DA preko membrane vezikule posredovan je vezikularnim monoaminskim transporterom – VMAT (12). Dok sisavci posjeduju 2 gena koji kodiraju VMAT (*VMAT1* u neuroendokrinim stanicama i *VMAT2* u neuronima) , mušice posjeduju samo jedan *VMAT* gen. Istraživanja su pokazala da *VMAT* mutanti *Drosophila* pokazuju brojne bihevioralne abnormalnosti koje su u skladu sa gubitkom egzocitoznog otpuštanja amina u živčanom sustavu.

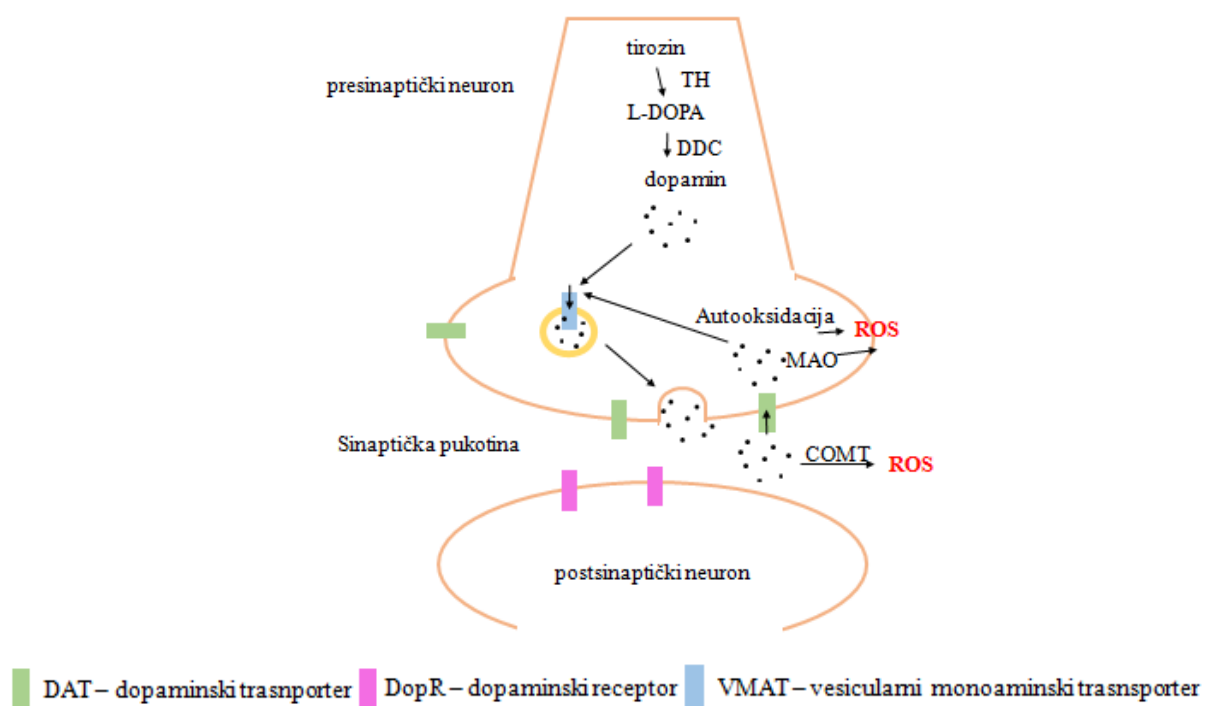
Fenotipovi heterozigota i homozigota *VMAT* mutanta pokazuju bihevioralne učinke kronično reduciranog naspram odsutnog vezikularnog otpuštanja monoamina. Heterozigoti hranjeni hranom s kokainom pokazuju povećanje lokomocije dok kokain nije promijenio motoričko ponašanje homozigota (13). Studija na larvama *Drosophila* pokazala je amfetaminom induciranu 5 puta veću brzinu puzanja kod *wt* jedinki u odnosu na VMAT nul mutante što sugerira da je VMAT esencijalan za amfetaminom induciranu hiperlokomociju (14).

Depolarizacija neurona vodi ka sekreciji DA poglavito putem egzocitoze vezikula na presinaptičkim završecima neurona u sinaptičku pukotinu. DA se tada veže na receptore na postsinaptičkom neuronu. U *Drosophila* su identificirana 4 G-protein vezujuća DA receptora: dva D1-slična receptora (*DopR1* i *DopR2*), jedan D2-sličan receptor (*D2R*) i *DopEcR*. U dosadašnjim studijama na *Drosophila* i miševima, promatrao se utjecaj psihostimulansa na mutante u dopaminskom receptoru, primjerice D1 receptoru (*dumb*). Tako je na *dumb* mutantima *Drosophila* pokazan izostanak psihostimulativnog učinka metamfetamina (15) što je pokazano i u studijama na miševima. Miševi bez funkcionalnog D1 dopaminskog receptora nisu pokazali lokomotornu hiperaktivnost nakon tretmana kokainom (16).

Nakon signalizacije, DA mora biti uklonjen iz sinaptičke pukotine. Jedan mehanizam uključuje reapsorpciju DA u presinaptički neuron putem dopaminskog transportera DAT te pakiranje natrag u vezikule (17). Slične studije poput onih na *VMAT* i *DopR1* mutantima *Drosophila*, koristile su mutante *fumin* (*fmn*) u dopaminskom transporteru (DAT) kako bi potvrdile njegovu ulogu na bihevioralni odgovor. Gubitak funkcije DAT izaziva neprekidnu budnost u mutanata *Drosophila* što rezultira dramatičnim povećanjem aktivnosti te su više osjetljivi na mehanički stimulus (18).

U drugoj studiji, *fmn* mutantima *Drosophila* dan je metamfetamin, te su pokazale rezistenciju na njegov psihostimulativni efekt. Nisu pokazale osjetljivost, čak su povećale period spavanja (15).

Slični rezultati rezistencije na psihostimulativni efekt kokaina i metamfetamina pokazan je i na DAT mutiranim miševima. Intraperitonealne injekcije visokih doza kokaina i D-amfetamina nisu izazvale značajan lokomotorni učinak niti stereotipna ponašanja kod DAT homozigotnih mutanata. Kod *wt* i heterozigotnih miševa, oba stimulansa izazvali su 6-8 puta veću lokomotornu aktivnost (19).

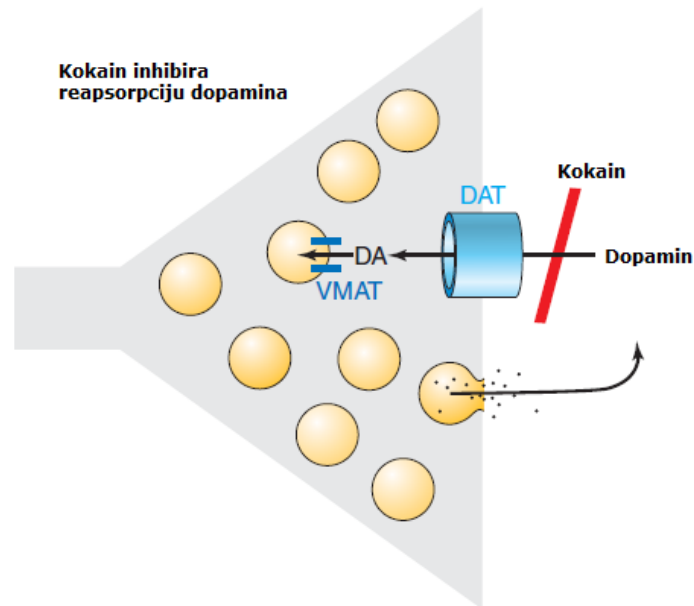


Slika 1: Dopaminska sinteza, otpuštanje i metabolizam

1.2.1. Utjecaj kokaina (COC) i metamfetamina (METH) na dopaminergičnu transmisiju

Zajedničko svojstvo psihostimulansa, kokaina i amfetamina je da razvijaju ovisnost. Iz literature je poznato da ponovljene doze psihostimulansa u životinja izazivaju progresivno povećanje lokomotornog odgovora stručnog termina bihevioralna senzitivacija (20) o čemu će detaljno biti govora u poglavlju 1.4. Bihevioralna senzitivacija. Takvo progresivno povećanje lokomocije u uskoj je vezi sa razinom dopaminergične transmisije (8).

Droge koje ciljaju dopaminske transportne proteine dijele se u 2 skupine obzirom na mehanizam djelovanja, a to su one koje inhibiraju ponovnu pohranu dopamina i one koje pojačavaju otpuštanje dopamina iz presinaptičkog neurona. Kokain ima jaki psihostimulativni učinak i djeluje kao kompetitivni inhibitor reapsorpcije dopamina iz sinaptičke pukotine u presinaptički neuron. Vežući se za DAT na presinaptičkom neuronu, blokira ponovnu pohranu dopamina te tako povećava njegovu izvanstaničnu koncentraciju (6) (slika 2).



Slika 2: Mehanizam djelovanja kokaina

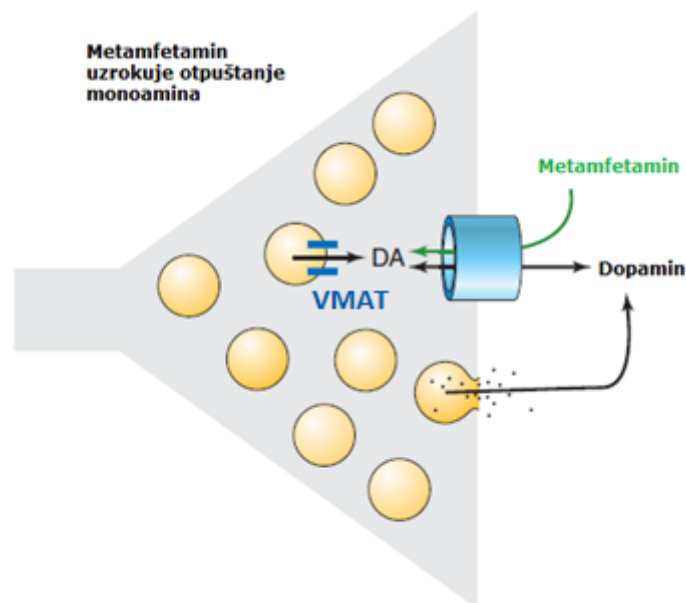
DA – dopamin; DAT-dopaminski transporter; VMAT-vezikularni monoaminski transporter
(Slika preuzeta iz rada br. (4) navedenog u literaturi)

Za razliku od kokaina, metamfetamin (METH) olakšava brže otpuštanje dopamina te na nivou presinaptičkog neurona ima dvojak mehanizam djelovanja. Metamfetamin povećava razinu dopamina u citoplazmi tako što ometa njegovo skladištenje u vezikule i pojačava efluks dopamina iz citoplazme tako što mijenja funkciju DAT-a (6).

Učinak metamfetamina na otpuštanje dopamina iz neurona uglavnom se pripisuje ulasku u presinaptički neuron kao supstrat DAT-a te posljedičnoj promjeni njegove funkcije na reapsorpciju dopamina iz sinaptičke pukotine poznatoj kao "reverzni transport" (21). Hipoteza modela olakšane "difuzije razmjene" sugerira da transport METH-a u stanicu inducira posljedično otpuštanje DA u sinaptičku pukotinu (22) (23).

Postoje dvije teorije transporta METH-a u stanicu: sporom lipofilnom difuzijom i brzim transportom preko DAT-a. S obzirom da je visoko lipofilan i strukturom sličan dopaminu, lako može prijeći krvno-moždanu barijeru i penetrirati u mozak (22). Kada je u dopaminskom neuronu, METH se veže na VMAT, ulazi u vezikulu i potiče redistribuciju monoamina. Na taj način povećava izvanvezikularnu koncentraciju dopamina u citoplazmi.

Jedna od hipoteza djelovanja METH-a na izmjenu funkcije VMAT je tzv. "hipoteza slabe baze". METH je slaba baza sa pKa 9.9 koja može prijeći membranu i ući u kisele organele (vezikule, mitohondrije). Tada se protonira i akumulira u vezikule. Kako je transport dopamina putem VMAT ovisan o protonskom gradijentu, akumulacija protoniranog METH-a u vezikuli ometa vezikularno skladištenje DA (22) (23) te dopamin ostaje u citoplazmi. Kako METH blokira reapsorpciju DA preko plazma membrane, njegovo otpuštanje iz citoplazme u sinaptičku pukotinu inducirano je reverznim transportom putem DAT-a (slika 3).



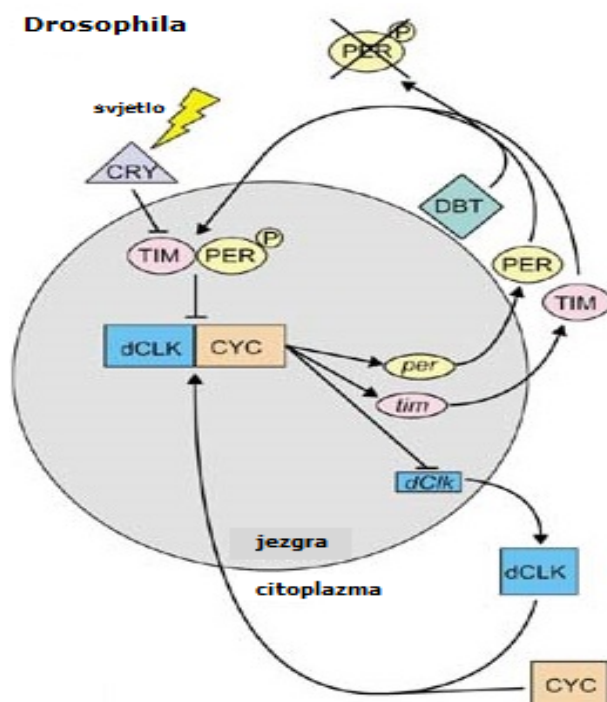
Slika 3: Mehanizam djelovanja metamfetamina

DA – dopamin; VMAT – vezikularni monoaminski transporter
(Slika preuzeta iz rada br. (4) navedenog u literaturi)

1.3. Uloga cirkadijalnih gena u ovisnosti

Cirkadijalni ritmovi su genetski određeni biološki oscilatori važni za održavanje fiziologije i ponašanja mnogih organizama (24). Cirkadijalni ritmovi podrazumijevaju fizičke, fiziološke i bihevioralne oscilacije prateći 24-satne cikluse izmjene dana i noći (tzv. "zeitgeberi"). Poremećaji cirkadijalnog ritma i gena koji kontroliraju molekularni sat u ljudi mogu utjecati na razvoj i progresiju ovisnosti. Studije na životinjama i ljudima pokazale su povezanost ovisnosti o drogama sa poremećajima u dnevnim ritmovima. Primjerice, polimorfizmi u ljudskim cirkadijalnim genima asocirani su s povećanom sklonošću ka razvoju ovisnosti no osim toga i okolišni čimbenici koji remete cirkadijalni ritam poput smjenskog rada mogu utjecati na povećani rizik zlouporabe droga (25). S obzirom da se smatra kako je bihevioralna senzitivizacija kritična komponenta žudnje koja vodi ka ovisnosti (26), razumijevanje konkretne povezanosti cirkadijalnog ritma i senzitivizacije će dati uvid u utjecaj poremećaja cirkadijalnog ritma kao rizičnog faktora za razvoj ovisnosti (25).

Kao i mnogi organizmi, *Drosophila* se prilagodila 24-satnim oscilacijama. Bihevioralni fenotip mjerljiv u *Drosophila* koji je pod kontrolom cirkadijalnog ritma je motorička aktivnost te je njen vrhunac vidljiv 2 puta dnevno – pred zoru i uvečer (27). Poznato je da se endogena cirkadijalna ritmičnost u mušica odvija na molekularnom nivou preko transkripcije, translacije i fosforilacije određenih gena ovisno o dobu dana. Te oscilacije događaju se putem negativne povratne sprege transkripcije i translacije cirkadijalnih gena i njihovih proteina (24) (slika 4). *Clock* (*Clk*) i *cycle* (*cyc*) geni kodiraju proteine CLK i CYC koji se udružuju u heterodimer CLK/CYC koji se veže u jezgri na promotorske regije (E-box sekvence) *period* (*per*) i *timeless* (*tim*) gena te potiče njihovu transkripciju. Nastali PER protein udružuje se u kompleks sa TIM proteinom te PER/TIM kompleks negativnom povratnom spregom direktno stupa u interakciju sa kompleksom CLK/CYC i time inhibira transkripciju vlastitih *per* i *tim* gena (28). Cirkadijalni proteini tako reguliraju mnoge stanične mehanizme modulirajući ekspresiju i aktivnost ostalih gena i proteina u stanici.



Slika 4: Mehanizam cirkadijalne negativne povratne sprege kod *Drosophile*

Slika preuzeta sa: <https://blogs.brandeis.edu/flyonthewall/translational-findings-fruit-fly-contributions-to-research-in-circadian-rhythms/>

Neočekivano je utvrđeno da je razvoj senzitivacije na kokain kod *Drosophile* ovisan o funkciji cirkadijalnih *period*, *Clock* i *cycle* gena. Primjerice, *period* (*per*), *clock* (*Clk*) i *cycle* (*cyc*) mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na opetovane administracije volatiliziranog kokaina. Zanimljivo je da mutanti *Drosophile* u *period* vezujućem partneru *timeless* (*tim*) genu ne pokazuju fenotip povezan s kokainom te se normalno senzitiviraju što daje naslutiti da funkcija *period* gena u regulaciji cirkadijalnog ritma i senzitivaciji na kokain uključuje različite molekularne mehanizme i prostorno uvjetovanje (29).

U tom kontekstu, potvrđena je važnost cirkadijalnih gena u posredovanju kokainom induciranog bihevioralnog odgovora i kod glodavaca. Pokazano je da homologni *per* geni reguliraju senzitivaciju na kokain u miševa. Dok mPer1 knockout miševi ne razvijaju senzitivaciju, mPer2 knockout miševi pokazuju značajnu senzitivaciju (30). Nasuprot otkrićima na *Drosophili*, miševi kojima nedostaje funkcionalni *Clock* gen razvijaju bihevioralnu senzitivaciju (31). Ove studije rasvjetljavaju moguće mehanizme kako *period* i ostali cirkadijalni geni reguliraju senzitivaciju na kokain.

Kako bi pokazali da cirkadijalni geni ne reguliraju samo fenotipove na kokain već i na druge vrste droga, u jednoj je studiji na štakorima pokazano da kronična administracija metamfetamina uzrokuje desinkronizaciju lokomotorne aktivnosti od cirkadijalnog ritma. Kod METH tretiranih štakora, ekspresija rPer1 gena u različitim dijelovima mozga imala je desinkronizirani cirkadijalni ritam što sugerira da je lokomotorna aktivnost u štakora direktno vođena satom i u ostalim dijelovima mozga (32).

1.4. Biheviorna senzitivacija

Psihostimulansi ispoljavaju tri različite vrste učinka, a to su aktivirajući na motoričke sposobnosti, pobuđujući na živčani sustav i nagrađujući učinak koji je direktno povezan sa razvojem ovisnosti (26). Ponašanje povezano sa psihostimulansima, uključujući spomenute učinke, ovisi o njihovoj sposobnosti da povećaju izvanstaničnu razinu dopamina.

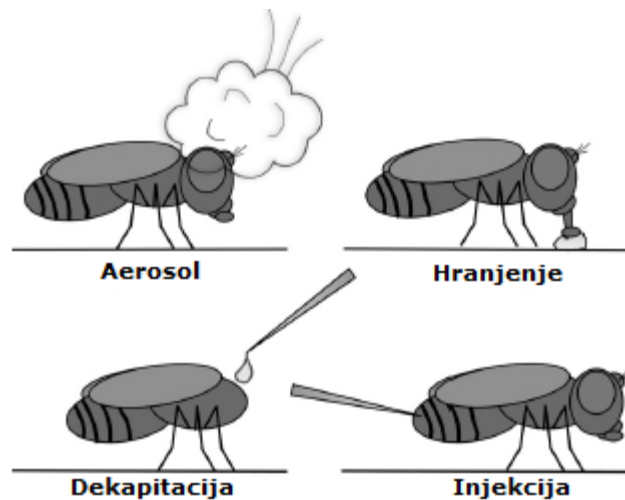
Poznato je da se učinak psihostimulansa mijenja ukoliko se uzima opetovano te neke od tih promjena uključuju adaptacije u neuronskoj mreži. Biheviorna senzitivacija je fenomen koji podrazumijeva dugotrajne promjene u ponašanju nakon ponovljenog izlaganja psihostimulansu. Ponavljana, kronična administracija relativno malih doza uzrokuje progresivno povećanje drogom inducirane lokomotorne stimulacije. Psihostimulansi kao amfetamini i kokain, korišteni su u većini studija o drogom induciranim motoričkim stimulativnim učincima (26). Senzitivacija se u laboratorijskih životinja ispitala u vidu biheviornog endofenotipa da bi se otkrili mehanizmi neuronske modulacije pod utjecajem psihostimulansa. Nakon ponovljene administracije psihostimulansa, manifestira se u vidu postepenog povećanja lokomotornog odgovora – lokomotorna senzitivacija ili u vidu povećanja intenziteta stereotipnog, motoričkog ponašanja – biheviorna senzitivacija te je takav biheviorna fenotip moguće mjeriti. Poznato je da se biheviorna senzitivacija razvija kao odgovor na brojne stimulanse poput kokaina, metamfetamina, etanola, nikotina i Δ^9 -tetrahidrokanabinola. Razvoj biheviorne senzitivacije dijeli se u dvije faze: inicijaciju i ekspresiju. Inicijacija je rani neuralni događaj koji inducira biheviornu senzitivaciju, a ekspresija podrazumijeva dugoročne posljedice inicijacije (33).

Jedini usporedivi stimulativni, aktivirajući učinak koji je okarakteriziran u ljudi je senzitivacija na psihogene učinke amfetamina i kokaina. Za razumijevanje ovisnosti, od velike je važnosti razumijeti pod kojim se uvjetima uzimanje droge razvija u kompulzivno, nekontrolirano uzimanje droge (26). Vjerojatno je da se transformacija u ponašanje događa kada ovisnici razviju opsesivnu, neodoljivu žudnju za drogom koja neizbježno vodi ka opsesivnom traženju (eng. *drug seeking*) i konzumaciji (eng. *drug taking*). Ovisničko ponašanje razvija se uslijed progresivnih i dugotrajnih neuroadaptacija uzrokovanih ponovljenom konzumacijom. Stoga se smatra da su te drogom inducirane promjene u živčanom sustavu, neurokemijski i bihevioralno manifestirane fenomenom senzitivacije koja predstavlja progresivno povećanje učinka droge sa opetovanom konzumacijom. Dakle, definirajuća karakteristika ovisnosti (žudnja) direktno je povezana sa drogom-induciranim promjenama u živčanom sustavu povezanim sa senzitivacijom. Senzitivacija živčanog sustava drogama rezultira patološkim povećanjem privlačnosti (eng. "*incentive salience*") kojeg živčani sustav povezuje sa konzumacijom. Što je ona češća, konzumacija postaje privlačnija. Stimulatorno djelovanje droga sve je više u stanju kontrolirati ponašanje jer živčani sustav koji posreduje želju postaje progresivno senzitiviran. Smatra se da opetovana konzumacija ne senzitivira neuralni dio odgovoran za ugodu već dio odgovoran za privlačnost, pretvarajući želju u žudnju. Neuroadaptivne promjene koje podliježu bihevioralnoj senzitivaciji su dugotrajne i u nekim slučajevima trajne. Smatra se da je njihova postojanost ta koja čini ovisnike hiperosjetljivim na droge čak i nakon perioda apstinencije te da postojanost senzitivacije čini učinak droge toliko djelotvornim čak i kod izliječenih ovisnika (26).

1.4.1. Načini administracije psihostimulansa i dosadašnje metode mjerenja bihevioralnog fenotipa

Postoje razni načini administracije psihostimulansa u mušica, primjerice kokain i etanol mogu biti administrirani u volatiliziranom obliku (20) ili se mogu davati u kombinaciji sa hranom ili na filter papiru pomiješani sa saharozom.

Psihostimulansi se mogu injektirati ili aplicirati direktno na nervnu moždinu (eng. nerve cord-ekvivalent leđnoj moždini) dekapitiranih mušica ili se mogu injektirati intraperitonealno gdje rapidno difundiraju kroz organizam (34) (slika 5).



Slika 5: Načini administracije psihostimulansa

(slika preuzeta iz rada br. (34) navedenog u literaturi)

U istraživanjima na *Drosophili*, bihevioralni učinci psihostimulansa inducirani su i mjereni ovisno o načinu administracije. Primjerice, bihevioralni učinak kokaina mjerio se nakon administracije u obliku aerosola (20). Bihevioralni učinak metamfetamina u mušica mjerio se nakon oralne administracije (10) (29), a kod miševa nakon intraperitonealne administracije (35). Bihevioralni učinci psihostimulansa obično uključuju praćenje lokomotorne aktivnosti životinje jer to pruža objektivni način kvantifikacije posljedice djelovanja droga (33).

Publicirane metode praćenja posljedica volatiliziranog psihostimulansa na motoričku aktivnost *Drosophile* koristile su 3 vrste praćenja. Prva metoda je nakon administracije droge uključivala 10-minutno video-snimanje grupe mušica te se ponašanje kvantificiralo prema skali jačine odgovora od 0 (normalno ponašanje) do 7 (akinezija,paraliza).

Svakoj mušici kvantificirano je ponašanje bodovanjem najizraženijeg ponašanja pokazanog nakon određenog vremenskog intervala (36) (20). Nedostatak ove metode je što zahtjeva puno sofisticiranije manipulacije životinjama, vremenski je zahtjevna i nije objektivna (36) (37).

Druga metoda je nakon administriranja kokaina uključivala kompjutersko snimanje male grupe mušica tijekom 5 minuta nakon izlaganja. Potom su se vizualno kvantificirali kompjuterski generirani tragovi brzine lokomotorne aktivnosti u mm/sekundi (36) (38). Ova metoda je vremenski zahtjevna, zahtjeva subjektivne, vizualne analize pojedine mušice, kompleksno rukovanje životinjama što može lažno pozitivno utjecati na kvantifikaciju odgovora i mjeri samo akutnog odgovora na psihostimulans.

Treća metoda koristi prirodnu sposobnost *Drosophila* da se kreće vertikalno po površini – negativnu geotaksiju. Uređaj "crackometar" kvantificira gubitak sposobnosti negativne geotaksije nakon dozno-ovisnog izlaganja volatiliziranom kokainu (38). Razvijena je i poluautomatska inačica ove metode koja pruža visokoprotodne bihevioralne analize. Kamere su postavljene tako da snimaju dno plastične tubice u kojoj se mušice nalaze. Nakon izlaganja kokainu mjeri se broj mušica koje su ostale na dnu (37). Iako je objektivna, reproducibilna i prikladna za genetski probir, ovakva vrsta metode mjeri samo "Startle" efekt i akutni učinak kokaina ali nije korištena za genetski probir koji regulira mehanizme neuroplastičnosti nakon opetovane administracije.

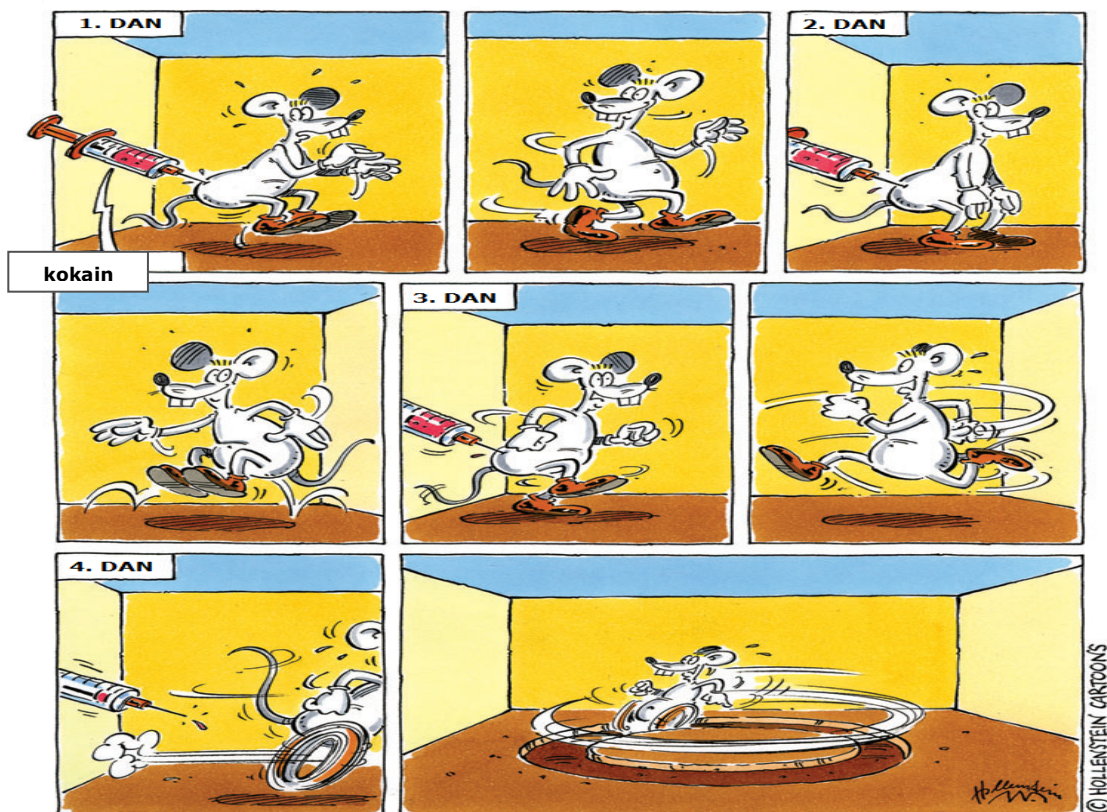
Učinci kokaina na bihevioralni odgovor *Drosophila* mjerili su se i praćenjem lokomocije putem DAMS sustava nakon intraabdominalno injektiranog kokaina. Ova metoda pruža objektivno mjerenje bihevioralnog učinka kokaina na individualnoj razini, kojom je moguće mjeriti akutni odgovor i bihevioralnu senzitivaciju. S obzirom da ova metoda ipak zahtjeva vrijeme i kompleksno rukovanje životinjama, potrebno je osmisliti metodu koja bi bila objektivna, vremenski manje zahtjevna sa minimalnom manipulacijom životinjama. Trebala bi omogućiti mjerenje akutnog učinka psihostimulansa i bihevioralne senzitivacije te u isto vrijeme biti visokoprotodna za genetski probir jedinki.

1.4.2. Bihevioralni fenotip glodavaca na kokainu i metamfetaminu

Do sada se u studijama prvenstveno na glodavcima istraživalo kako psihostimulansi ispoljavaju svoje akutne i kronične učinke (36). Kratkoročno, akutno izlaganje psihostimulansu uzrokuje povećani lokomotorni odgovor definiran kao osjetljivost (39). Pokazano je da izlaganje volatiliziranom kokainu kod glodavaca inducira dozno-ovisan raspon ponašanja (36).

U glodavaca, akutna administracija kokaina izaziva psihomotoričke oscilacije koje se sastoje od povećanja spontane lokomocije te ekspresije stereotipnog ponašanja – njuškanja, čišćenja i kruženja. Ponovljeno izlaganje kokainu rezultira dugotrajnim postepenim pojačanjem lokomotorno-stimulativnog efekta izazvanog tim naknadnim izazivanjem drogom (36). Kao što je već objašnjeno, smatra se da taj fenomen bihevioralne senzitivacije čini podlogu aspekata ovisnosti (26).

Da bi se postigao taj učinak, protokol za induciranje senzitivacije bi trebao koristiti rutu administracije koja dovodi do brzog učinka droge npr. intraperitonealnim ili intravenoznim injekcijama (40) (slika 6).



Slika 6 : Animirani prikaz bihevioralne senzitivacije u glodavaca
(slika preuzeta iz rada br. (40) navedenog u literaturi)

Bihevioralna senzitivacija je dugotrajna pojava te u glodavaca može trajati mjesecima. Postoje velike sličnosti u senzitivaciji između glodavaca i *Drosophila*. U oba slučaja ona se može inducirati nakon jednog izlaganja kokainu, no postaje intenzivnija sa ponovljenim izlaganjem što uvelike ovisi o intervalu između administracija. Brojni su čimbenici koji utječu na jačinu senzitivacije poput: broja administracija, doze, spola, starosti, vremenskog intervala između administracija (33).

Senzitivacija na amfetamine kod glodavaca može ispoljiti intenzivno stereotipno ponašanje koje konkurrira lokomociji. Tako je studija na štakorima pokazala da akutna intraperitonealna administracija umjerenih do visokih doza amfetamina inducira multifazni bihevioralni odgovor. Sastojao se od inicijalnog perioda lokomotorne aktivnosti nakon čega su slijedile epizode intenzivnog stereotipnog ponašanja te je naposljetku slijedio period post-stereotipne lokomocije (redukcija u lokomociji i zakašnjelo povećanje lokomocije). Ponovljena administracija rezultirala je senzitivacijom u vidu još bržeg nastupa stereotipnog ponašanja te pojačanja post-stereotipne lokomotorne aktivnosti (33) (35).

1.4.3. Bihevioralni fenotip *Drosophila* na kokainu i metamfetaminu

Posljednjih desetljeća, *Drosophila melanogaster* pokazala se kao reprezentativan animalni model za genetske, molekularne i bihevioralne analize u ovisnosti. Predstavljena je kao novi modelni organizam koji će rasvijetliti složenu genetsku i neuroanatomsku podlogu ovisničkog bihevioralnog fenotipa (41). Prednost *Drosophila* leži u njenoj jednostavnijoj i sofisticiranijoj genetskoj strukturi te jednostavnijoj strukturi živčanog sustava s obzirom na sisavce. Niti jedan stimulans nije uspio na mušicama ispoljiti cijeli spektar ovisničkog ponašanja, no to se može unaprijediti zbog sve sofisticiranijeg bihevioralnog testiranja. Mušice dakako pokazuju neke elemente ovisničkog ponašanja te jake bihevioralne učinke na brojne psihoaktivne supstance uključujući kokain, nikotin i etanol (42). Kao i kod glodavaca, studije potvrđuju da su bihevioralni učinci psihostimulansa uspješno izazvani i u *Drosophili*. Kod *Drosophila* se pokazalo da manje doze kokaina dovode do intenzivnog čišćenja (eng. *grooming*) i smanjene lokomocije. Umjerene doze izazivaju trzanje krilima, pružanje surlice, hod unatrag, rotaciju u krug dok visoke doze pobuđuju tremor, akineziju, paralizu te

na koncu smrt (42) (20) (38) (43). Osim toga, u *Drosophili* je bihevioralna senzitivacija uspješno izazvana volatiliziranim kokainom kada su mušice bile izložene aerosolu u trajanju od 1 minute. Ponovljeno izlaganje iste koncentracije kokaina dovelo je do progresivnog povećanja lokomotornog odgovora sa maksimalnom senzitivacijom kada je drugo izlaganje bilo u vremenskom intervalu od 6 h nakon prvog. Značajna razina senzitivacije bila je vidljiva i nakon 24-satnog intervala između administracija (20).

Manji broj studija je okarakterizirao utjecaj amfetamina na *Drosophilu*, uglavnom metamfetamina. Do sada se još nije ispitivao razvoj bihevioralne senzitivacije na metamfetamin kod mušica već su se istraživale tek posljedice oralno administriranog metamfetamina. Pokazano je da je metamfetamin povećao lokomotornu aktivnost mušica, smanjio količinu sna te poremetio složene obrasce ponašanja kao što je to udvaranje mužjaka (10). Administracija metamfetamina je također povezana sa promjenama u vizualnom pobuđivanju neuralne aktivnosti što implicira na mogućnost utjecaja na vizualnu percepciju. U studijama oralno administriranog metamfetamina nije uočeno stereotipno ponašanje viđeno kod administracije volatiliziranog kokaina (hiperaktivnost, nekoordinirano ponašanje) (44) (10).

Osim studija kojima bi se okarakterizirao bihevioralni utjecaj metamfetamina na *Drosophilu*, također su se provodila i in vivo istraživanja koja su koristila *Drosophilu* kao životinjski model za razumijevanje molekularnih mehanizama djelovanja metamfetamina. Prvenstveno se to odnosilo na mehanizme utjecaja na dopaminsku transmisiju putem dopaminskih transportera (45) i vezikularnih transportera monoamina (14).

Tablica 1: Fenotipi vidljivi na glodavcima i *Drosophili* s obzirom na vrstu psihostimulansa

KOKAIN	METAMFETAMIN
Povećanje lokomocije	Povećanje lokomocije
Intenzivno čišćenje/njuškanje	Ometanje sna
Trzanje krilima	Povećano seksualno uzbuđenje
Hod unatrag	Smanjena sposobnost kopulacije
Rotacija u mjestu	Stereotipno ponašanje (35) (33)
Tremor, akinezija, paraliza, smrt	Poremećena vizualna percepcija/pažnja (10)

Ovim istraživanjem željeli smo razviti visokoprotočnu, kvantitativnu, objektivnu metodu koja će omogućiti genetski probir za identifikaciju gena kandidata ključnih u razvoju bihevioralne senzitivacije. Željeli smo validirati metodu na cirkadijalnim mutantima *Drosophila* te testirati mutante u dopaminskom sustavu za otkrivanje novih gena kandidata, kojima ćemo potvrditi da je razvoj senzitivacije u *Drosophila* sličan sisavcima. Time potencijalno dobivamo spoznaje za daljnje testiranje genetskih mehanizama u podlozi razvoja senzitivacije u sisavaca.

2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti i validirati novu visokoprotočnu platformu koja će na objektivan i reproducibilan način na individualnoj razini inducirati i kvantificirati bihevioralni odgovor *Drosophila melanogaster* na psihostimulanse.

Drugi cilj je definirati razlike u mehanizmu djelovanja kokaina i metamfetamina optimizacijom koncentracije i vremenskog intervala između administracija za postizanje lokomotorne senzitivacije.

Novo razvijena metoda će omogućiti bihevioralni probir za identifikaciju gena kandidata koji sudjeluju u razvoju bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse i utvrđivanje neuronske mreže u kojoj cirkadijalni i potencijalno novi identificirani geni sudjeluju te njihovu interakciju sa dopaminergičnim sustavom.

U ovom radu optimizirali smo metodu definirajući vrijeme izlaganja, koncentraciju i vremenski period između administracija psihostimulansa za induciranje lokomotorne senzitivacije. Ispitali smo da li je povećanje lokomotorne aktivnosti nakon akutnog i ponovljenog izlaganja kokainu i metamfetaminu dozno i vremenski ovisno tako što smo administrirali psihostimulanse u različitim koncentracijama i vremenskim intervalima. Kako bi ispitali postoji li povezanost cirkadijalnih gena u regulaciji razvoja lokomotorne senzitivacije, ispitali smo aktivirajući učinak kokaina i metamfetamina na cirkadijalne mutante *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹*. Kako bi utvrdili da li osim cirkadijalnih gena, u razvoju senzitivacije posreduje i dopaminska modulacija glavnih meta psihostimulansa, testirali smo aktivirajući učinak kokaina i metamfetamina na mutante u dopaminskom transporteru - DAT (*fumin*), dopaminskom receptoru tipa 1 - *DopR1* (*dumb*), te mutante inaktivnog VMAT u Dopa dekarboksilaza, *per* i *Clk* pozitivnim neuronima.

Rezultati ovog istraživanja omogućit će daljnji genetski probir i identifikaciju gena u podlozi regulacije razvoja bihevioralne senzitivacije na psihostimulanse što bi u budućnosti moglo doprinijeti otkriću ključnih meta djelovanja droga i razvoju potencijalnih farmakoloških supstanci koje bi djelovale kao antagonisti učinka psihostimulansa.

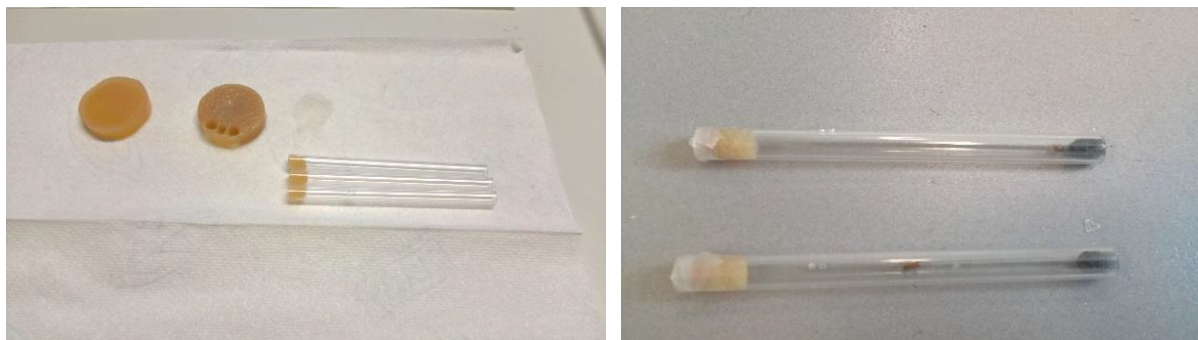
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Soj i uzgoj *Drosophile melanogaster*

U eksperimentima korišten je divlji tip *Drosophile melanogaster* genetske pozadine Canton-S (CS). Korišteni mutanti u cirkadijalnim genima imali su istu genetsku pozadinu divljeg tipa CS: nul mutant *period* gena (*per*⁰¹), *Jrk* alela *Clock* gena (*Clk*^{Jrk}), nul mutant *cycle* gena (*cyc*⁰¹) sa genetskom pozadinom *rosy* (*ry*) i nul mutant *timeless* gena (*tim*⁰¹). Korišten je i soj *fumin* sa mutacijom u genu za DAT - dopaminski transporter (*fmn*) i nefunkcionalna alela DopR1 – dopaminski receptor tipa 1 (*dumb*) te transgenetski soj UAS-VMAT RNAi za inaktivaciju funkcije vezikularnog monoaminskog transportera (VMAT), a eksprimiran je u sljedećim neuronima križanjem s transgenetskim sojevima GAL4-*per* u *period* pozitivnim neuronima, GAL4-*Clk* u *Clock* pozitivnim neuronima i GAL4-DDC u Dopa dekarboksilaza pozitivnim neuronima.

Inaktivacija VMAT u *per*, *Clk* i dopaminskim neuronima dobivena je pomoću GAL4XUAS binarnog sustava za ekspresiju transgena u *Drosophili*. Parenjem soja koji sadrži genetsku sekvencu GAL4 (transkripcijski faktor kvasca) i promotorsku regiju proteina *period*, *Clock* i Dopa dekarboksilaze sa sojem koji sadrži sekvencu UAS-VMAT RNAi nastaje generacija mušica u kojima ekspresija GAL4 (samo u *per*, *Clk* ili dopaminskim neuronima) dovodi do transkripcije konstrukta VMAT RNAi vezanjem GAL4 transkripcijskog faktora na sekvencu UAS (eng. upstream activation sequence).

Mušice su uzgajane u inkubatoru pri temperaturi od 25° C, vlažnosti 60-75% u kontroliranim svjetlosnim ciklusima (svjetlo-mrak 12h-12h). Hrana za mušice sadržavala je sljedeće sastojke: voda, šećer, agar tip II, kukuruzno brašno i suhi kvasac. U hranu se dodaju nipagin i propionska kiselina da bi se spriječio razvoj plijesni. U pripremi plastičnih cjevčica za DAM sustav (sustav za mjerenje aktivnosti *Drosophile*, eng. *Drosophila Activity Monitoring System*) koristila se hrana od melase sljedećih sastojaka: voda, melasa, šećer, suhi kvasac, agar tip I, nipagin, propionska kiselina. U eksperimentima su se koristili 5 dana stari mužjaci *Drosophile*.



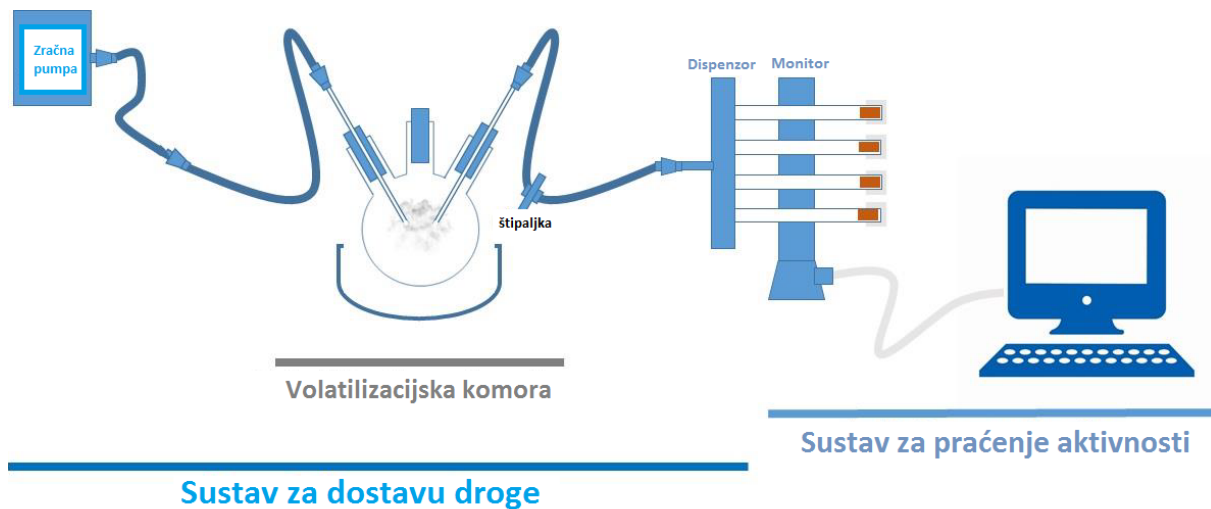
Slika 7: Priprema DAMS plastičnih cjevčica sa hranom od melase obloženom parafilmom

3.2. Platforma za administraciju volatiliziranog kokaina i metamfetamina

Platforma se sastoji od volatilizacijske komore, dispensora i monitora za mjerenje aktivnosti *Drosophila* spojenog na DAM sustav i sustava za dostavu aerosola psihostimulansa do svake mušice (zračna pumpa). Svaki DAMS monitor prima 32 plastične cjevčice sa mušicama i prikuplja podatke o lokomotornoj aktivnosti. Kroz sredinu DAMS monitora prolazi infracrvena zraka. Sustav bilježi broj prelazaka sredine cjevčice svaki put kada mušica prekine infracrvenu zraku. Podatci se prikupljaju kao broj prelazaka individualne mušice u 1 minuti u vremenskom intervalu od 30 minuta prije i 30 minuta nakon administracije psihostimulansa. Volatilizacijska komora (grijaća kapa i trogrla tikvica) volatiliziraju kokain i metamfetamin-hidrokloride grijanjem od 8 min. do temperature od 185°C. Na trogrolj tikvici otvor sa jedne strane je spojen preko staklenih i gumenih cjevčica na dispensor i monitor, a drugi otvor je spojen na zračnu pumpu koja dostavlja psihostimulans u aerosolu. Tijekom grijanja mušice nisu izložene aerosolu već se nakon grijanja, zračna pumpa pali i propuhuje volatilizirane psihostimulanse (150L/h) tijekom precizno definiranog vremenskog perioda (standardni protokol 1 minutu).

Središnji otvor volatilizacijske komore koristi se za pipetiranje etanolske otopine kokaina ili metamfetamina koja je u stock koncentraciji od 10mg/ml. Kokain i metamfetamin korišteni u eksperimentima su u obliku termostabilnih droga – hidroklorida zbog svojstva bolje topljivosti.

Da bi se eliminirao utjecaj etanola u eksperimentima, etanolska otopina kokaina ili metamfetamina dodana je u volatilizacijsku komoru 4-6h prije administracije psihostimulansa da bi etanol ispario. Mušice moraju biti u plastičnim cjevčicama i DAMS monitoru dan prije eksperimenta odnosno barem 18h prije prve administracije psihostimulansa, kako bi se privikle na uvjete.



Slika 8 : Platforma za administraciju volatiliziranog psihostimulansa i mjerenje aktivnosti *Drosophila melanogaster*

Koraci za administraciju volatiliziranog psihostimulansa:

1. Pet dana prije početka svakog eksperimenta praznile su se boce sa mušicama kako bi se dan prije eksperimenta prikupili 5 dana stari mužjaci. Mušice se prikupljaju pod binokularnim mikroskopom, na podlozi za uspavlivanje koja ispušta CO₂. Za svaki eksperiment prikupljene su 64 mušice, po 32 za administraciju volatiliziranog kokaina i 32 za administraciju volatiliziranog metamfetamina. Pripremile su se plastične cjevčice koje s jedne strane imaju hranu od melase obloženu parafilmom.
2. U svaku cjevčicu aspiratorom se upuhivala po jedna mušica
3. 32 pripremljene cjevčice stavljene su u DAMS monitor na način da je dio bez hrane umetnut u dispenser. Cjevčice su postavljene na sredinu monitora.

4. Na dan eksperimenta monitor se spaja sa DAM sustavom putem telefonske žice te sa volatilizacijskom komorom preko gumene cjevčice. DAM sustav prikuplja podatke svake minute.
5. Otvara se središnji otvor na trogloj tikvici te se dozira psihostimulans i ostavlja se otvoreno najmanje 4-6h.
6. Grijaća kapa se postavlja na stupanj 3 te se grije 8 minuta.
7. Gasi se grijaća kapa, skida se štipaljka te se pali zračna pumpa (standardno 1 min)
8. Gasi se zračna pumpa te se ponovno stavlja štipaljka na gumenu cijev.
9. Ponavlja se protokol nakon 6h za administraciju kokaina te nakon 10h za administraciju metamfetamina.
10. Prikupljaju se podatci te se analiziraju na populacijskoj i individualnoj razini.

3.3. Optimizacija platforme za administraciju psihostimulansa

3.3.1. Optimizacija vremena izlaganja mušica struji vrućeg zraka

U ovom eksperimentu 32 *wt* mužjaka *Drosophila* je pomoću platforme za administraciju psihostimulansa bilo izloženo struji vrućeg zraka u vremenskim intervalima od 10 sekundi do 7 min te se mjerio prosječni broj prelazaka sredine cjevčice u periodu od 30 minuta prije i 30 minuta nakon administracije. Svaki eksperiment se ponavljao dva puta.

3.3.2. Analiza distribucije psihostimulansa u DAMS cjevčicama

Kako bi utvrdili da li svaka mušica u pojedinoj DAMS cjevčici dobiva jednaku količinu droge, analizirali smo količinu psihostimulansa u svakoj cjevčici nakon administracije. 32 DAMS cjevčice su bile spojene na dispensor te je svaka cjevčica bila drugim krajem uronjena u eppendorf tubicu sa 500 μ l vode. Nakon toga se putem platforme administrirao kokain. Nakon administracije svaka cjevčica se odvojila od dispensora te se ispirala sa još 500 μ l vode.

450 μ l otopine se pipetiralo na mikrotitarsku pločicu od 48 jažica te se mjerila apsorbanacija na spektrofotometru pri 233 nm. Koncentracija droge u pojedinoj tubici se računala iz kalibracijske krivulje.

3.3.3. Optimizacija koncentracije kokaina i metamfetamina

U ovom eksperimentu 64 *wt* mužjaka je bilo izloženo različitim koncentracijama kokaina i metamfetamina kako bi utvrdili najmanju koncentraciju koja izaziva povećani lokomotorni odgovor. Raspon koncentracija administriranog kokaina je bio od 25 – 150 μ g, a metamfetamina 25 – 200 μ g. DAM sustav je mjerio prosječni broj prelazaka sredine cjevčice u periodu od 30 minuta prije i 30 minuta nakon administracije psihostimulansa. Svaki eksperiment se ponavljao dva puta.

3.4. Bihevioralni testovi

3.4.1. Optimizacija vremenskog intervala između dvije administracije psihostimulansa

Nakon optimizacije vremena izlaganja i koncentracije pojedinog psihostimulansa, testirali smo vremenski interval između dvije administracije kokaina i metamfetamina. Pratili smo u kojem intervalu između administracija dolazi do povećanog lokomotornog odgovora. Oba psihostimulansa administrirana su 1 minutu u vremenskim razmacima od 3-30h. Svaki eksperiment se ponavljao dva puta sa 64 *wt* mužjaka.

3.4.2. Lokomotorna senzitivizacija cirkadijalnih mutanata

U ovom eksperimentu korišteno je po 32 mužjaka svakog mutanta - *period* (*per*⁰¹), *Clock* (*Clk*^{rk}), *cycle* (*cyc*⁰¹) i *timeless* (*tim*⁰¹). Kokain i metamfetamin su dva puta administrirani u vremenu, koncentraciji i intervalu prema optimiziranom protokolu (oba psihostimulansa u koncentraciji od 75 μ g 1 min, vremenski interval između administracija kokaina je 6h, a vremenski interval između administracija metamfetamina je 10h). Svaki eksperiment se ponavljao dva puta.

3.4.3. Lokomotorna senzitivacija mutanata u dopaminskom transporteru (*fmn*), receptoru tipa 1 (*dumb*) i vezikularnom monoaminskom transporteru (VMAT)

U ovom eksperimentu korišteno je 32 mužjaka svakog mutanta - *fmn*, *dumb*, *per*-VMATRNAi, *Clk*-VMATRNAi i DDC-VMATRNAi. Kokain i metamfetamin su dva puta administrirani u vremenu, koncentraciji i intervalu prema optimiziranom protokolu (oba psihostimulansa u koncentraciji od 75 µg 1 min, vremenski interval između administracija kokaina je 6h, a vremenski interval između administracija metamfetamina je 10h). Svaki eksperiment se ponavljao dva puta.

3.5. Statistička obrada rezultata

Inicijalne analize količine lokomotorne aktivnosti u vidu broja prelazaka mušica u cjevčici u pojedinom eksperimentu rađene su u programu Excel, kao i grafički prikazi. Statistički testovi provedeni su u programu Statistica 8. Za utvrđivanje optimalnog vremena izlaganja mušica vrućem zraku, minimalne koncentracije oba psihostimulansa koja izaziva povećani lokomotorni odgovor te vremenskog intervala između administracija korišten je t-test za zavisne uzorke. Za analizu distribucije droge u svakoj cjevčici korišten je t-test za nezavisne uzorke.

Lokomotorna aktivnost cirkadijalnih mutanata i mutanata u dopaminskom sustavu analizirala se na populacijskom i individualnom nivou u predefiniranom Excel-u. Populacijska analiza uključivala je prosječnu lokomotornu aktivnost pojedine grupe mušica nakon svake administracije psihostimulansa (1. vs. 2.). Individualna analiza uključivala je više kriterija. Količina lokomocije za individualnu mušicu prije administracije (bazične vrijednosti) uspoređena je s količinom lokomocije nakon administracije i odgovor je definiran kao pad, porast ili bez promjene u odnosu na bazične vrijednosti. Za kokain, usporedbe su vršene u 5-minutnom, a za metamfetamin u 10-minutnom vremenskom intervalu prije i nakon administracije. Postotak mušica koje povećaju odgovor nakon prve administracije definira osjetljivost na aktivirajuće učinke. Ako ista mušica dodatno poveća aktivnost nakon druge administracije, to definira lokomotornu senzitivaciju na individualnom nivou.

Za utvrđivanje značajnosti povećanja lokomotorne aktivnosti na populacijskom nivou kod cirkadijalnih mutanata te mutanata u dopaminskom sustavu korištena je one-way ANOVA te je provedena post-hoc analiza Tukey's multiple comparison test. Razina statističke značajnosti iznosi $p < 0,05$.

Za utvrđivanje značajnosti povećanja lokomotorne aktivnosti mutanata na individualnom nivou, nije bilo moguće provesti statističku analizu zbog malog broja provedenih eksperimenata (2 eksperimenta). Rezultati su tada zahtijevali samo deskriptivnu obradu.

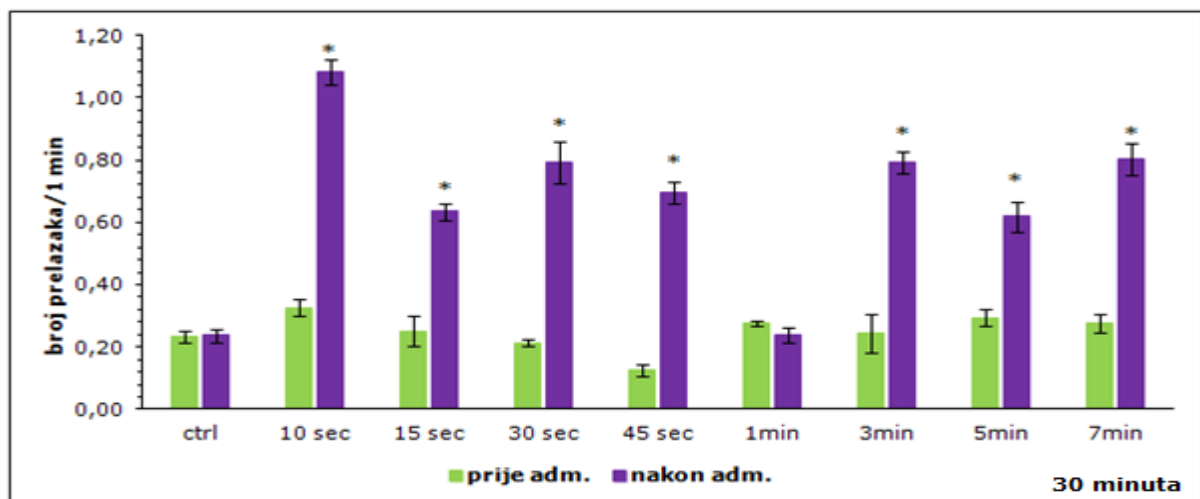
4. REZULTATI

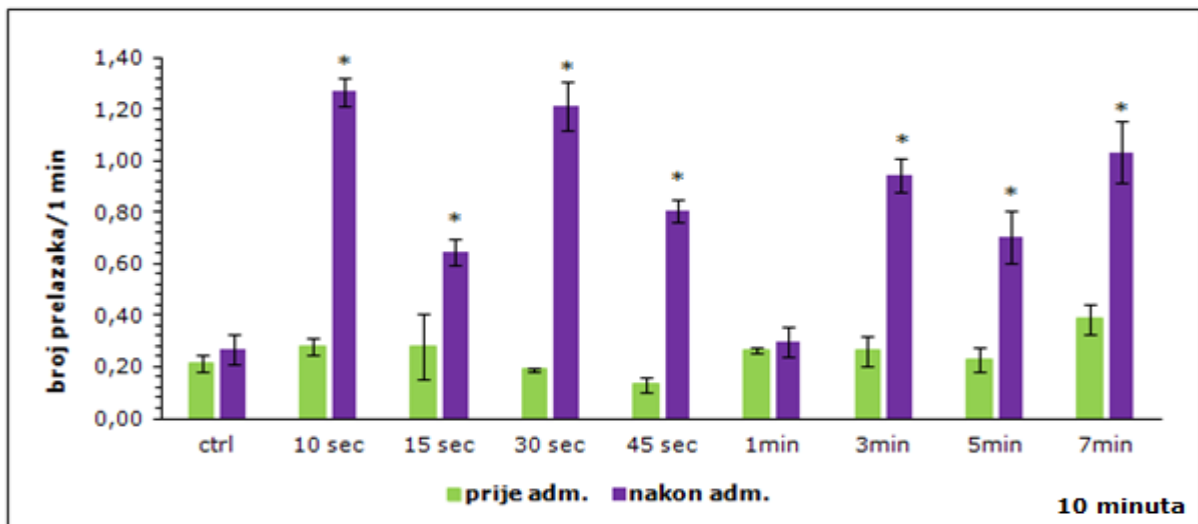
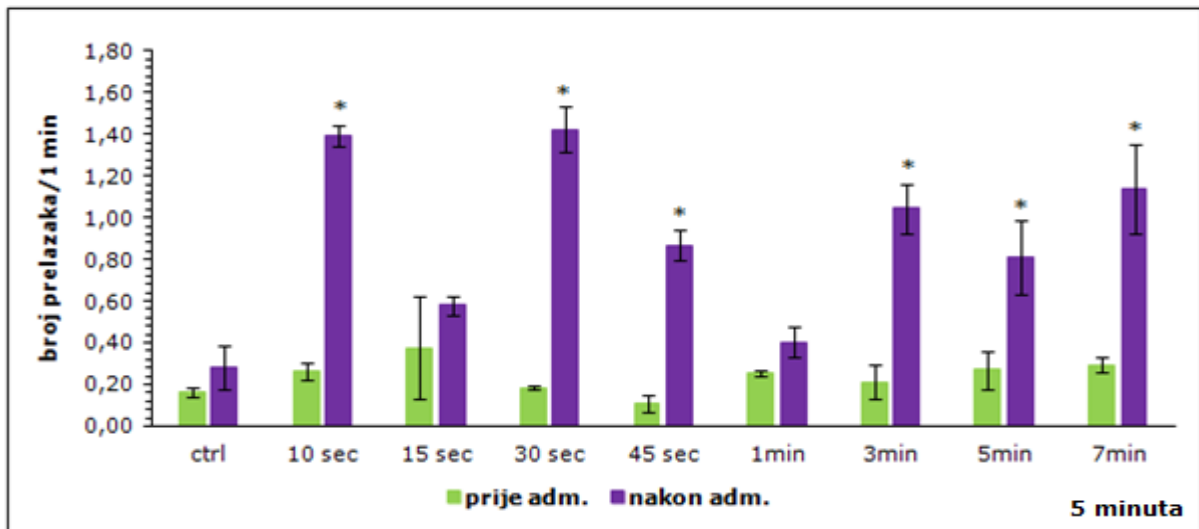
4.1. Optimizacija metode za induciranje i kvantifikaciju lokomotorne senzitivacije

4.1.1. Optimizacija vremena izlaganja *wt* mužjaka *Drosophila* vrućem zraku

Obzirom da se kokain u volatiliranom obliku administrira propuhivanjem u mlazu vrućeg zraka ispitali smo da li izlaganje *wt* mužjaka vrućem zraku mijenja količinu lokomotorne aktivnosti unutar 30 minuta. Mušice smo izložili vrućem zraku u trajanju od 10 sek. do 7 min. Prikazana je i količina lokomotorne aktivnosti unutar 5 i 10 min. jer su se kasnije analize za kokain (5 min.) i metamfetamin (10 min.) bazirale na tim vremenskim intervalima.

Tijekom 30 min. (slika 9.a), 5 min. (slika 9.b) i unutar 10 min. (slika 9.c) do značajnog povećanja lokomocije došlo je pri intervalima od 10, 15, 30 i 45 sekundi te pri 3, 5 i 7 minuta ($p < 0,05$). Optimalno vrijeme izlaganja je 1 minuta jer nije došlo do povećanja lokomocije tijekom 30 min (slika 1.a) niti unutar prvih 5 (slika 9.b) ni 10 minuta (slika 9.c) u odnosu na lokomotornu aktivnost prije izlaganja vrućem zraku ($p > 0,05$). Poznato je iz literature da kratkotrajni šok stimulansi (eng. *startle*) (46) i izlaganje višim temperaturama (eng. *heat shock*) povećavaju lokomotorni odgovor tj. izazivaju hiperaktivnost. Rezultati sugeriraju da je pri kraćim mlazovima zraka (10 - 45sek.) došlo do povećanja lokomocije zbog "*startle*" efekta, dok su pri dužim mlazovima (3 - 7 min.) mušice pokazale osjetljivost na vrućinu i isušivanje (47).

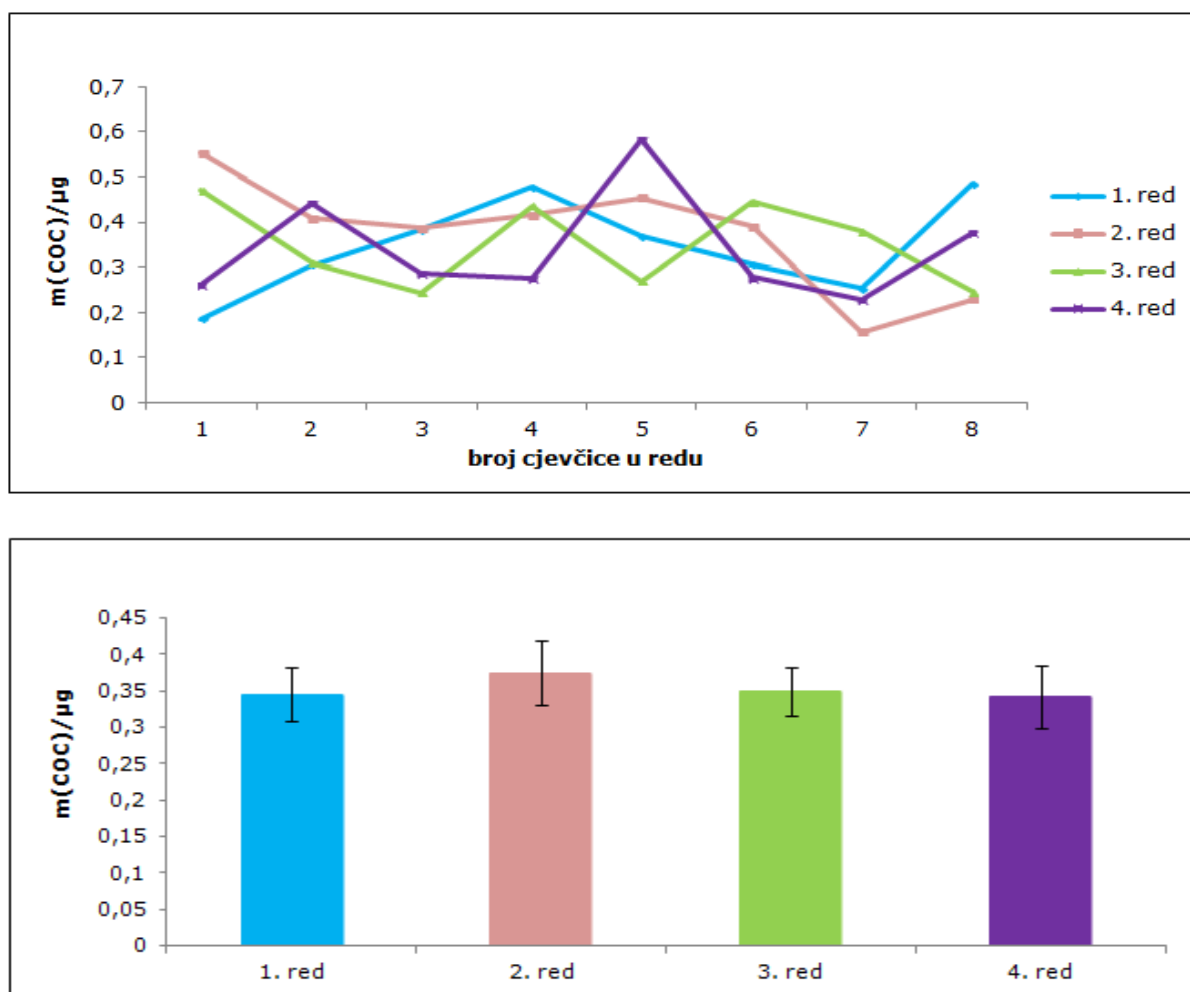




Slika 9. Optimalno vrijeme izlaganja *wt* mužjaka vrućem zraku je 1 minuta. Lokomotorni odgovor mjereno je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Na slici (a) prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 30 minuta, na slici (b) unutar 5 minuta i na slici (c) unutar 10 minuta prije i nakon izlaganja mlazu vrućeg zraka u trajanju od 10 sek. do 7 min, n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu. (* p<0,05; t-test za zavisne uzorke).

4.1.2. Analiza distribucije droge u pojedinoj cjevčici

S obzirom da DAMS monitor prima ukupno 32 cjevčice (u 4 reda po 8 cjevčica), zanimalo nas je da li svaka mušica u pojedinoj DAMS cjevčici dobiva jednaku količinu droge. Analizirali smo količinu kokaina u svakoj cjevčici nakon jedne administracije kokaina (konc. 75 μg , 1 minuta) i pokazali da nema razlike u prosječnoj količini distribuiranog kokaina u DAMS cjevčicama ($p > 0,05$), stoga sve mušice dobivaju jednaku količinu droge (slika 10.).



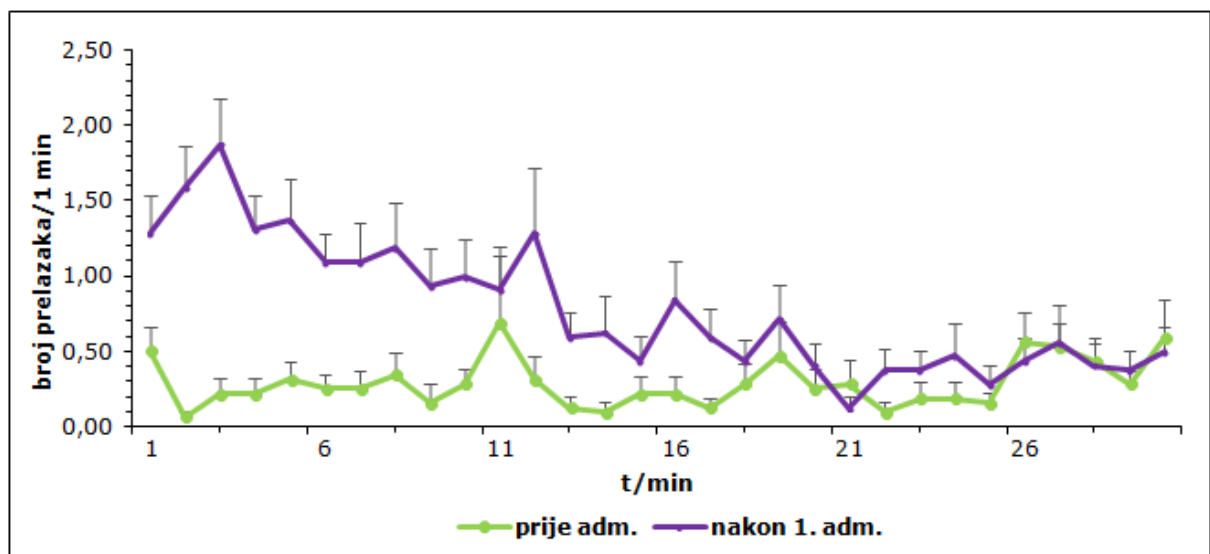
Slika 10: Položaj cjevčice u DAMS monitoru ne utječe na koncentraciju distribuiranog kokaina. Mjerila se količina kokaina distribuiranog u svakoj DAMS cjevčici (8 cjevčica x 4 reda). 32 DAMS cjevčice su bile spojene na dispensor te je svaka cjevčica bila drugim krajem uronjena u eppendorf tubicu sa 500 μl vode. Kokain se administrirao prema standardnoj proceduri (150L/h, 75 μg , 1 min.). Svaka cjevčica se potom ispirala sa još 500 μl vode. 450 μl otopine se pipetiralo na mikrotitarsku pločicu te se mjerila apsorbancija na spektrofotometru pri 233 nm. Koncentracija droge u pojedinoj tubici se računala iz kalibracijske krivulje. Slika (a) prikazuje količinu kokaina u svakoj cjevčici po redu. Slika (b) prikazuje prosječnu količinu kokaina po svakom redu. (* $p < 0,05$; t-test za nezavisne uzorke).

4.2. Akutni odgovor na volatilizirani kokain i metamfetamin

4.2.1. Akutni odgovor na 75 µg volatiliziranog kokaina

Kako bismo ispitali da li volatilizirani kokain djeluje aktivirajuće na motorički sustav *Drosophila* ispitali smo djelovanje 75 µg kokaina na lokomotornu aktivnost *Drosophila*. Mušicama je administriran volatilizirani kokain u koncentraciji od 75 µg tijekom 1 minute te se putem DAM sustava pratila lokomotorna aktivnost tijekom 30 minuta.

Najznačajniji porast u lokomotornoj aktivnosti vidljiv je u prvih 5 minuta (slika 1. u dodatnim materijalima) nakon izlaganja te potom postepeno opada ka bazičnim vrijednostima (slika 11.). Kokain kod mušica dovodi do značajnog i kratkotrajnog povećanja lokomotorne aktivnosti što je u skladu sa aktivirajućim djelovanjem kokaina na motorički sustav i kratkim poluživotom u kralježnjaka (20).



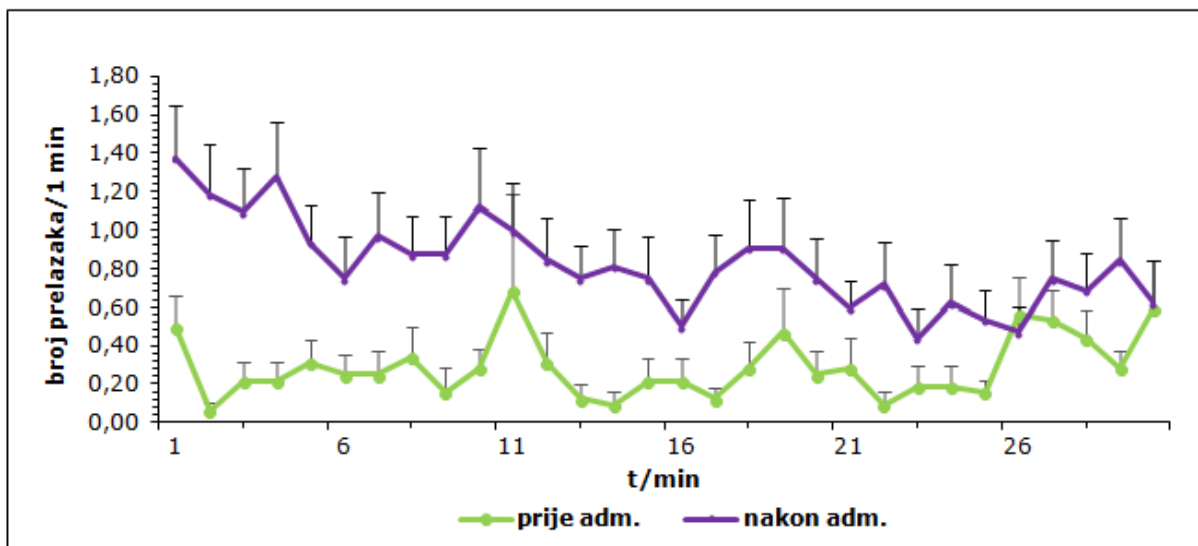
Slika 11. Akutna doza volatiliziranog kokaina značajno i kratkotrajno povećava lokomotornu aktivnost *Drosophila*. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1 minuta) te se promatrao lokomotorni odgovor na aktivirajući učinak droge tijekom 30 min. prije i 30 min. nakon administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

4.2.2. Akutni odgovor na 75 µg volatiliziranog metamfetamina

S obzirom da nikada do sada na *Drosophili* nije ispitivan utjecaj volatiliziranog metamfetamina, interesiralo nas je da li jednako aktivirajuće na motorički sustav *Drosophile* djeluje i volatilizirani metamfetamin. Mušicama je administriran volatilizirani metamfetamin u konc. od 75 µg tijekom 1 minute.

Najznačajniji porast u lokomociji vidljiv je tijekom prvih 10 minuta nakon izlaganja (slika 2. u dodatnim materijalima) te potom postepeno opada no za razliku od kokaina, ostaje povišen u odnosu na bazične vrijednosti lokomocije prije izlaganja (slika 12.).

Metamfetamin pokazuje duže aktivirajuće djelovanje na motorički sustav od kokaina što upućuje na razliku u mehanizmu djelovanja ova dva psihostimulansa te duže vrijeme poluživota u sisavaca (48).



Slika 12. Akutna doza volatiliziranog metamfetamina značajno povećava lokomotornu aktivnost *Drosophile*. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1 minuta) te se promatrao lokomotorni odgovor na aktivirajući učinak droge. Prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 30 min. prije i 30 min. nakon administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

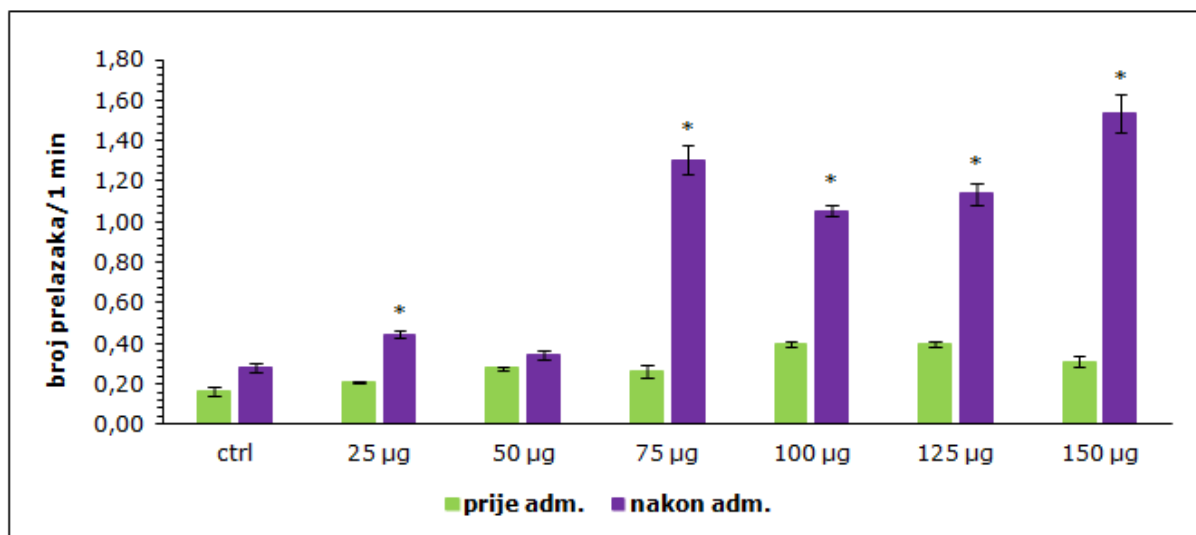
4.2.3. Dozna ovisnost volatiliziranog kokaina na lokomotorni odgovor

Iz literature je poznato da je lokomotorna aktivnost *Drosophila* izazvana volatiliziranim kokainom dozno-ovisna. Mušice izložene niskim koncentracijama (<25 µg) nisu pokazivale abnormalnu lokomociju dok su veće koncentracije (>200 µg) izazivale stereotipna ponašanja. Umjerene koncentracije od 75 – 100 µg inducirale su najširi raspon bihevioralnog odgovora (20). Ispitali smo je li lokomotorna aktivnost *Drosophila* ovisna o koncentraciji kokaina tako što je mušicama administriran kokain u koncentracijama od 25 µg – 150 µg.

Do značajno povećanog lokomotornog odgovora u odnosu na lokomociju prije administracije dolazi pri konc. od 25 µg, 75 µg, 100 µg, 125 µg i 150 µg ($p < 0,05$) (slika 13.).

Minimalna koncentracija pri kojoj dolazi do značajne osjetljivosti na aktivirajuće djelovanje kokaina je 75 µg nakon čega lokomocija dostiže plato što upućuje da više koncentracije izazivaju stereotipna ponašanja (hiperkinetiku, rotaciju, mahanje krilima) (20) koja DAM sustav nije u mogućnosti kvantificirati.

Kako koncentracija od 50 µg ne izaziva promjene u lokomociji, promjena lokomocije pri konc. od 25 µg moguća je uslijed eksperimentalne pogreške.



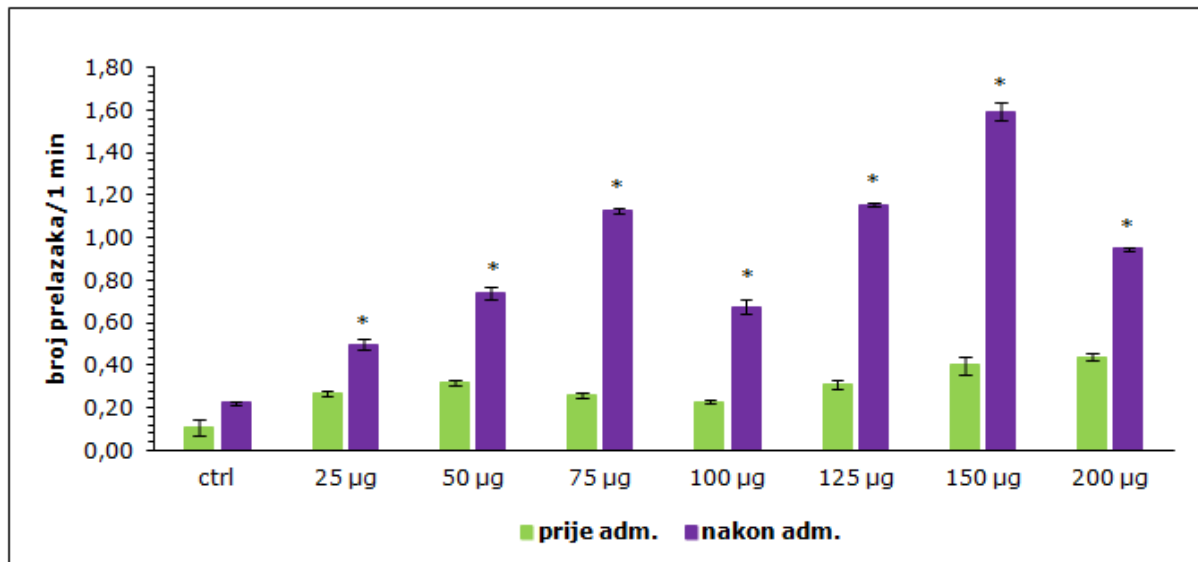
Slika 13 . Minimalna koncentracija kokaina koja izaziva povećani lokomotorni odgovor je 75 µg. Mušicama je administriran volatilizirani kokain tijekom 1 minute u različitim koncentracijama (25 µg – 150 µg) te se pratio lokomotorni odgovor kod *wt* mužjaka starih 5 dana u periodu od 5 minuta prije i 5 min. nakon izlaganja; $n=32$ sa dva ponavljanja po eksperimentu; (* $p < 0,05$; t-test za zavisne uzorke).

4.2.4. Dozna ovisnost volatiliziranog metamfetamina na lokomotorni odgovor

Sljedećim eksperimentom željeli smo ispitati je li lokomotorna aktivnost *Drosophila* ovisna i o koncentraciji metamfetamina. Mušicama je administriran metamfetamin u rasponu od 25 µg – 200 µg.

Pri svim administriranim koncentracijama metamfetamina (slika 14.) dolazi do značajno povećanog lokomotornog odgovora u odnosu na lokomociju prije administracije ($p < 0,05$).

Raspon koncentracija koje izazivaju bihevioralni odgovor veći je nego kod kokaina što indicira da aktivirajući učinak metamfetamina više inducira lokomociju nego stereotipna ponašanja.



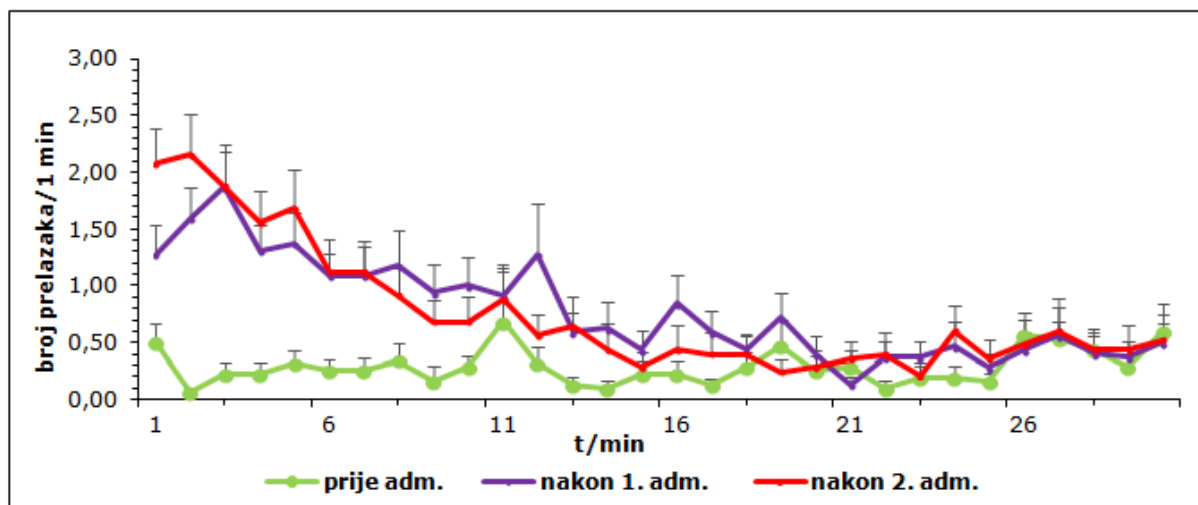
Slika 14. Volatilizirani metamfetamin izaziva dozno-ovisno povećanje lokomotornog odgovora. Lokomotorni odgovor mjereno je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Prikazan je prosječni broj prelazaka mušica sredinom cjevčice u periodu od 10 minuta prije i 10 min. nakon administracije metamfetamina u trajanju od 1 minute, $n=32$ sa dva ponavljanja po eksperimentu; (* $p < 0,05$; t-test za zavisne uzorke)

4.3. Optimizacija uvjeta za postizanje lokomotorne senzitivacije

4.3.1. Optimizacija vremenskog intervala između dvije administracije 75 µg volatiliziranog kokaina

U radu McClung i Hirsh-a, pokazano je da *Drosophila* razvija lokomotornu senzitivaciju na ponovljenu dozu 75 µg volatiliziranog kokaina (20). U ovom eksperimentu ispitivali smo povećanje lokomotornog odgovora na ponovljenu dozu volatiliziranog kokaina odnosno izaziva li psihostimulans lokomotornu senzitivaciju kod mušica. Mušicama je dva puta administriran kokain (konc. 75 µg, 1 min.) u razmaku od 6h.

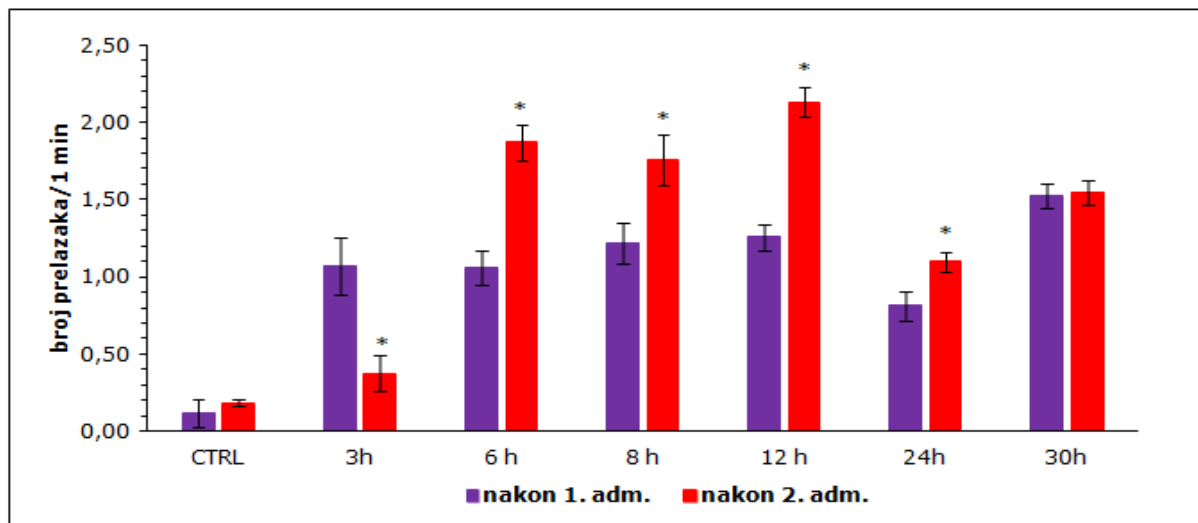
Najznačajniji porast u lokomotornoj aktivnosti u odnosu na akutni odgovor, vidljiv je u prvih 5 minuta (slika 3. u dodatnim materijalima) nakon druge administracije te potom opada ka bazičnim vrijednostima i akutnom odgovoru (slika 15.). Rezultati pokazuju da je naša platforma prikladna za induciranje i kvantifikaciju lokomotorne senzitivacije na kokain u *Drosophile*.



Slika 15. Ponovljena doza volatiliziranog kokaina inducira lokomotornu senzitivaciju u *Drosophile*. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1 minuta). Vremenski period između administracija je 6h. Prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 30 min. nakon prve i druge administracije 75 µg kokaina u odnosu na 30 min. prije obje administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

Sljedeće što smo ispitivali jest u kojem vremenskom intervalu između administracija volatilizirani kokain izaziva lokomotornu senzitivaciju te da li se naši podaci slažu sa rezultatima McClung i Hirsha-a. U tom istraživanju na *Drosophili*, pokazana je značajna senzitivacija u vremenskom intervalu od 6h koja perzistira na značajnoj razini pri intervalima od 24h između administracija (20). Mušice su izložene kokainu prema standardnom protokolu (75 µg, 1 min) u vremenskim razmacima od 3-30h.

Ponovljeno izlaganje mušica 75 µg volatiliziranom kokainu izazvalo je značajnu lokomotornu senzitivaciju u intervalima od 6,8,12 i 24 h (slika 16.) u odnosu na prvu administraciju ($p < 0,05$). 3h nakon prve administracije dolazi do značajnog smanjenja lokomocije ($p < 0,05$). Naši dobiveni podaci o lokomotornoj senzitivaciji u skladu su sa publiciranim rezultatima i pokazuju da je razvoj senzitivacije na psihostimulanse ovisan o vremenskom intervalu između doza te da su promjene u mozgu u odgovoru na kokain dugotrajne.

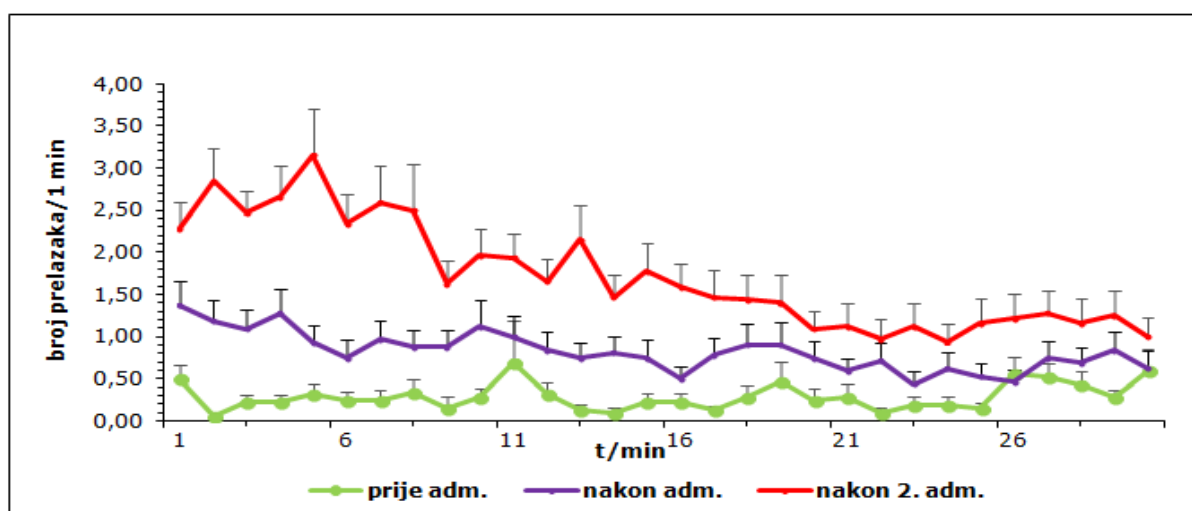


Slika 16: Najkraći vremenski interval nakon kojeg dolazi do lokomotorne senzitivacije na kokain je 6h. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1 minuta) u vremenskim razmacima od 3-30h. Prikazan je prosječni broj prelazaka mušica sredinom cjevčice u periodu od 5 min. nakon prve i 5 min. nakon druge administracije; $n=32$ sa dva ponavljanja po eksperimentu; (* $p < 0,05$; t-test za zavisne uzorke).

4.3.2. Optimizacija vremenskog intervala između dvije administracije 75 μg volatiliziranog metamfetamina

Sljedećim eksperimentom pokušali smo našom platformom inducirati lokomotornu senzitivaciju i na volatilizirani metamfetamin s obzirom da takvo ispitivanje na mušicama nikada do sada nije provedeno već su se samo ispitivale posljedice oralne administracije (10). Mušicama je administriran metamfetamin (konc. 75 μg , 1 min.) 12 h nakon prve administracije.

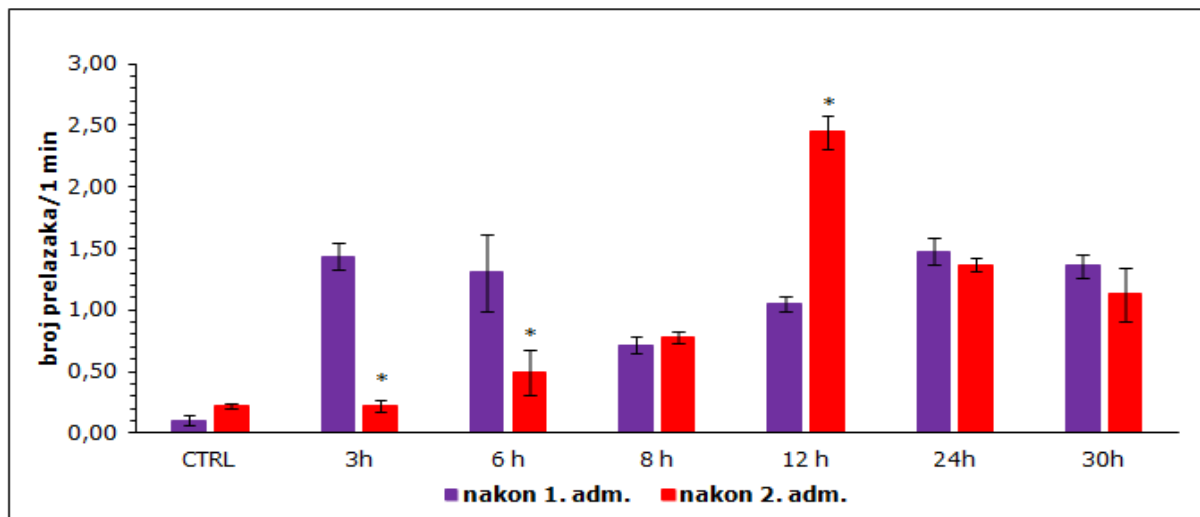
Najznačajniji porast lokomotorne aktivnosti je u prvih 10 minuta nakon izlaganja metamfetamina u odnosu na akutni odgovor (slika 4. u dodatnim materijalima) te potom opada ali za razliku od kokaina, razina aktivnosti ostaje značajno povišena tijekom 30 minuta u odnosu na razinu lokomocije nakon prve administracije (slika 17.). Rezultati upućuju da je platforma prikladna za induciranje i kvantifikaciju lokomotorne senzitivacije i na metamfetamin u *Drosophila*.



Slika 17. Ponovljena doza volatiliziranog metamfetamina značajno inducira lokomotornu senzitivaciju u *Drosophila*. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *w^t* mužjaka starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μg , 1 minuta). Vremenski period između administracija je 12h. Prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 30 min. nakon prve i druge administracije 75 μg kokaina u odnosu na 30 min. prije obje administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

Sljedeće što smo željeli ispitati jest u kojem vremenskom intervalu između administracija volatilizirani metamfetamin izaziva lokomotornu senzitivaciju. Mušice su izložene metamfetaminu prema standardnom protokolu (75 µg, 1 min) u vremenskim razmacima od 3-30h.

Jedini vremenski interval unutar kojeg volatilizirani metamfetamin izaziva lokomotornu senzitivaciju je 12 h ($p < 0,05$) (slika 18.). Ponovljeno izlaganje od 3 i 6 h nakon prve administracije izaziva značajno smanjenje lokomocije ($p < 0,05$). Za razliku od kokaina koji inducira senzitivaciju već nakon 6h, razvoj senzitivacije na metamfetamin značajno ovisi o vremenskom intervalu između doza. Metamfetamin pokazuje značajnije aktivirajuće djelovanje tek nakon 12h što upućuje na različitost farmakokinetike i farmakodinamike ova dva psihostimulansa u sisavaca.



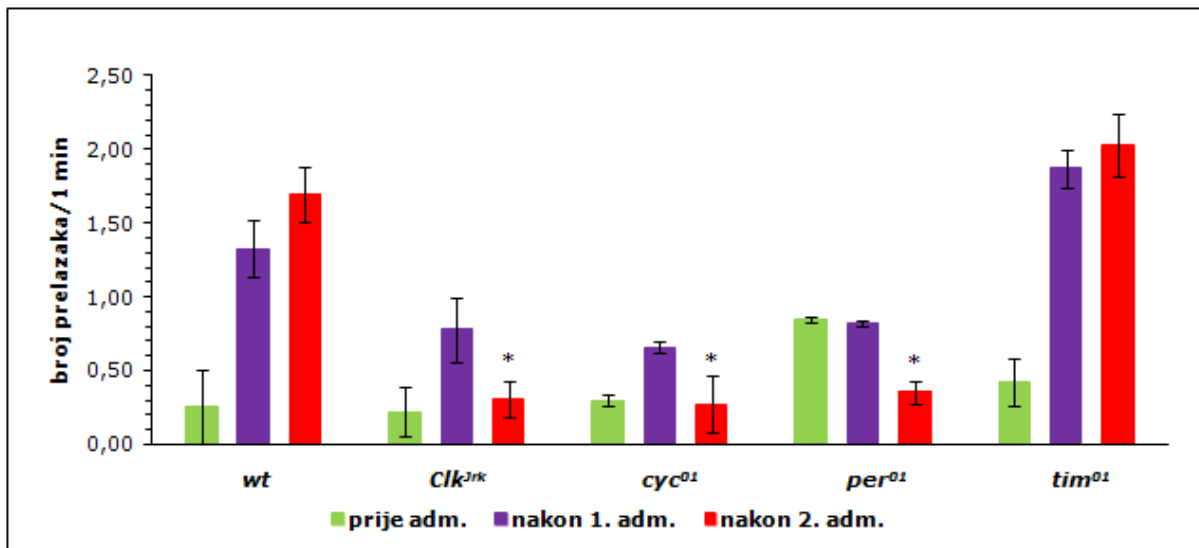
Slika 18: Vremenski interval nakon kojeg dolazi do lokomotorne senzitivacije na metamfetamin je 12 h. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1 minuta) u vremenskim razmacima od 3-30h. Prikazan je prosječni broj prelazaka mušica sredinom cjevčice u periodu od 10 min. nakon prve i 10 min. nakon druge administracije 75 µg metamfetamina u trajanju od 1 minute; $n=32$ sa dva ponavljanja po eksperimentu. ($*p < 0,05$; t-test za zavisne uzorke).

4.4. Genetski utjecaj na lokomotornu senzitivaciju na kokain i metamfetamin

4.4.1. Lokomotorna senzitivacija cirkadijalnih mutanata na 75 µg kokaina

U prijašnjoj studiji, istraživalo se da li mutanti u cirkadijalnim genima *Drosophila* razvijaju senzitivaciju na kokain. Pokazano je da se *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹* i *cyc⁰¹* mutanti ne senzitiviraju na ponovljeno izlaganje kokainu, dok se *tim⁰¹* mutant normalno senzitivira poput *wt* (29). Kako bi validirali da naša platforma mjeri istu vrstu bihevioralnog fenomena kod cirkadijalnih mutanata kao i prethodno publicirana metoda, testirali smo da li administracija kokaina mijenja lokomotornu aktivnost mutanata *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹*. Mušicama je administriran kokain po standardnom protokolu (75 µg, 1 min., 6h). Lokomotorna aktivnost mutanata analizirana je na populacijskom i individualnom nivou. Populacijska analiza uključivala je prosječni broj prelazaka cjevčice pojedine grupe mušica u intervalu od 5 min. nakon svake administracije psihostimulansa.

Na populacijskom nivou *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanti osjetljivi su na akutnu dozu kokaina jer povećavaju aktivnost u odnosu na razinu aktivnosti prije administracije. U odnosu na *wt*, osjetljivost *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanata je smanjena, no ne značajno ($p > 0,05$; one-way ANOVA). Nakon druge administracije *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* imaju značajno smanjenu količinu lokomocije u usporedbi sa *wt* ($p < 0,05$; one-way ANOVA, post-hoc Tukey's test), a između *tim⁰¹* mutanata i *wt* nema razlike ($p > 0,05$) (slika 19.). Dobiveni podatci slažu se sa publiciranim rezultatima na cirkadijalnim mutantima *Drosophila* te upućuju da je naša platforma prikladna za induciranje iste vrste bihevioralnog odgovora kod mutanata. Obzirom da se *tim⁰¹* mutant normalno senzitivira, to sugerira da funkcija cirkadijalnih gena u regulaciji cirkadijalnog ritma i senzitivacije na kokain uključuje različite molekularne mehanizme (29).



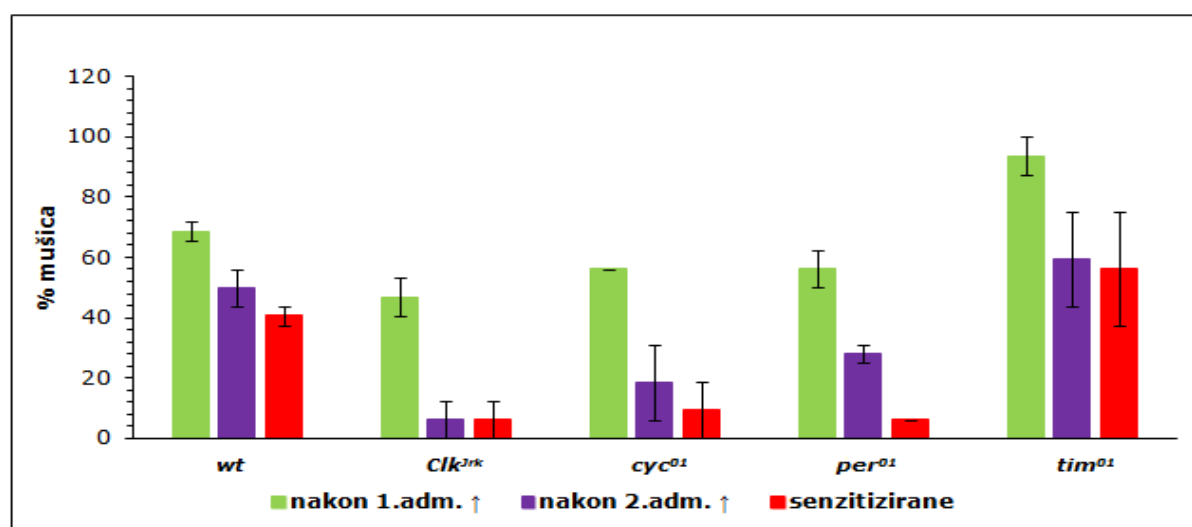
Slika 19: Druga administracija kokaina ne izaziva lokomotornu senzitivaciju kod mutanata *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹*. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 6h. Pratila se populacijska lokomotorna aktivnost u periodu od 5 min. nakon prve i 5 min. nakon druge administracije; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu. (*p<0,05 u usporedbi s wt; one-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test).

Sljedeću analizu lokomocije mutanata proveli smo i na individualnoj razini. Analiza individualnog odgovora uključivala je više kriterija. Nakon svake administracije, uzimala se lokomotorna aktivnost pojedine mušice u periodu od 5 min. budući da su u tom intervalu mušice pokazale povećanje lokomocije na 1-minutno izlaganje 75 µg kokaina. Postotak mušica koje su imale povećani lokomotorni odgovor nakon prve administracije u odnosu na bazične vrijednosti definirao je osjetljivost mušica na aktivirajući učinak kokaina. Postotak mušica koje su dodatno povećale aktivnost nakon druge administracije u odnosu na prvu definirao je lokomotornu senzitivaciju mušica. Zbog malog broja eksperimenata rezultati su zahtijevali samo deskriptivnu obradu.

Na individualnom nivou cirkadijalni mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na kokain (slika 20.). Osjetljivost *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanata slična je kao i kod wt (slika 5. u dodatnim materijalima), no odgovor im je značajno smanjen na drugu akutnu dozu (slika 6. u dodatnim materijalima) volatiliziranog kokaina u odnosu na wt dok *tim⁰¹* mutant reagira poput wt. U konačnici, broj mušica koje povećavaju odgovor nakon prve i ponovno nakon druge administracije je znatno smanjen, tj. ne postižu lokomotornu senzitivaciju.

Broj senzitiviranih *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanata je manji u odnosu na *wt* i *tim⁰¹* mutante (slika 7. u dodatnim materijalima). Prednost naše platforme je da uvodeći nove kriterije može objektivno mjeriti lokomotiju na individualnom nivou kvantificiranjem senzitiviranih mušica.

Rezultati su u skladu sa populacijskom analizom i prethodno publiciranom studijom gdje se *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanti nisu senzitivirali na volatilizirani kokain (29).



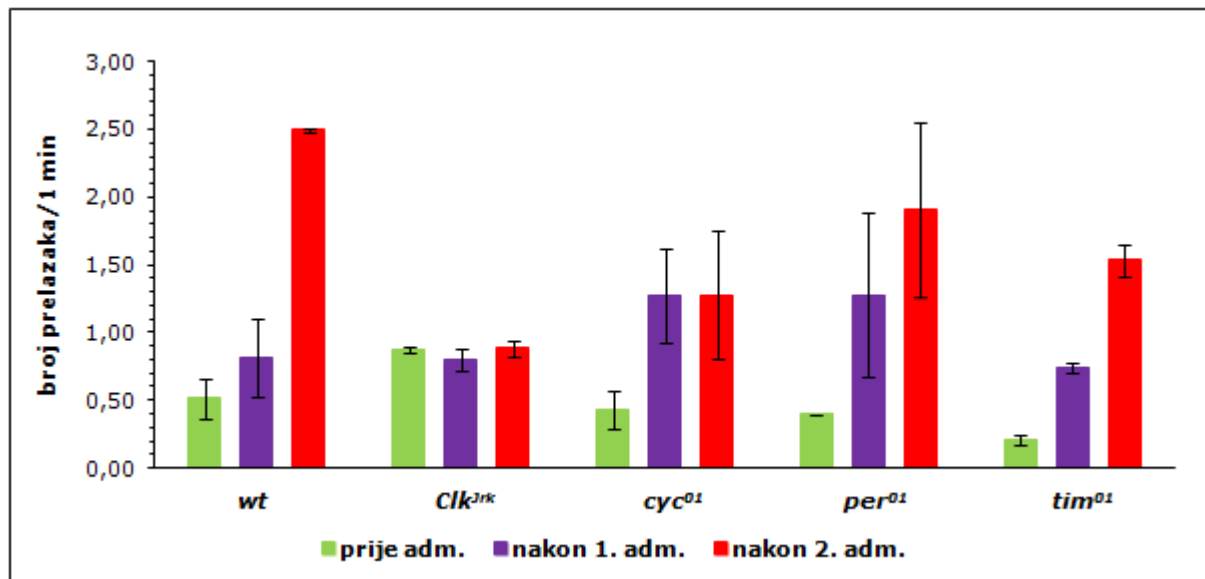
Slika 20: *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani kokain. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *ClkJrk*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 6h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su pokazale osjetljivost u periodu od 5 min. nakon prve i nakon druge administracije 75 µg kokaina te % senzitiviranih mušica (one koje su dodatnim povećanjem lokomocije odgovorile na drugu administraciju u odnosu na prvu); n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

4.4.2. Lokomotorna senzitivacija cirkadijalnih mutanata na 75 µg metamfetamina

Kako bi ispitali aktivirajući učinak metamfetamina na cirkadijalne mutante, isti eksperiment smo ponovili i sa volatiliziranim metamfetaminom. Mušicama je administriran metamfetamin po standardnom protokolu (75 µg, 1 min., 10 h) te je analiza provedena na populacijskom i individualnom nivou u periodu od 10 min.

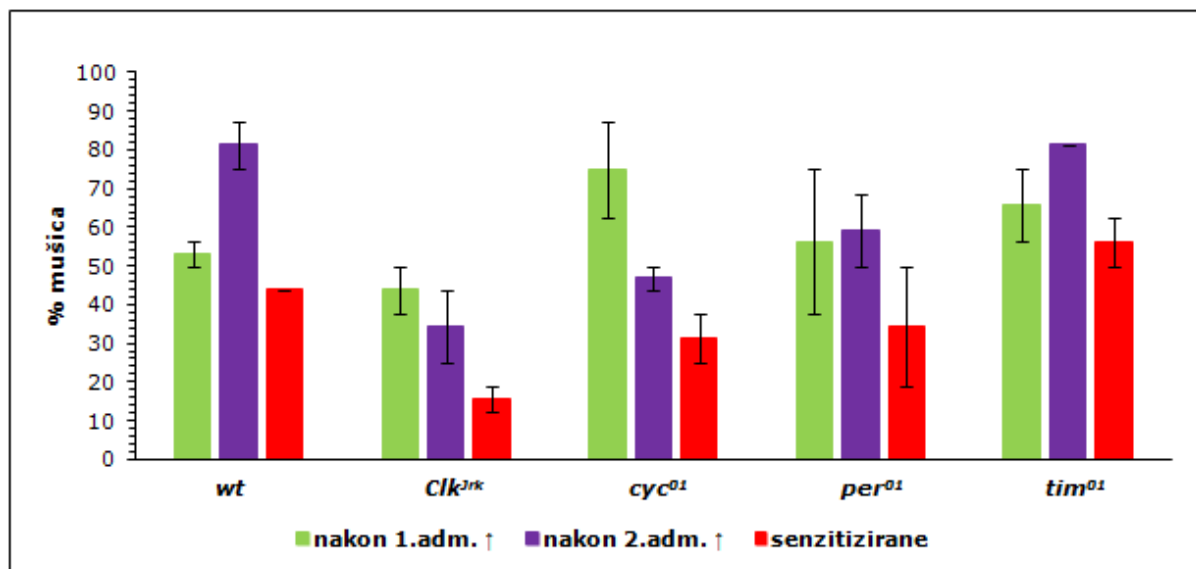
Na populacijskom nivou *cyc⁰¹*, *Per⁰¹* i *tim⁰¹* mutanti pokazuju osjetljivost na akutnu dozu metamfetamina jer povećavaju aktivnost u odnosu na aktivnost prije administracije, no ne postoji značajna razlika u odnosu na *wt* ($p > 0,05$ one-way ANOVA). *Clk^{Jrk}* mutant ne pokazuje osjetljivost na akutnu dozu.

Nakon druge administracije ne postoje značajne razlike u lokomociji među grupama ($p > 0,05$ Tukey's test), no *Clk^{Jrk}* i *cyc⁰¹* mutanti se ne senzitiviraju jer je lokomotorni odgovor na prvu i drugu administraciju jednak (slika 21.). *Tim⁰¹* mutanti pokazuju senzitivaciju poput *wt*. Rezultati populacije sugeriraju da bi u regulaciji razvoja lokomotorne senzitivacije na metamfetamin mogli sudjelovati različiti cirkadijalni geni od onih koji reguliraju senzitivaciju na kokain.



Slika 21: *Clk^{Jrk}* i *cyc⁰¹* mutanti ne pokazuju senzitivaciju na drugu dozu volatiliziranog metamfetamina. Lokomotorna aktivnost mjerena je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Vremenski interval između administracija je 10h. Pratila se populacijska lokomotorna aktivnost u periodu od 10 min. nakon prve i 10 min. nakon druge administracije; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu. (* $p < 0,05$ u usporedbi s *wt*; one-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test).

Na individualnoj razini Clk^{Jrk} mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na metamfetamin (slika 22.). Nakon prve akutne doze svi mutanti su podjednako osjetljivi na metamfetamin kao i wt (slika 8. u dodatnim materijalima). Clk^{Jrk} , cyc^{01} i per^{01} mutanti pokazuju smanjenu osjetljivost na drugu akutnu dozu s obzirom na prvu administraciju i u odnosu na wt (slika 9. u dodatnim materijalima). U konačnici, broj senzitiviranih Clk^{Jrk} mutanata značajno je manji u odnosu na wt (slika 10. u dodatnim materijalima). Platforma je prikladna za induciranje bihevioralnog odgovora cirkadijalnih mutanata i na metamfetamin. Rezultati individualne analize u skladu su sa populacijskom te sugeriraju da bi u regulaciji razvoja lokomotorne senzitivacije na metamfetamin mogao sudjelovati različit set cirkadijalnih gena od onog koji sudjeluje u regulaciji senzitivacije na kokain.



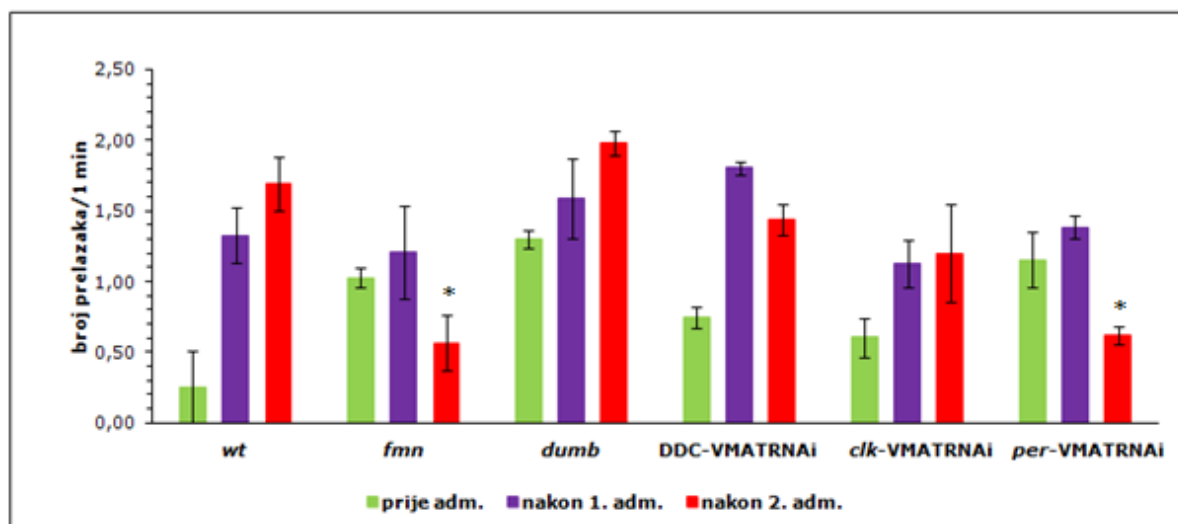
Slika 22: Clk^{Jrk} mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani metamfetamin. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod Clk^{Jrk} , per^{01} , cyc^{01} i tim^{01} mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Vremenski interval između administracija je 10h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su pokazale osjetljivost u periodu od 10 min. nakon prve i nakon druge administracije 75 μ g metamfetamina te % senzitiviranih mušica (one koje su dodatnim povećanjem lokomocije odgovorile na drugu administraciju u odnosu na prvu); n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

4.4.3. Lokomotorna senzitivizacija mutanata dopaminske transmisije na 75 µg kokaina

Kako bi ispitali da li osim cirkadijalnih gena u regulaciji lokomotorne senzitivizacije na kokain posreduje i dopaminska modulacija, testirali smo učinak kokaina na mutante u dopaminskom sustavu *Drosophila*. Koristili smo mutante u dopaminskom transporteru - DAT (*fumin*), dopaminskom receptoru tipa 1 - DopR1 (*dumb*), te mutante inaktivnog VMAT u Dopa dekarboksilaza, *per* i *Clk* pozitivnim neuronima. Mutanti *Drosophila* i glodavaca pokazuju bihevioralne abnormalnosti koje su u skladu sa poremećenom dopaminergičnom transmisijom u živčanom sustavu. Primjerice, DAT mutanti mušica pokazuju drastično povećanje aktivnosti i povećanu budnost (18) dok izlaganje DAT mutiranih miševa kokainu nije izazvalo porast lokomocije (19). Isto tako, miševi bez funkcionalnog DopR1 nisu pokazali lokomotornu hiperaktivnost nakon tretmana kokainom (16).

Heterozigotni VMAT mutanti *Drosophila* pokazuju povećanje lokomocije dok kod homozigota kokain nije promijenio motoričko ponašanje (13). Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (75 µg, 1 min., 6h) te je lokomotorna aktivnost analizirana je na populacijskoj i individualnoj razini.

Na populacijskom nivou svi sojevi osim *fmn*, *dumb* i *per*-VMATRNAi mutanata pokazuju osjetljivost na akutnu dozu kokaina. Nakon druge administracije mutanti *fmn* i *per*-VMATRNAi imaju značajno smanjenu količinu lokomocije u usporedbi sa *wt* mušicama ($p < 0,05$ one-way ANOVA, post-hoc Tukey's test), dok se *dumb* mutanti normalno senzitiviziraju. Nedostatak senzitivizacije nakon druge administracije uočava se i kod DDC i *Clk*-VMATRNAi mutanata jer pokazuju nižu odnosno istu razinu lokomocije u odnosu na aktivnost nakon prve administracije (slika 23.). U konačnici, rezultati pokazuju da se na kokain lokomotorno ne senzitiviziraju *fmn* mutanti i svi mutanti u vezikularnom monoaminskom transporteru.

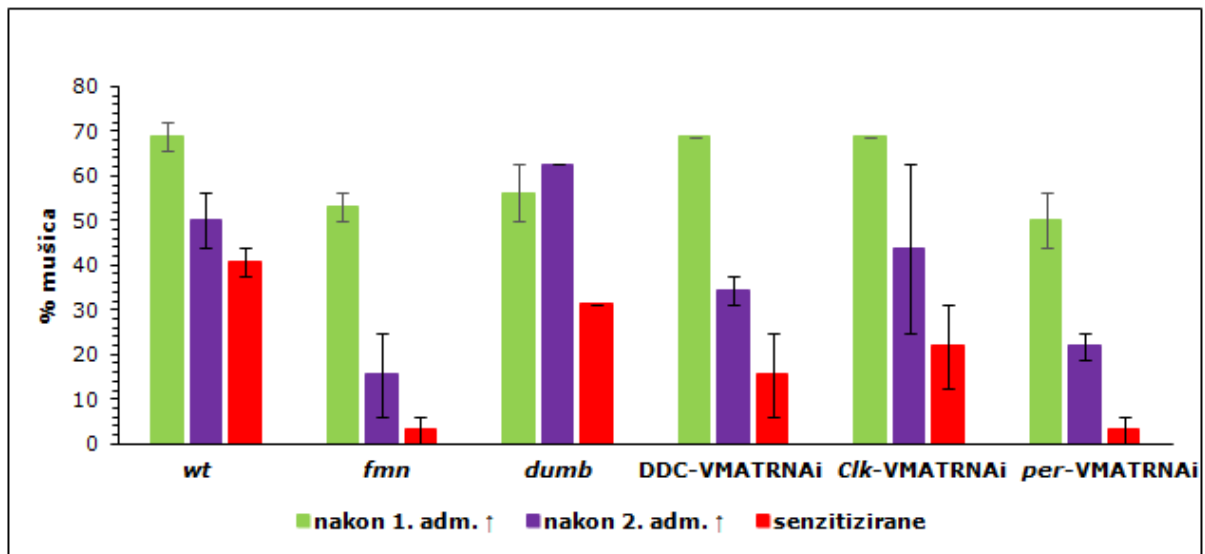


Slika 23: Druga administracija kokaina ne izaziva lokomotornu senzitivaciju kod *fmn*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* mutanata. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *fmn*, *dumb*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Vremenski interval između administracija je 6h. Pratila se populacijska lokomotorna aktivnost u periodu od 5 min. nakon prve i 5 min. nakon druge administracije; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu. (* $p < 0,05$ u usporedbi s *wt*; one-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test).

Na individualnom nivou *fmn* i *per-VMATRNAi* mutanti ne pokazuju razinu lokomotorne senzitivacije na kokain kao *wt* (slika 24.). Na prvu akutnu dozu kokaina, svi sojevi pokazuju podjednaku osjetljivost (slika 11. u dodatnim materijalima). *Fmn*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* mutanti imaju smanjenu osjetljivost na drugu akutnu dozu (slika 12. u dodatnim materijalima) kokaina, no u konačnici, broj senzitiviranih *fmn* i *per-VMATRNAi* mutanata je znatno manji u odnosu na *wt* (slika 13. u dodatnim materijalima). Dok *dumb* mutanti pokazuju senzitivaciju, za *DDC* i *Clk-VMATRNAi* mutante bi trebalo provesti više eksperimenata da bi se senzitivacija potvrdila.

Rezultati individualne analize su donekle u skladu sa populacijskom jer potvrđuju da su u regulaciji razvoja senzitivacije na kokain važni dopaminski transporter i vezikularni transporter monoamina u cirkadijalnim *per* neuronima. Moguća je uloga i u *Clk* i dopaminskim neuronima, no treba potvrditi daljnjim eksperimentima. Dakle, za razvoj senzitivacije važna je lokacijska povezanost VMAT transportera sa neuronima koji diktiraju cirkadijalni ritam. Rezultati su u skladu sa prijašnjim studijama na DAT mutiranim miševima (19) te VMAT mutantima *Drosophila* (13) ali nisu u skladu sa studijama na DopR1 mutiranim

miševima koji nakon izlaganja kokainu nisu pokazivali hiperaktivnost (16) dok su *dumb* mutanti pokazali senzitivaciju na kokain.

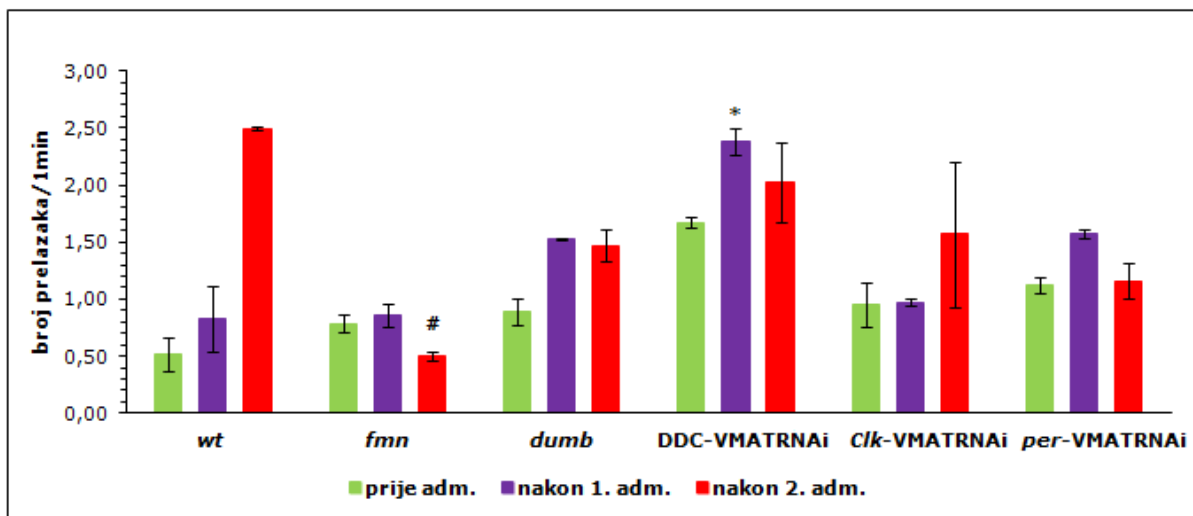


Slika 24: Mutanti *fmn* i *per*-VMATRNAi se lokomotorno ne senzitiviraju na volatilizirani kokain. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 6h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećani lokomotorni odgovor u periodu od 5 min. nakon prve i nakon druge administracije 75 µg kokaina te % senzitiviranih mušica (one koje su povećanjem lokomocije odgovorile nakon obje administracije); n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

4.4.4. Lokomotorna senzitivacija mutanata dopaminske transmisije na 75 µg metamfetamina

Poznato je da su *fmn* i *dumb* mutanti *Drosophila* rezistentni na oralno administrirani aktivirajući učinak metamfetamina (15) kao i DAT mutirani miševi (19). U jednoj studiji mušicama je preekspimiran VMAT samo u dopaminskim neuronima te su nakon izlaganja amfetaminu imale veću lokomociju nego *wt* (14) što je sugeriralo da je uloga VMAT i dopamina važna za učinak amfetamina. Ispitali smo utjecaj volatiliziranog metamfetamina (75 µg, 1 min., 10h) na *fmn*, *dumb*, DDC-VMATRNAi, *Clk*-VMATRNAi i *per*-VMATRNAi mutantima i proveli analizu lokomocije na populaciji i individualno.

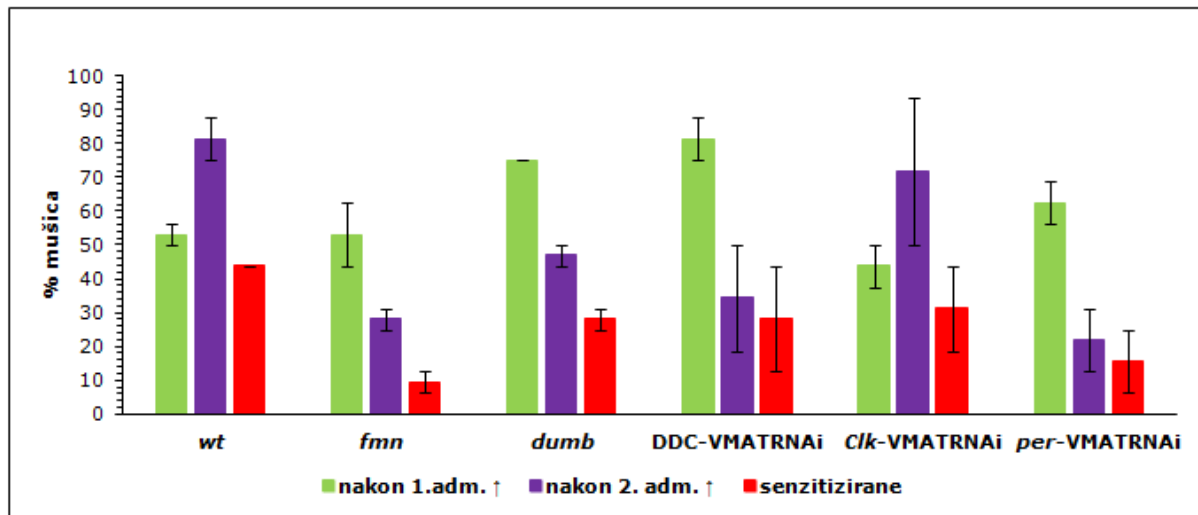
Populacijski, DDC-VMATRNAi mutanti značajno su osjetljivi na akutnu dozu metamfetamina u odnosu na *wt* ($p < 0,05$ one-way ANOVA, post-hoc Tukey's test). No, osjetljivost na akutnu dozu metamfetamina ne pokazuju *fmn* i *Clk*-VMATRNAi mutanti. Nakon druge administracije *fmn* mutanti imaju značajno smanjenu lokomociju u usporedbi sa *wt* ($p < 0,05$ post-hoc Tukey's test), no i mutanti *dumb*, DDC-VMATRNAi i *per*-VMATRNAi ne pokazuju senzitivaciju nakon druge administracije u odnosu na prvu (slika 25.). Za *Clk*-VMATRNAi mutante trebalo bi provesti još eksperimenata da se potvrdi povećanje lokomocije.



Slika 25: Metamfetamin ne izaziva lokomotornu senzitivaciju kod *fmn*, *dumb*, DDC i *per*-VMATRNAi mutanata. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Vremenski interval između administracija je 10h. Pratila se populacijska lokomotorna aktivnost u periodu od 10 min. nakon prve i 10 min. nakon druge administracije; $n=16$ sa dva ponavljanja po eksperimentu. (* $p < 0,05$ u usporedbi s *wt* 1.adm., # $p < 0,05$ u uporedbi s *wt* 2.adm.; one-way ANOVA, post-hoc Tukey's multiple comparison test).

Na individualnom nivou *fmn* i *per*-VMATRNAi mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na metamfetamin kao *wt* (slika 26.). Na prvu akutnu dozu svi mutanti podjednako pokazuju razinu osjetljivosti (slika 14. u dodatnim materijalima). *Fmn*, *dumb*, DDC i *per*-VMATRNAi mutanti odgovaraju smanjenom osjetljivošću na drugu akutnu dozu metamfetamina (slika 15. u dodatnim materijalima). Na koncu, najmanje su se senzitivirali *fmn* i *per*-VMATRNAi mutanti u odnosu na *wt* (slika 16. u dodatnim materijalima). Za potvrdu senzitivacije u *dumb*, DDC i *Clk*-VMATRNAi mutanata treba provesti više eksperimenata.

Rezultati naših analiza slažu se donekle sa prethodnim studijama na *fmn* i *dumb* (15) i VMAT mutantima *Drosophila* (14) kao i DAT mutiranim miševima koji nisu pokazivali aktivirajući učinak metamfetamina. Dosadašnje analize sugeriraju kako bi ključnu ulogu u senzitivaciji na oba psihostimulansa mogli imati DAT i VMAT te da je za razvoj senzitivacije važna povezanost dopaminergične transmisije i cirkadijalnih neurona.



Slika 26: *Fmn* i *per*-VMATRNAi mutanti ne razvijaju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani metamfetamin. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 10h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećani lokomotorni odgovor u periodu od 10 min. nakon prve i nakon druge administracije 75 µg metamfetamina te % senzitiviranih mušica (one koje su povećanjem lokomocije odgovorile nakon obje administracije); n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

5. RASPRAVA

Ovisnost kao kronični poremećaj karakteriziraju psihopatološki obrasci ponašanja koji uključuju nekontroliranu žudnju i kompulzivnu zlouporabu psihostimulansa (1). Psihostimulansi djeluju aktivirajuće na motoričke sposobnosti a kokain i amfetamini korišteni su u većini studija o drogom induciranim stimulativnim učincima. U laboratorijskih životinja senzitivacija se ispitala u vidu bihevioralnog fenotipa nakon ponovljene administracije psihostimulansa koja se manifestirala kao postepeno progresivno povećanje lokomotornog odgovora (26). Dosadašnje metode praćenja posljedica volatiliziranog psihostimulansa na motoričku aktivnost *Drosophila* vremenski su bile zahtjevne, subjektivne, zahtijevale su kompleksnu manipulaciju životinjama, mjerile su samo akutni odgovor te nisu bile visokoprotodne za genetski probir (36).

Stoga je naš prvi cilj bio konstruirati platformu koja će zahtijevati manje manipuliranje životinjama, biti visokoprotodna i reproducibilna te koja će kvantitativno i objektivno mjeriti akutni učinak psihostimulansa i lokomotornu senzitivaciju na populacijskoj i individualnoj razini.

Metodu smo optimizirali mjerenjem vremena izlaganja mušica vrućem zraku i analizom distribucije droge u pojedinoj cjevčici. Obzirom da se mušicama droga administrira u obliku aerosola, bilo je potrebno utvrditi optimalno vrijeme izlaganja da u kasnijim eksperimentima eliminiramo utjecaj zraka na promjenu u lokomociji. Optimalno vrijeme izlaganja je 1 minuta jer nije došlo do povećanja lokomocije u odnosu na lokomotornu aktivnost prije izlaganja vrućem zraku. Iz literature je poznato da kratkotrajni šok stimulansi (eng. *startle*) (46) i izlaganje višim temperaturama (eng. *heat shock*) (47) povećavaju lokomotorni odgovor, stoga rezultati upućuju da je zbog "Startle" efekta pri kraćim (10-45 sek.) i osjetljivosti na vrućinu pri dužim (3-7 min.) mlazovima zraka došlo do povećanja lokomocije. Analizom koncentracije droge u svakoj cjevčici utvrđeno je da je distribucija droge u svakom redu homogena.

U dosadašnjim ispitivanjima na glodavcima utvrđeno je da pokazuju osjetljivost nakon samo jedne administracije kokaina (49) i metamfetamina (50). Stoga smo ispitali je li jednominutno izlaganje 75 µg volatiliziranom kokainu i metamfetaminu jednako aktivirajuće na motorički sustav *Drosophila*. Rezultati pokazuju da je najznačajniji porast kokainom inducirane lokomocije vidljiv u prvih 5 minuta te potom postepeno opada što je u skladu sa prijašnjim rezultatima da izlaganje kokainu tijekom 1 minute kod mušica dovodi do akutnog i kratkotrajnog povećanja lokomotorne aktivnosti (20). Rezultati ukazuju na sličnost aktivirajućeg djelovanja na motorički sustav u glodavaca i kratkog poluživota (do 90 min.) u kralježnjaka (20). Najznačajniji porast metamfetaminom inducirane lokomocije opažen je tijekom prvih 10 minuta nakon izlaganja, potom postepeno opada ali za razliku od kokaina, ostaje povišena u odnosu na razinu lokomocije prije izlaganja, što je viđeno i na miševima (50). Rezultati ukazuju na duže aktivirajuće djelovanje u odnosu na kokain što ide u prilog razlici mehanizma djelovanja ova dva psihostimulansa. Za razliku od kokaina koji inhibira reapsorpciju dopamina na nivou dopaminskog transportera, metamfetamin na nivou neurona ima dvojak mehanizam djelovanja tako što ulazi u stanicu te vežući se na VMAT ometa vezikularno skladištenje dopamina povećavajući koncentraciju dopamina u stanici. Reverznim transportom putem DAT-a dodatno pojačava efluks dopamina iz stanice (21). Rezultati upućuju i na duži poluživot od kokaina u sisavaca. U istraživanju na štakorima utvrđena je sličnost farmakokinetike metamfetamina u ljudi i glodavaca, pokazano je da je poluživot metamfetamina u plazmi 10-12 h (51).

U glodavaca, akutno izlaganje volatiliziranom kokainu inducira dozno - ovisan raspon ponašanja, od povećane spontane lokomocije do ekspresije stereotipnog ponašanja (36). U prijašnjoj studiji utvrđeno je da je kokainom inducirana lokomotorna aktivnost *Drosophila* dozno-ovisna. Niske koncentracije (<25 µg) nisu izazivale abnormalnu lokomociju dok su veće koncentracije (>200 µg) izazivale akineziju, tremor i smrt. Umjerene koncentracije od 75 - 100 µg inducirale su najširi raspon bihevioralnog odgovora (20). Naši rezultati pokazuju kako je minimalna koncentracija pri kojoj dolazi do značajne kokainom inducirane osjetljivosti 75 µg nakon čega lokomocija dostiže plato što sugerira da više koncentracije (100 - 150 µg) izazivaju kod mušica stereotipna ponašanja (hiperkinetiku, rotaciju, mahanje krilima) (20) koja DAM sustav nije u mogućnosti

kvantificirati. U miševa (50) i štakora (51) pokazano je da povećanje doze metamfetamina rezultira progresivnim povećanjem lokomotorne aktivacije. Naši rezultati na *Drosophila* pokazuju da je raspon koncentracija metamfetamina koje izazivaju bihevioralni odgovor (25 – 200 µg) značajno veći nego kod kokaina (75 – 150 µg) što indicira da aktivirajući učinak metamfetamina više inducira lokomociju nego stereotipna ponašanja.

McClung i Hirsh (20) pokazali su da *Drosophila* razvija značajnu lokomotornu senzitivaciju na ponovljenu dozu 75 µg volatiliranog kokaina u intervalu od 6h koja perzistira i pri intervalima od 24 h. Nakon ponovljene administracije kokaina, najznačajniji porast u lokomociji vidljiv je u prvih 5 min. u odnosu na akutni odgovor. Naši rezultati slažu se sa publiciranim jer pokazuju da mušice razvijaju senzitivaciju na kokain u vremenskim intervalima od 6,8,12 i 24 h što govori da su neuroplastične promjene u mozgu u odgovoru na kokain dugotrajne. Studijom na miševima pokazano je da opetovanom administracijom metamfetamina razvijaju bihevioralnu senzitivaciju (50). Obzirom da takvo istraživanje nije publicirano na *Drosophila* zanimalo nas je razvija li mušica senzitivaciju na metamfetamin i u kojem vremenskom intervalu. Najznačajniji porast u metamfetaminom induciranoj lokomociji opažen je u prvih 10 minuta te za razliku od kokaina ostaje povišena tijekom 30 minuta u odnosu na akutni odgovor. Metamfetamin pokazuje značajnije aktivirajuće djelovanje na motorički sustav tek nakon 12h što je u skladu sa studijom na štakorima gdje su simulirali ljudsku farmakokinetiku metamfetamina koja potvrđuje da je poluživot metamfetamina u organizmu 12 h (51). Rezultati indiciraju značajnu različitost farmakokinetike i farmakodinamike ova dva psihostimulansa u sisavaca i potvrđuju da je naša platforma prikladna za induciranje i kvantifikaciju lokomotorne senzitivacije na psihostimulanse u *Drosophila*.

Poremećaji u cirkadijalnom ritmu i genima mogu utjecati na progresiju ovisnosti te su studije na životinjama pokazale povezanost ovisnosti i cirkadijalnih gena (25). Miševi bez mPer1 funkcionalnog gena nisu pokazivali senzitivizaciju na ponovljenu dozu kokaina (30). U studiji na *Drosophili* ispitala se povezanost cirkadijalnih gena i razvoja senzitivizacije na kokain (29). Pokazano je da se *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹* i *cyc⁰¹* mutanti ne senzitiviraju na ponovljeno izlaganje kokainu, dok se *tim⁰¹* mutant normalno senzitivizira poput *wt*. Željeli smo ispitati da li administracija kokaina i metamfetamina izaziva lokomotornu senzitivizaciju cirkadijalnih mutanata *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* te smo ju analizirali na populacijskom i individualnom nivou. Rezultati populacijske analize pokazuju da nakon druge administracije kokaina *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹* i *cyc⁰¹* mutanti imaju značajno sniženu lokomotivaciju dok se *tim⁰¹* senzitivizirao. Time smo potvrdili rezultate prethodne studije da se *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹* i *cyc⁰¹* mutanti *Drosophile* ne senzitiviraju na volatilizirani kokain (29). Na individualnom nivou uočava se trend smanjenog broja senzitiviziranih *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹* i *cyc⁰¹* mutanata u odnosu na *wt* i *tim⁰¹* mutante. Obzirom da se *tim⁰¹* mutant normalno senzitivizira, pretpostavljamo da funkcija cirkadijalnih gena u regulaciji cirkadijalnog ritma i senzitivizacije na kokain uključuje različite molekularne mehanizme (29). Rezultati naše individualne i populacijske analize su konzistentni te smo time potvrdili i rezultate prethodnih studija na miševima i *Drosophili*.

Obzirom da nikada nije provedeno ispitivanje učinka volatiliziranog metamfetamina na razvoj senzitivizacije u cirkadijalnih mutanata *Drosophile*, prvi puta smo proveli takvu vrstu ispitivanja. Rezultati populacijske analize pokazuju da se jedino *Clk^{Jrk}* i *cyc⁰¹* mutanti ne senzitiviraju, no provedbom individualne analize primjećuje se znatno smanjen broj senzitiviziranih *Clk^{Jrk}* mutanata u odnosu na *wt*. Rezultati sugeriraju da bi u regulaciji razvoja lokomotorne senzitivizacije na oba psihostimulansa mogao sudjelovati različit set cirkadijalnih gena. Za razliku od kokaina, *per⁰¹* mutacija ne utječe na metamfetaminom - inducirani lokomotorni ritam dok *Clk^{Jrk}* i *cyc⁰¹* posreduju u metamfetamin - induciranoj senzitivizaciji. Rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjem na miševima gdje je pokazano da *Per1* i *Per2* homozigoti postaju ritmični nakon izlaganja metamfetaminu (52), no ne slažu se sa studijama gdje su *Clock* mutirani miševi nakon izlaganja metamfetaminu povećali ritmičnost (52) (53) .

Obzirom na različite dobivene rezultate na *Drosophili* i miševima, pretpostavljamo da funkcija cirkadijalnih gena u regulaciji cirkadijalnog ritma i senzitivacije na metamfetamin u ova dva organizma posjeduje različite mehanizme.

Dopaminergična transmisija igra važnu ulogu u procesuiranju motoričke aktivacije i bihevioralnog učinka psihomotoričkih stimulansa poput kokaina i metamfetamina (4). Dopaminski sustav *Drosophile* uključen je u kontrolu lokomocije i bihevioralnog fenotipa, iako detalji neuronske kontrole nisu poznati (8). Sa dopaminskim mutantima željeli smo otkriti da li dopaminska modulacija utječe na razvoj senzitivacije na psihostimulanse. U prijašnjim studijama izlaganje DAT mutiranih miševa kokainu nije izazvalo porast lokomocije (19). Miševi bez funkcionalnog DopR1 nisu lokomotorno hiperaktivni nakon tretmana kokainom (16). Heterozigoti VMAT *Drosophile* pokazuju na kokainu povećanu lokomociju dok kod homozigota kokain nije promijenio motoričko ponašanje (13). Populacijska analiza pokazuje da nakon druge administracije *fmn* i *per-VMATRNAi* mutanti imaju značajno smanjenu količinu lokomocije.

Rezultati populacijske analize nakon administracije kokaina pokazuju da se lokomotorno nisu senzitivirali mutanti *fmn*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* što sugerira da su u razvoju lokomotorne senzitivacije na kokain važni funkcionalni DAT obzirom da je on glavna meta kokaina (6) i VMAT eksprimiran u cirkadijalnim i dopaminskim neuronima. Obzirom da se *dumb* normalno senzitivira, a DopR1 mutirani miševi nisu lokomotorno hiperaktivni na kokainu (16), trebalo bi istražiti je li lokomociju *dumb* mutanata izazvala druga vrsta aminergične transmisije, primjerice serotonergična ili oktopaminergična.

Rezultati individualne analize nam omogućuju da konkretnije i detaljnije identificiramo promjene inducirane psihostimulansom. Na individualnoj razini, lokomotorno se na kokain nisu senzitivirali *fmn* i *per-VMATRNAi* mutanti što potvrđuje populacijsku analizu da su za senzitivaciju na kokain važni funkcionalni DAT i VMAT te da je u toj regulaciji važna lokacijska povezanost cirkadijalnih neurona i aminergičnog sustava transmisije. Rezultati obje analize pokazuju da je uloga VMAT važna u cirkadijalnim neuronima, no ne možemo sa sigurnošću tvrditi koja neurotransmisija je posrijedi obzirom da se VMAT *Drosophile* nalazi u dopaminskim i serotoninskim neuronima (54).

Konzistentno sa populacijom, individualno su se *dumb* mutanti senzitivizirali. Podatci dobiveni populacijskom i individualnom analizom u skladu su sa studijama na DAT mutiranim miševima (19) te VMAT homozigotima *Drosophila* (13). S obzirom na rezultate populacije za DDC i *Clk*-VMATRNAi mutante, pretpostavljamo da je moguće posredovanje i selektivno dopaminskih neurona, no na DDC i *Clk*-VMATRNAi mutantima bi trebalo provesti još nekoliko daljnjih eksperimenata da bi se potvrdila senzitivizacija na individualnoj razini.

Rezultati populacijske analize lokomocije mutanata na metamfetaminu pokazuju da se mutanti *fmn*, *dumb*, DDC i *per*-VMATRNAi nisu senzitivizirali nakon druge administracije što ukazuje da je djelomično različit set gena od onoga koji regulira senzitivizaciju na kokain odgovoran za povećanje lokomocije na metamfetamin. Isto tako, populacijskom analizom oba stimulansa vidljivo je da kokain i metamfetamin dijele neke zajedničke mete ključne u senzitivizaciji, a to su funkcionalni DAT i VMAT u *per* pozitivnim neuronima. Rezultati sugeriraju da su uz njih za razvoj senzitivizacije na metamfetamin važni funkcionalni receptori tipa-1 te VMAT selektivno u dopaminskim neuronima.

Neočekivan odgovor opažen je kod populacijske i individualne analize mutanata *Clk* i *per*-VMATRNAi. Obzirom da su administracije metamfetamina provedene u različito doba dana (prva u 9h, druga u 19h) te da u skladu s time ovisi i ekspresija cirkadijalnih gena (*per* eksprimiran po danu 00-12h, a *Clk* po noći 12-00h) (24) očekivali smo da će sa ekspresijom cirkadijalnih gena i utišavanjem VMAT-a odgovor biti konzistentan. Primjerice, očekivali smo da će *Clk* mutanti nakon druge kao i *per* mutanti nakon prve administracije pokazati smanjen odgovor no pokazuju povećanje što upućuje da promjena ekspresije VMAT u određeno doba dana regulira učinak metamfetamina. U jednoj studiji sugeriraju da VMAT inhibicija može voditi ka povećanju razine monoamina u citosolu što rezultira povećanim efluksom kroz transportere plazma membrane (55) što upućuje na kompenzaciju sustava u nedostatku VMAT-a. Nasuprot tome, u doba dana kada je ekspresija pojedinog gena smanjena očekivali smo povećanje lokomocije do kojeg nije došlo što sugerira da je mehanizam razvoja senzitivizacije bio downreguliran.

Individualnom analizom ustanovljeno je da se lokomotorno nisu senzitivizirali *fmn* i *per*-VMATRNAi mutanti što je u korelaciji sa populacijskom analizom mutanata na metamfetaminu. Rezultati naših analiza slažu se sa prethodnim studijama na *fmn* mutantima *Drosophila* koje su pokazale rezistenciju na oralno aktivirajući učinak metamfetamina (15) kao i na DAT mutiranim miševima koji nisu pokazivali aktivirajući učinak metamfetamina (19). S obzirom da je populacijska analiza pokazala da se *dumb* i DDC-VMATRNAi ne senzitiviziraju na metamfetamin, ti rezultati su u skladu sa publiciranim istraživanjima na *dumb* mušicama (15) i mušicama sa preeksprimiranim VMAT u dopaminskim neuronima koje su povećano odgovorile na administraciju metamfetamina (14). Ipak, potrebno je provesti još eksperimenata na *dumb* i DDC-VMATRNAi mutantima da bi potvrdili senzitivizaciju na individualnoj razini s obzirom da su oba mutanta populacijski i individualno pokazali smanjenu lokomotornu aktivnost nakon druge administracije metamfetamina. Dodatni rezultati bi potvrdili ključnu ulogu dopamina kao glavnog posrednika u lokomotornoj senzitivizaciji na kokain i metamfetamin. U konačnici, analize sugeriraju kako ključnu ulogu u senzitivizaciji na oba psihostimulansa imaju primarno dopaminski i vezikularni monoaminski transporter te da je za razvoj senzitivizacije važna povezanost aminergične transmisije i *per* pozitivnih cirkadijalnih neurona.

6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem konstruirali smo i validirali novu platformu koja omogućava višestruku administraciju termostabilnih droga (kokain i metamfetamin hidroklorida) pri čemu je moguće varirati koncentraciju droge, dužinu izlaganja aerosolu te vrijeme između administracija. Metoda je vremenski manje zahtjevna sa minimiziranom manipulacijom životinjama te visokoprotorna jer omogućuje istovremeno mjerenje bihevioralnog odgovora 32 mušice u DAMS sustavu. Prednost ove metode leži u analizi individualnog bihevioralnog odgovora u vidu kvantifikacije senzitiviranih mušica.

Pokazali smo da akutno izlaganje kokainu dovodi do značajnog i kratkotrajnog povećanja lokomotorne aktivnosti dok metamfetamin pokazuje duže aktivirajuće djelovanje na motorički sustav *Drosophila* što je u skladu sa različitim mehanizmima farmakokinetike i farmakodinamike ova dva psihostimulansa.

Utvdili smo da je lokomotorna aktivnost *Drosophila* na psihostimulanse dozno i vremenski ovisna. Mali raspon koncentracija kokaina izaziva stereotipna ponašanja dok aktivirajući učinak metamfetamina više inducira lokomotivnu. U ovom radu po prvi puta je provedeno ispitivanje lokomotorne senzitivacije na metamfetamin. Lokomotorna senzitivacija na kokain se postiže u kraćem vremenskom periodu (6h) dok kod metamfetamina period razvoja senzitivacije je 12h što ide u prilog teoriji o razlici u farmakokinetici ova dva psihostimulansa.

Dosadašnja istraživanja na *Drosophila* o povezanosti cirkadijalnih gena i ovisnosti ispitivala su samo utjecaj kokaina, ne i metamfetamina. Mi smo pokazali da *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹* i *cyc⁰¹* mutanti ne razvijaju lokomotivnu senzitivaciju na kokain dok se na metamfetamin ne senzitiviraju samo *Clk^{Jrk}* mutanti što indicira da bi u regulaciji razvoja lokomotorne senzitivacije na ova dva psihostimulansa mogao sudjelovati različit set cirkadijalnih gena.

Metodu smo validirali i ispitivanjem mutanata u dopaminskom sustavu te u skladu s očekivanjima pokazali da u regulaciji senzitivacije na kokain i metamfetamin posreduju različite molekule dopaminergičnog sustava. Pokazali smo kako važnu ulogu u regulaciji lokomotorne senzitivacije na kokain potencijalno ima VMAT u dopaminskim i *Clock* pozitivnim neuronima, a da lokomotorna senzitivacija na metamfetamin ovisi o D1 receptoru i VMAT u dopaminskim neuronima. Potvrdili smo da su za razvoj senzitivacije na oba psihostimulansa važni dopaminski transporter - DAT te VMAT u *period* pozitivnim neuronima.

Iako smo u istraživanju dokazali da je naša platforma prikladna za induciranje lokomotorne senzitivacije, u budućnosti je potrebno modificirati metodu u smislu automatizacije doziranja psihostimulansa zračnom pumpom te ograničavanja dovoda droge putem cjevčica u vremenu kada se droga ne administrira da bi eliminirali potencijalni okolišni utjecaj na bihevioralni odgovor.

Ovim istraživanjem započeli smo s ispitivanjima mehanizama u pozadini razvoja lokomotorne senzitivacije na psihostimulanse, no daljnja testiranja psihostimulansa na *Drosophila* i kontinuirani genetski probir novih mutanata dat će uvid u neotkrivene spoznaje o mehanizmu djelovanja droga i regulaciji na molekularnoj razini u modelima viših kralježnjaka.

7. LITERATURA

1. Robinson TE, Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 12. listopad 2008.;363(1507):3137–46.
2. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron.* rujana 1998.;21(3):467–76.
3. Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci.* listopad 2001.;2(10):695–703.
4. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci.* 2006.;29:565–98.
5. Nestler EJ. Transcriptional Mechanisms of Drug Addiction. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* prosinac 2012.;10(3):136–43.
6. Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol.* 31. listopad 2003.;479(1–3):23–40.
7. McClung C, Hirsh J. The trace amine tyramine is essential for sensitization to cocaine in *Drosophila*. *Curr Biol.* 26. kolovoz 1999.;9(16):853–60.
8. Yamamoto S, Seto ES. Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Exp Anim.* 2014.;63(2):107–19.
9. White KE, Humphrey DM, Hirth F. The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Front Neurosci.* 2010.;4:205.
10. Andretic R, van Swinderen B, Greenspan RJ. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr Biol CB.* 12. srpanj 2005.;15(13):1165–75.
11. Monastirioti M. Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech.* 15. travanj 1999.;45(2):106–21.
12. Greer CL, Grygoruk A, Patton DE, Ley B, Romero-Calderon R, Chang H-Y, i ostali. A splice variant of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter contains a conserved trafficking domain and functions in the storage of dopamine, serotonin, and octopamine. *J Neurobiol.* 05. rujana 2005.;64(3):239–58.
13. Simon AF, Daniels R, Romero-Calderón R, Grygoruk A, Chang H-Y, Najibi R, i ostali. *Drosophila* Vesicular Monoamine Transporter Mutants Can Adapt to Reduced or Eliminated Vesicular Stores of Dopamine and Serotonin. *Genetics.* veljača 2009.;181(2):525–41.
14. Freyberg Z, Sonders MS, Aguilar JI, Hiranita T, Karam CS, Flores J, i ostali. Mechanisms of amphetamine action illuminated through optical monitoring

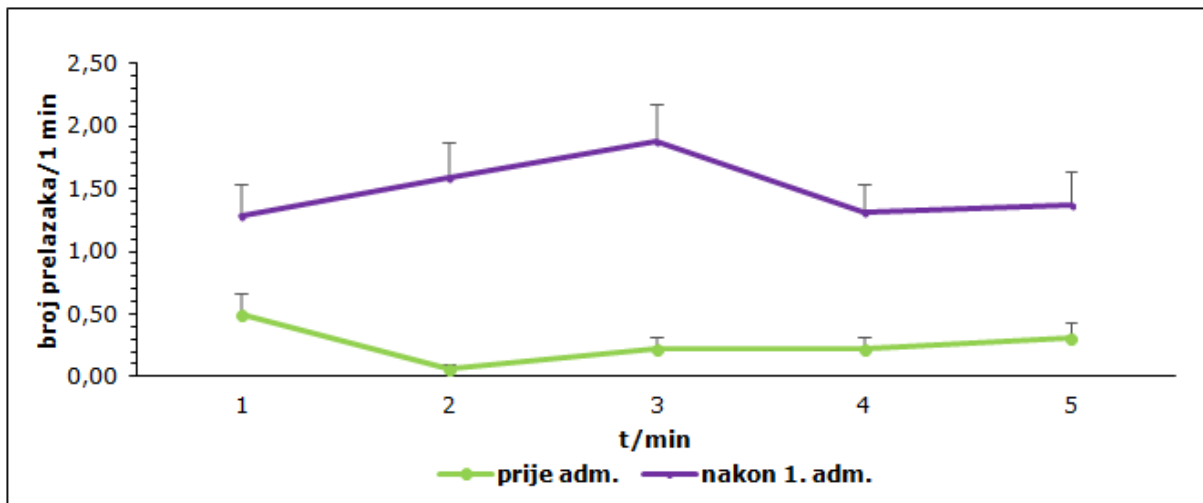
- of dopamine synaptic vesicles in *Drosophila* brain. *Nat Commun.* 16. veljača 2016.;7:10652.
15. Andretic R, Kim Y-C, Jones FS, Han K-A, Greenspan RJ. *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23. prosinac 2008.;105(51):20392–7.
 16. Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, White FJ, i ostali. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell.* 16. prosinac 1994.;79(6):945–55.
 17. Pörzgen P, Park SK, Hirsh J, Sonders MS, Amara SG. The antidepressant-sensitive dopamine transporter in *Drosophila melanogaster*: a primordial carrier for catecholamines. *Mol Pharmacol.* siječanj 2001.;59(1):83–95.
 18. Kume K. A *Drosophila* dopamine transporter mutant, *fumin* (*fmn*), is defective in arousal regulation*. *Sleep Biol Rhythms.* 01. listopad 2006.;4(3):263–73.
 19. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature.* 15. veljača 1996.;379(6566):606–12.
 20. McClung C, Hirsh J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Curr Biol CB.* 15. siječanj 1998.;8(2):109–12.
 21. Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* svibanj 1995.;15(5 Pt 2):4102–8.
 22. 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.* travanj 2017.;40(4):403–28.
 23. Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol.* travanj 2005.;75(6):406–33.
 24. Meireles-Filho ACA, Kyriacou CP. Circadian rhythms in insect disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* prosinac 2013.;108(Suppl 1):48–58.
 25. Logan RW, Williams WP, McClung CA. Circadian rhythms and addiction: Mechanistic insights and future directions. *Behav Neurosci.* lipanj 2014.;128(3):387–412.
 26. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev.* prosinac 1993.;18(3):247–91.

27. Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 16. svibanj 2002.;417(6886):329–35.
28. The Drosophila Molecular Clock Model | HHMI's BioInteractive [Internet]. [citirano 11. rujan 2017.]. Dostupno na: <http://www.hhmi.org/biointeractive/drosophila-molecular-clock-model>
29. Andretic R, Chaney S, Hirsh J. Requirement of Circadian Genes for Cocaine Sensitization in Drosophila. *Science*. 13. kolovoz 1999.;285(5430):1066–8.
30. Abarca C, Albrecht U, Spanagel R. Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25. lipanj 2002.;99(13):9026–30.
31. McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, i ostali. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28. lipanj 2005.;102(26):9377–81.
32. Masubuchi S, Honma S, Abe H, Ishizaki K, Namihira M, Ikeda M, i ostali. Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur J Neurosci*. 01. prosinac 2000.;12(12):4206–14.
33. Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev*. lipanj 2011.;63(2):348–65.
34. Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*. lipanj 2011.;63(2):411–36.
35. Leith NJ, Kuczenski R. Two dissociable components of behavioral sensitization following repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 1982.;76(4):310–5.
36. Wolf FW, Heberlein U. Invertebrate models of drug abuse. *J Neurobiol*. siječanj 2003.;54(1):161–78.
37. George R, Lease K, Burnette J, Hirsh J. A „bottom-counting“ video system for measuring cocaine-induced behaviors in Drosophila. *Methods Enzymol*. 2005.;393:841–51.
38. Bainton RJ, Tsai LT, Singh CM, Moore MS, Neckameyer WS, Heberlein U. Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in Drosophila. *Curr Biol CB*. 24. veljača 2000.;10(4):187–94.
39. Kamens HM, Burkhart-Kasch S, McKinnon CS, Li N, Reed C, Phillips TJ. Sensitivity to psychostimulants in mice bred for high and low stimulation to methamphetamine. *Genes Brain Behav*. ožujak 2005.;4(2):110–25.
40. Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*. ožujak 2006.;11(1):2–38.

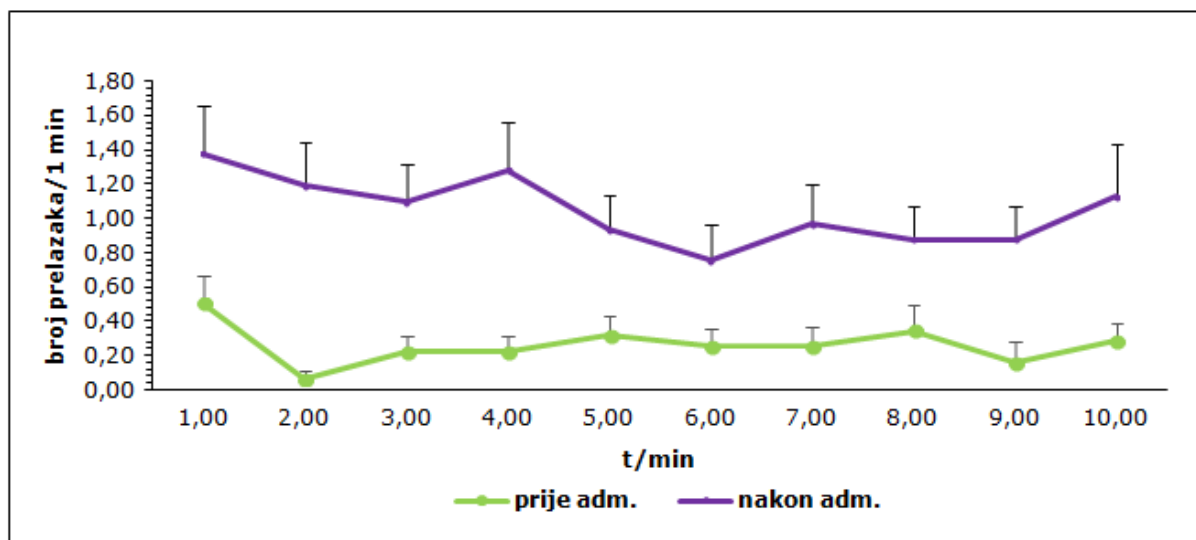
41. Heberlein U, Tsai LT -Y., Kapfhamer D, Lasek AW. *Drosophila*, a genetic model system to study cocaine-related behaviors: A review with focus on LIM-only proteins. *Neuropharmacology*. 2009.;56(Suppl 1):97.
42. O'Kane CJ. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. *Curr Top Behav Neurosci*. 2011.;7:37-60.
43. Wolf ME. Cocaine addiction: clues from *Drosophila* on drugs. *Curr Biol CB*. 21. listopad 1999.;9(20):R770-772.
44. Kaun KR, Devineni AV, Heberlein U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Hum Genet*. 01. lipanj 2012.;131(6):959-75.
45. Pizzo A, Karam C, Zhang Y, Ma C, McCabe B, Javitch J. Amphetamine-induced behavior requires CaMKII-dependent dopamine transporter phosphorylation. *Mol Psychiatry*. ožujak 2014.;19(3):279-81.
46. Lebestky TJ, Chang J-SC, Dankert H, Zelnik L, Kim Y-C, Han K-A, i ostali. Two Different Forms of Arousal in *Drosophila* are Independently and Oppositely Regulated by the Dopamine D1 Receptor DopR via Distinct Neural Circuits. *Neuron*. 25. studeni 2009.;64(4):522-36.
47. Xiao C, Mileva-Seitz V, Seroude L, Robertson RM. Targeting HSP70 to motoneurons protects locomotor activity from hyperthermia in *Drosophila*. *Dev Neurobiol*. ožujak 2007.;67(4):438-55.
48. Segal DS, Kuczenski R. Human Methamphetamine Pharmacokinetics Simulated in the Rat: Single Daily Intravenous Administration Reveals Elements of Sensitization and Tolerance. *Neuropsychopharmacology*. 17. kolovoz 2005.;31(5):941-55.
49. Weiss SR, Post RM, Pert A, Woodward R, Murman D. Context-dependent cocaine sensitization: differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol Biochem Behav*. studeni 1989.;34(3):655-61.
50. Jing L, Zhang M, Li J-X, Huang P, Liu Q, Li Y-L, i ostali. Comparison of single versus repeated methamphetamine injection induced behavioral sensitization in mice. *Neurosci Lett*. 07. veljača 2014.;560:103-6.
51. Kuczenski R, Segal DS, Melega WP, Lacan G, McCunney SJ. Human Methamphetamine Pharmacokinetics Simulated in the Rat: Behavioral and Neurochemical Effects of a 72-h Binge. *Neuropsychopharmacology*. 01. srpanj 2009.;34(11):2430-41.
52. Mohawk JA, Baer ML, Menaker M. The methamphetamine-sensitive circadian oscillator does not employ canonical clock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 03. ožujak 2009.;106(9):3519-24.
53. Masubuchi S, Honma S, Abe H, Nakamura W, Honma K. Circadian activity rhythm in methamphetamine-treated Clock mutant mice. *Eur J Neurosci*. listopad 2001.;14(7):1177-80.

54. Chang H-Y, Grygoruk A, Brooks ES, Ackerson LC, Maidment NT, Bainton RJ, i ostali. Overexpression of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter increases motor activity and courtship but decreases the behavioral response to cocaine. *Mol Psychiatry*. siječanj 2006.;11(1):99–113.
55. Wimalasena K. Vesicular Monoamine Transporters: Structure-Function, Pharmacology, and Medicinal Chemistry. *Med Res Rev*. srpanj 2011.;31(4):483–519.

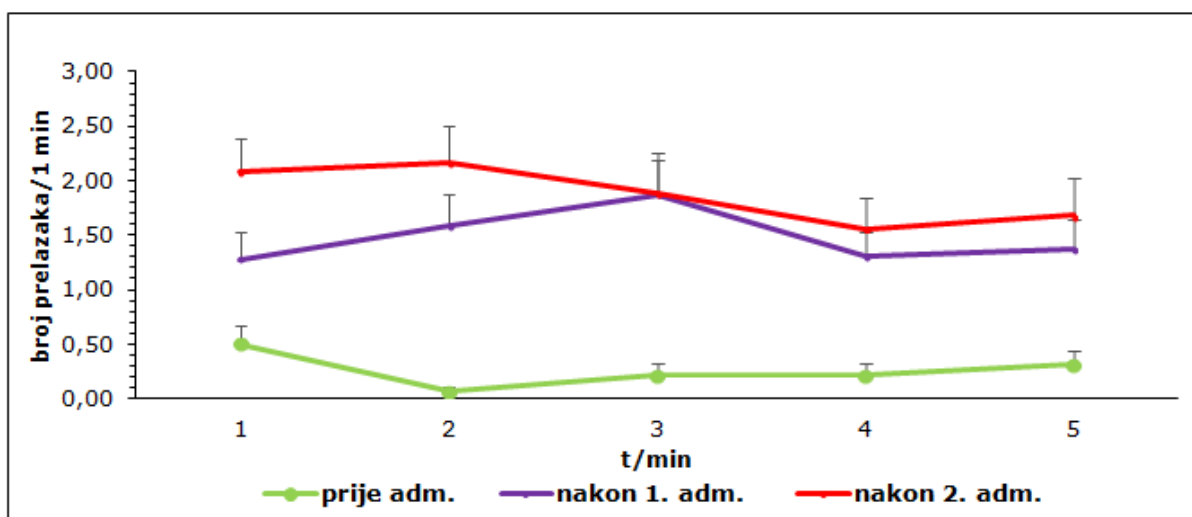
8. DODATNI MATERIJALI



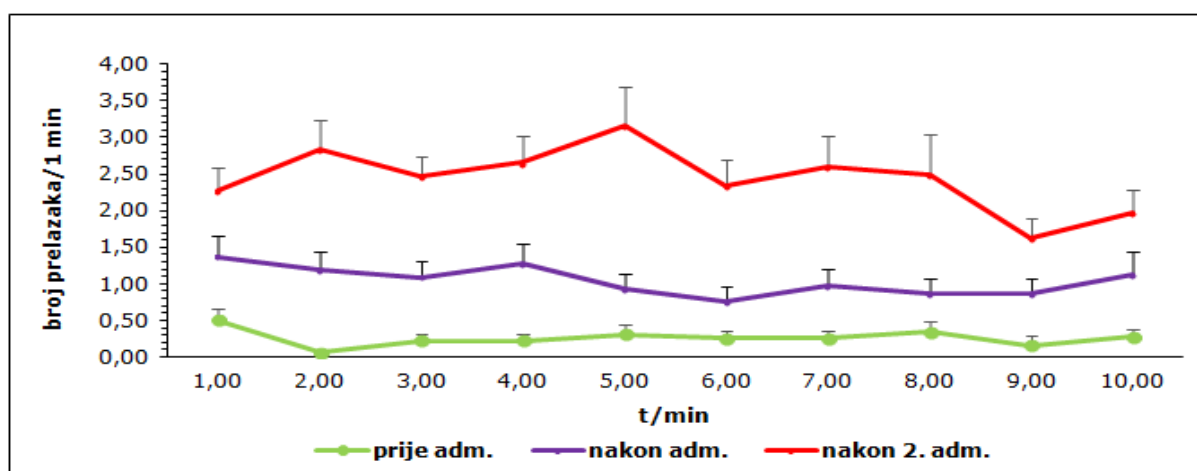
Slika 1. Akutna doza volatiliziranog kokaina značajno i kratkotrajno povećava lokomotornu aktivnost *Drosophila*. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1 minuta) te se promatrao lokomotorni odgovor na aktivirajući učinak droge. Prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 5 min. prije i 5 min. nakon administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



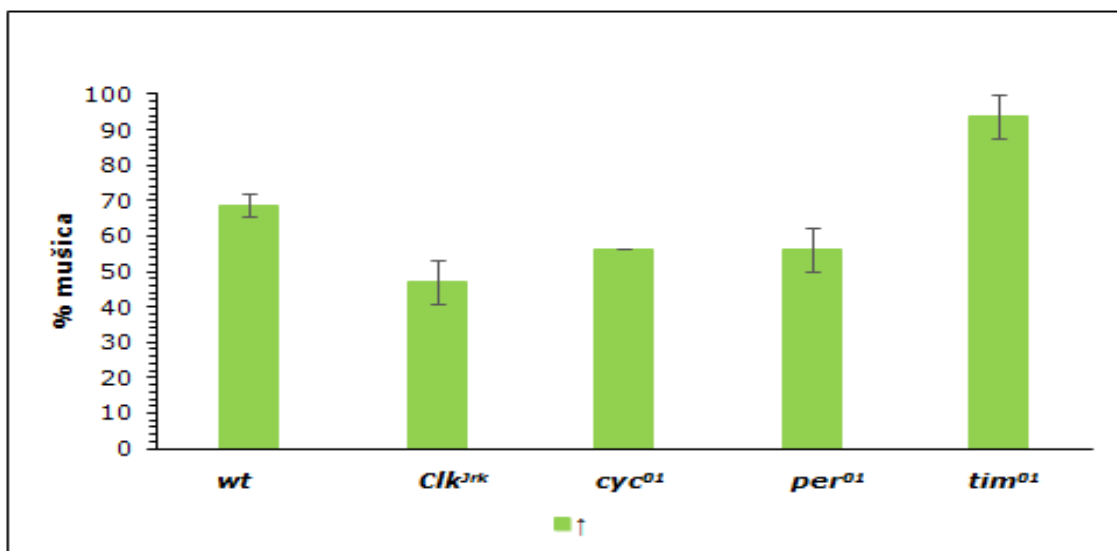
Slika 2. Akutna doza volatiliziranog metamfetamina značajno povećava lokomotornu aktivnost *Drosophila*. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1 minuta) te se promatrao lokomotorni odgovor na aktivirajući učinak droge tijekom 10 min. prije i 10 min. nakon administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



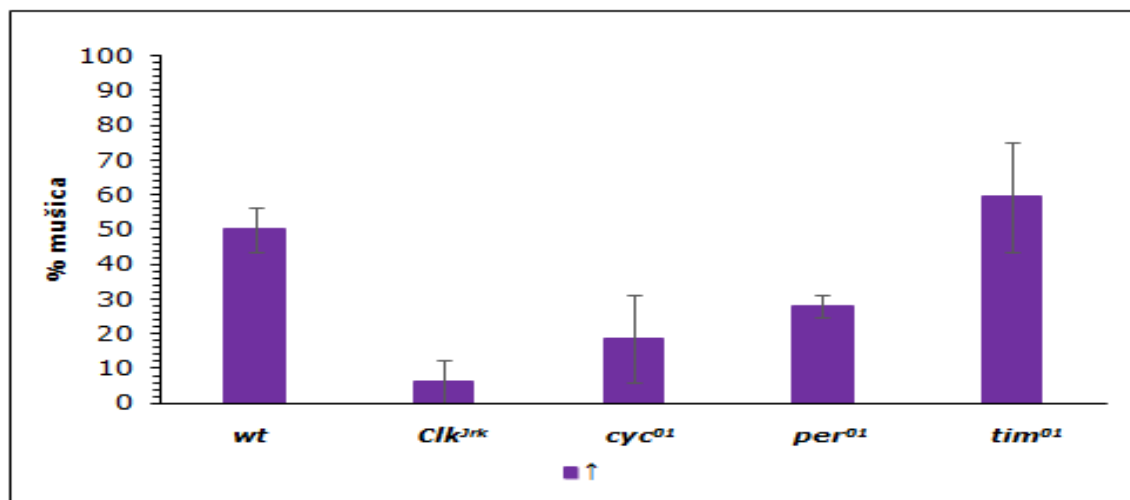
Slika 3. Ponovljena doza volatiliranog kokaina inducira lokomotornu senzitivaciju u *Drosophila*. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Mušicama je administriran kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1 minuta). Vremenski period između administracija je 6h. Prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 30 min. nakon prve i druge administracije 75 μ g kokaina u odnosu na 30 min. prije obje administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



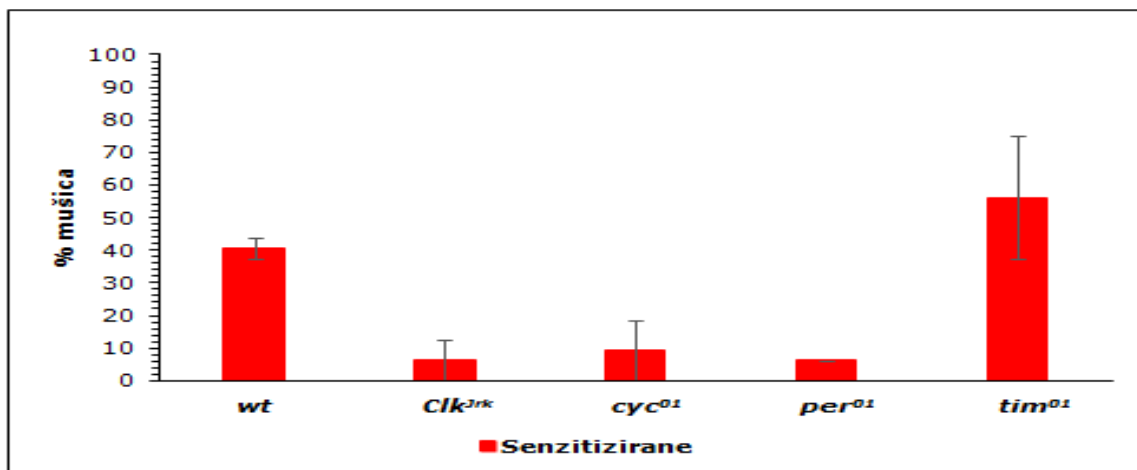
Slika 4. Ponovljena doza volatiliranog metamfetamina značajno inducira lokomotornu senzitivaciju u *Drosophila*. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *wt* mužjaka starih 5 dana. Mušicama je administriran metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1 minuta). Vremenski period između administracija je 12h. Prikazan je prosječni broj prelazaka cjevčice tijekom 30 min. nakon prve i druge administracije 75 μ g kokaina u odnosu na 30 min. prije obje administracije; n=32 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



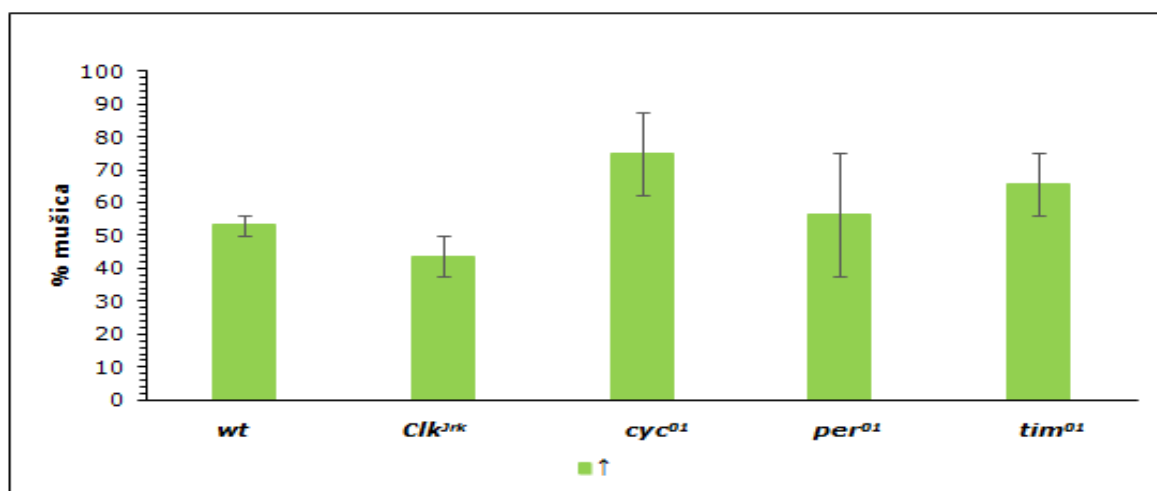
Slika 5: *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanti pokazuju sličnu razinu osjetljivosti na volatilizirani kokain kao i *wt*. Lokomotorni odgovor mjereno je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran volatilizirani kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 5 min. nakon prve administracije volatiliziranog kokaina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



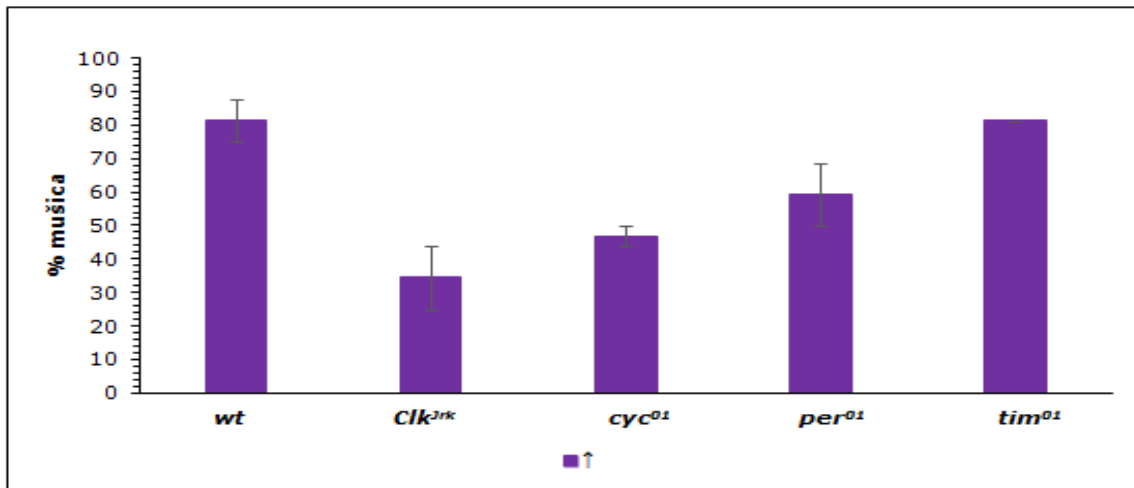
Slika 6: Nakon druge administracije *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanti pokazuju značajno smanjenje lokomocije na volatilizirani kokain. Lokomotorni odgovor mjereno je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran volatilizirani kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 6h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 5 min. nakon druge administracije volatiliziranog kokaina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



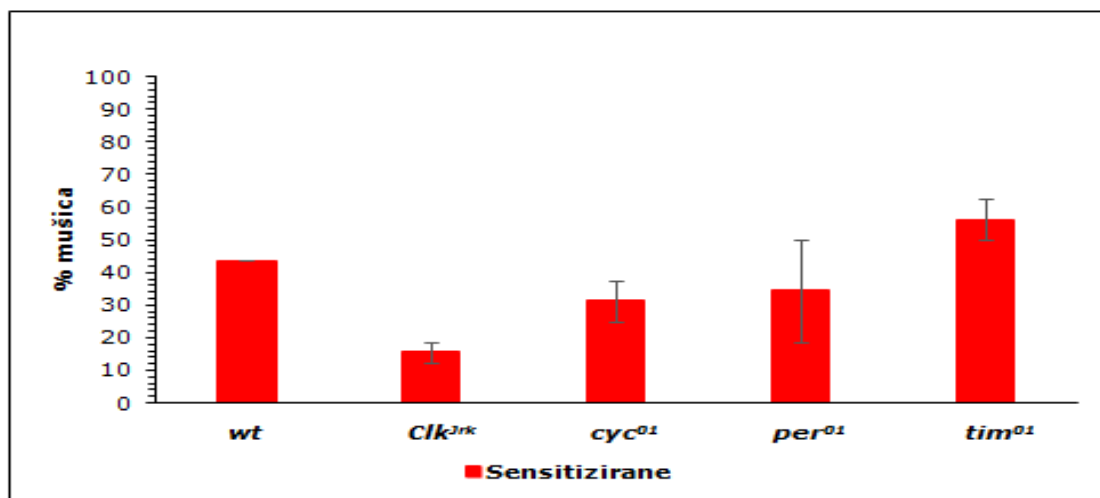
Slika 7: *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani kokain. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale dodatno povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 5 min. nakon druge administracije u odnosu na prvu. Mušicama je administriran 75 μ g kokain u trajanju od 1 minute; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



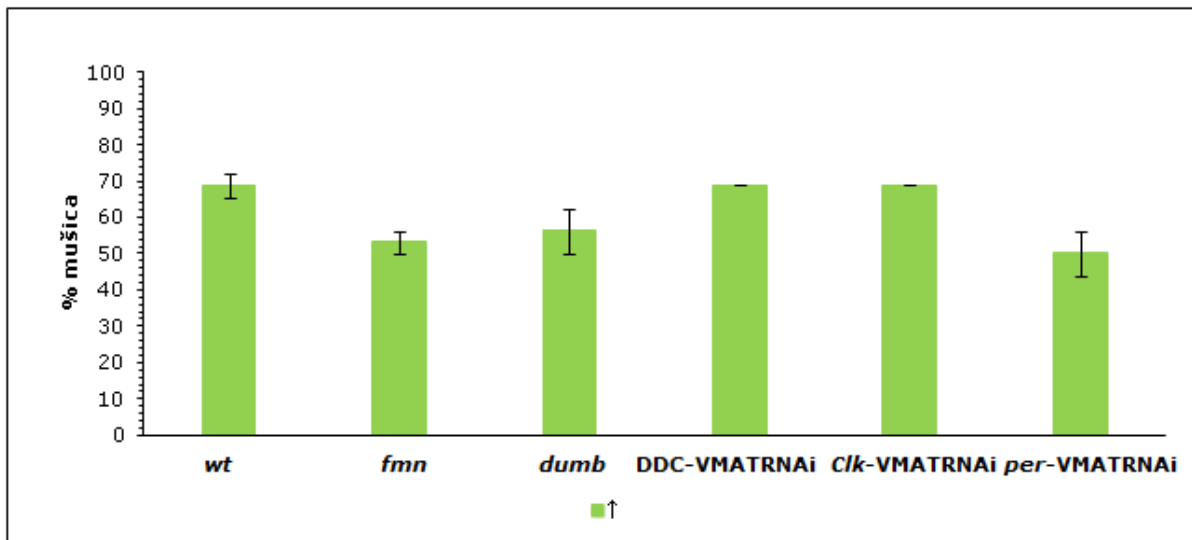
Slika 8: Svi mutanti pokazuju podjednaku osjetljivost na prvu akutnu dozu volatiliziranog metamfetamina. Lokomotorni odgovor mjerena je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran volatilizirani metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 10 min. nakon prve administracije volatiliziranog metamfetamina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



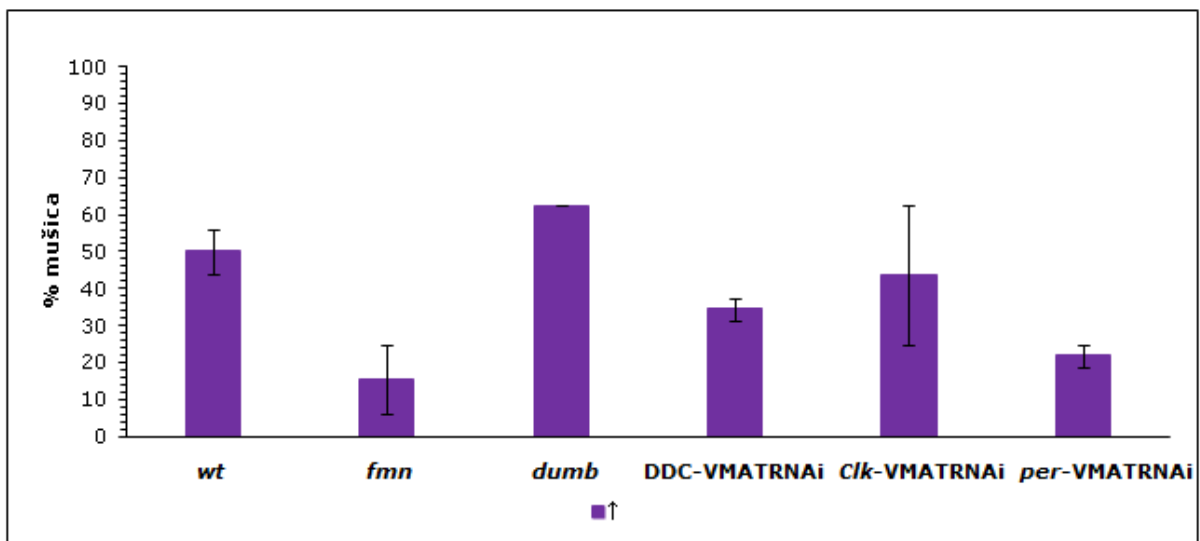
Slika 9: *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *per⁰¹* mutanti pokazuju smanjenu osjetljivost na drugu akutnu dozu volatiliziranog metamfetamina. Lokomotorna aktivnost mjerena je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran volatilizirani metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 10 h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 10 min. nakon druge administracije volatiliziranog metamfetamina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



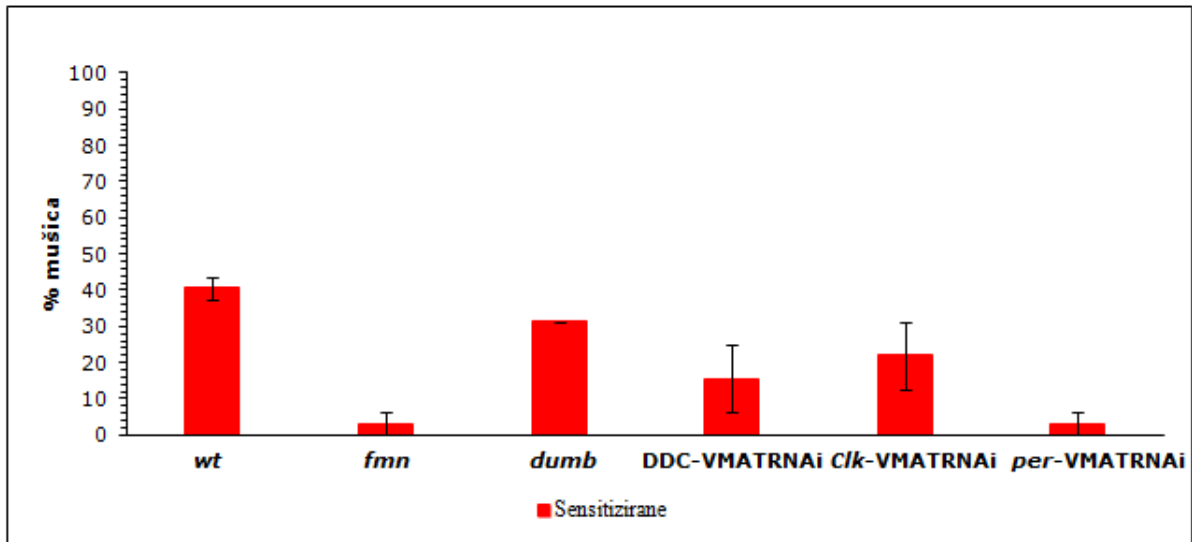
Slika 10: *Clk^{Jrk}* mutanti ne pokazuju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani metamfetamin. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *Clk^{Jrk}*, *per⁰¹*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata starih 5 dana. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale dodatno povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 10 min. nakon druge administracije u odnosu na prvu. Mušicama je administriran 75 µg metamfetamin u trajanju od 1 minute; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



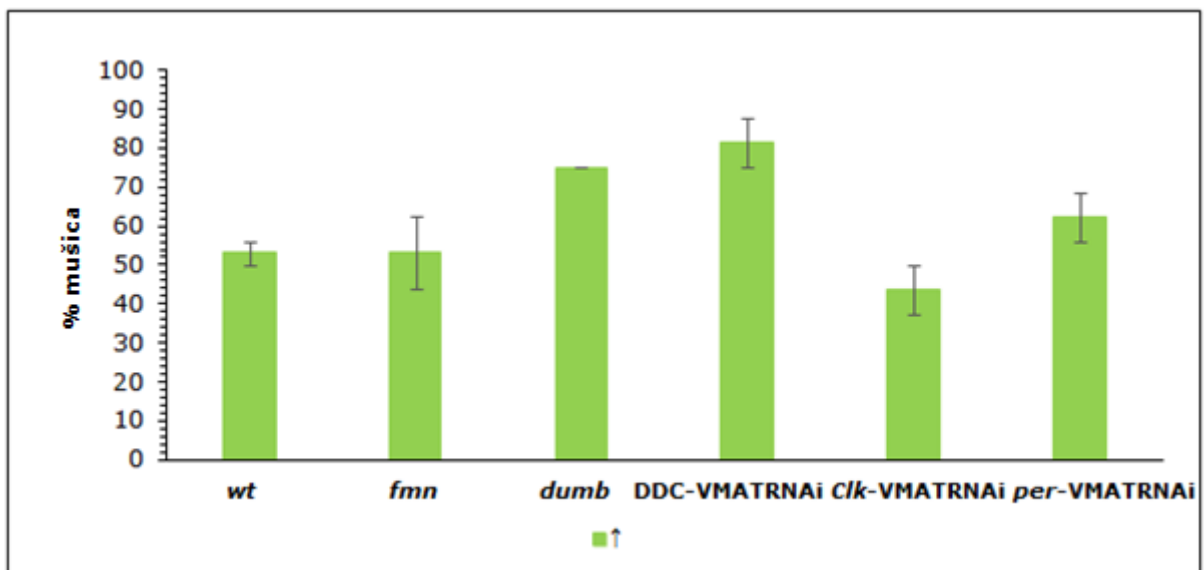
Slika 11: Svi mutanti pokazuju podjednaku osjetljivost na prvu akutnu dozu volatiliziranog kokaina. Lokomotorni odgovor mjereno je kod 5 dana starih *fmn*, *dumb*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* mutanata. Mušicama je administriran volatilizirani kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 5 min. nakon prve administracije volatiliziranog kokaina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



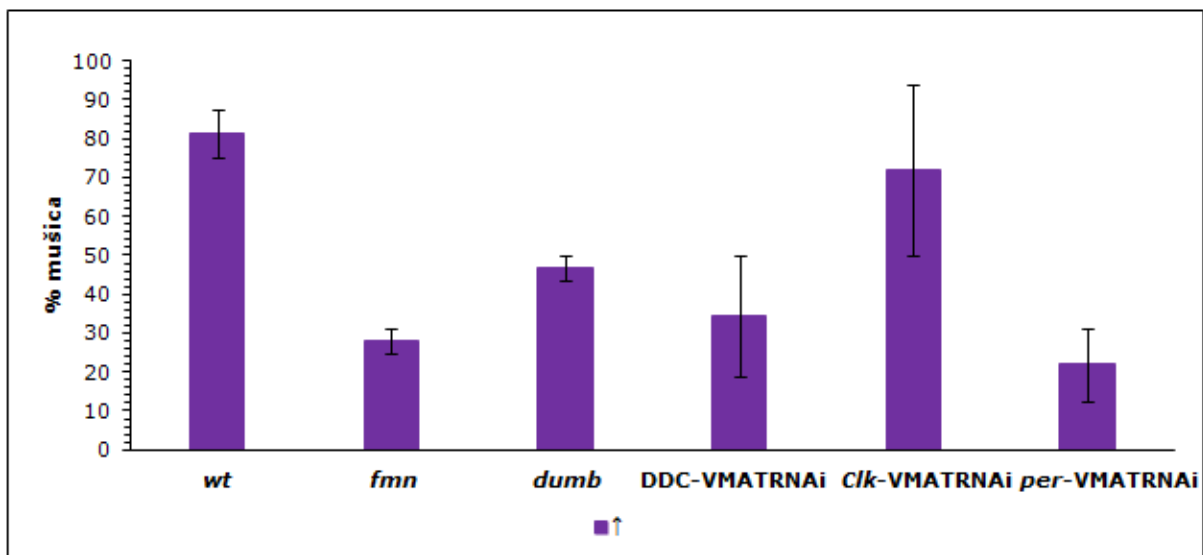
Slika 12: *Fmn*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* mutanti pokazuju smanjenu osjetljivost na drugu akutnu dozu volatiliziranog kokaina. Lokomotorna aktivnost mjerena je kod *fmn*, *dumb*, *DDC*, *Clk* i *per-VMATRNAi* mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran volatilizirani kokain prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1min.). Vremenski interval između administracija je 6 h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 5 min. nakon druge administracije volatiliziranog kokaina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



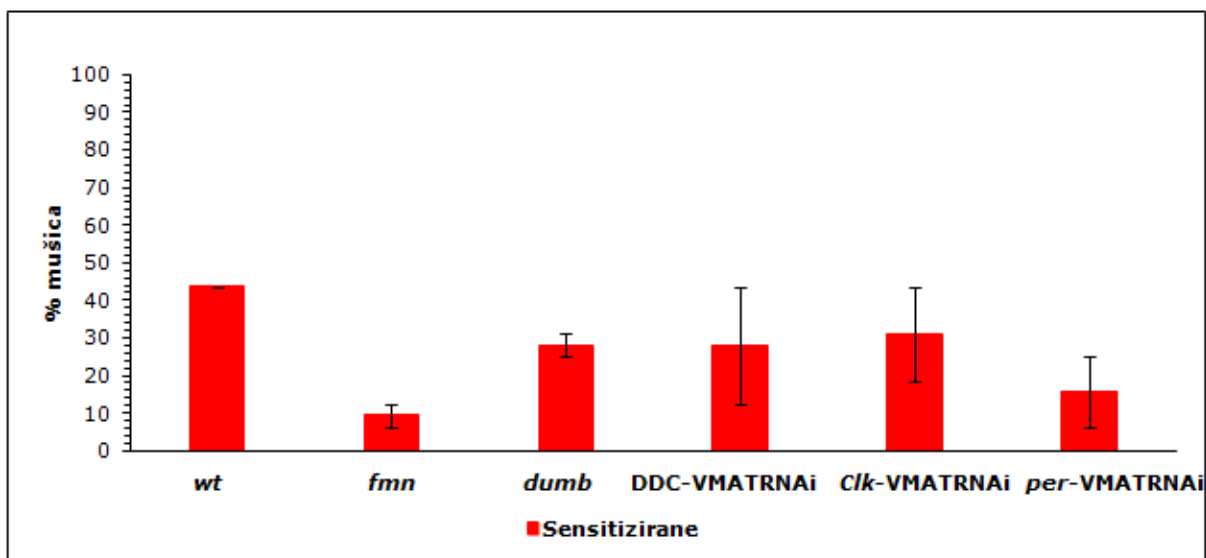
Slika 13: *fmn* i *per*-VMATRNAi mutanti ne razvijaju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani kokain. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata starih 5 dana. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale dodatno povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 5 min. nakon druge administracije u odnosu na prvu. Mušicama je administriran 75 μ g kokain u trajanju od 1 minute; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



Slika 14: Osjetljivost *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata na prvu akutnu dozu volatiliziranog metamfetamina. Lokomotorni odgovor mjereno je kod 5 dana starih *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata. Mušicama je administriran volatilizirani metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 μ g, 1 min.). Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 10 min. nakon prve administracije volatiliziranog kokaina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



Slika 15: Osjetljivost *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata na drugu akutnu dozu volatiliziranog metamfetamina. Lokomotorna aktivnost mjerena je kod *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata starih 5 dana. Mušicama je administriran volatilizirani metamfetamin prema standardnom protokolu (150L/h, 75 µg, 1min.). Vremenski interval između administracija je 10 h. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 10 min. nakon druge administracije volatiliziranog kokaina; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.



Slika 16: *Fmn* i *per*-VMATRNAi mutanti ne razvijaju lokomotornu senzitivaciju na volatilizirani metamfetamin. Lokomotorna senzitivacija mjerena je kod *fmn*, *dumb*, DDC, *Clk* i *per*-VMATRNAi mutanata starih 5 dana. Prikazan je individualni odgovor tj. % mušica koje su imale dodatno povećanu lokomotornu aktivnost u periodu od 10 min. nakon druge administracije u odnosu na prvu. Mušicama je administriran 75 µg metamfetamin u trajanju od 1 minute; n=16 sa dva ponavljanja po eksperimentu.

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

U izradi rada 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



Curriculum vitae

OSOBNJE INFORMACIJE

Sabina Al-samarai



📍 Antuna Barca 1, 51000 Rijeka, Hrvatska

☎ +38551646697 📠 +385989576809

✉ sabina.alsamarai@gmail.com



🗣 sabina.alsamarai@gmail.com

♂️ Spol ženski | 📅 Datum rođenja 03/02/1987 | 🇭🇷 Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

Siječanj 2017. -

Istraživački rad u Laboratoriju za genetiku ponašanja u sklopu diplomskog rada "Razvoj bihevioralne senzitivacije na kokain u odnosu na metamfetamin kod *Drosophila melanogaster*" pod mentorstvom Doc. dr. sc. Rozi Andrečić - Waldowski
Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova, Sveučilište u Rijeci

Lipanj 2015. – Srpanj 2015.

"Jadran Galenski Laboratorij" d.d.
Svilno b.b
Stručna praksa na odjelu sterilnih proizvoda 2

Listopad 2007. - Listopad 2008.

Farmacija, Farmaceutski tehničar
"Jadran Pharma" d.o.o.
Rad na kontroli isporuke lijekova na području cijele RH

Rujan 2006. – Listopad 2007.

Farmacija, Farmaceutski tehničar
"Jadran Galenski Laboratorij" d.d.
Pušac b.b., Svilno b.b.
Odjel proizvodnje

Rad u proizvodnji na izradama oralnih čvrstih oblika i polučvrstih oblika (kreme i masti).

Rad na odjelu polučvrstih oblika, isključivo izrada te doziranje i opremanje. Rad na odjelu suhih oralnih oblika, isključivo izrada te blistiranje na poziciji farmaceutskog tehničara. Rad na odjelu čajeve, (doziranje i opremanje).

2015 -	Diplomski sveučilišni studij "Istraživanje i razvoj lijekova" Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova, Sveučilište u Rijeci
2012-2015	Sveučilišna prvostupnica Biotehnologije i istraživanja lijekova, Stečeno zvanje: univ. bacc. biotech. et pham. inv. Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija i istraživanje lijekova, Odjel za biotehnologiju i istraživanje lijekova, Sveučilište u Rijeci
2008-2010	Università degli studi di Trieste – Chimiche e tecnologie farmaceutiche (Scienze del farmaco) (Farmaceutski fakultet- smjer farmaceutska tehnologija i kemija, znanost o lijeku)
2002-2006	Farmaceutski tehničar Medicinska škola u Rijeci

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Citanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
talijanski	C2	C2	B2	B2	C2
arapski	A2	B2	B2	B2	C1

Komunikacijske vještine Timski rad na fakultetu sa kolegama, pri radu u laboratoriju i na poslu sa kolegama i nadređenima, Izvrsno snalaženje u organizaciji, iskustvo u javnom prezentiranju (seminari i prezentacije)

Ostale vještine Crtanje, slikanje, pjevanje

Vozačka dozvola B

Računalne vještine Izvrsno vladanje alatima MS Office, Word, Excel, PowerPoint, rad u Ape programu za kloniranje genske sekvence, Pymol za izradu molekula, MarvinSketch za crtanje kemijskih struktura i reakcija. Iskustvo rada u laboratoriju, poznavanje rada u programu MarvinSketch za crtanje kemijskih struktura i reakcija. Poznavanje rada u programima za računalni dizajn molekula Avogadro, Pymol, Chimera, Chimera-Vina, VMD-NAMD, PDB2PQR, KinTek.

Ogranizacijske / rukovoditeljske vještine Aktivno sudjelovanje na Festivalu znanosti Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci (travanj 2015., 2016., 2017.)

Članstva	<p>Član studentskog zbora Sveučilišta u Rijeci i odbora za akreditaciju fakulteta i nastavnih aktivnosti</p> <p>Aktivan član Udruge studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (UsbRi)</p> <p>Registrirani član Hrvatske zaklade za znanost za prijavu projekata</p>
Postignuti uspjesi	<p>Prvo (1.) mjesto na upisnoj listi od ukupno 20 mjesta na konačnoj listi za upis na studijski program, diplomski sveučilišni studij "Istraživanje i razvoj lijekova" Odjela za biotehnologiju.</p> <p>U 10% najbolje rangiranih studenata na konačnoj listi za upis na studijski program, Diplomski sveučilišni studij "Istraživanje i razvoj lijekova" Odjela za biotehnologiju.</p> <p>U akademskoj godini 2014./2015. prosjek ocjena svih položenih ispita Preddiplomskog sveučilišnog studija "Biotehnologija i istraživanje lijekova" zaključno sa 30. rujna 2015. bio je 4,767.</p> <p>10. srpnja 2015. završetkom preddiplomskog studija stekla sam 180 ECTS bodova i diplomirala sa velikom pohvalom – MAGNA CUM LAUDE sa svim pohvalama, častima i pravima.</p>
Konferencije	<p>Aktivno sudjelovanje na 7. studentskom kongresu neuroznanosti NeuRi 2017. (izlaganje istraživanja "Role of oxidative stress in behavioral sensitization to psychostimulants in <i>Drosophila</i>")</p> <p>Autori: Sabina Al-samarai, Josipa Kolobarić, Ana Filošević, Rozi Andrečić Waldowski</p>
Projekti	<p>Suradnik na projektu u 2017. godini: "Definiranje uloge cirkadijalnih gena kod bihevioralne senzitizacije <i>Drosophila melanogaster</i>", Projekt financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ #4920)</p> <p>Suradnik na projektu u 2017. godini: "FlyHigh – utjecaj oksidativnog stresa", studentski znanstveno istraživački projekt</p> <p>Projekt financiran od strane Zaklade Sveučilišta u Rijeci i Ureda za znanost Studentskog zbora Sveučilišta u Rijeci (SZSuR)</p>
Priznanja i nagrade	<p>Dobitnica talijanske Sveučilišne stipendije za postignuti izvrstan uspjeh na Farmaceutskom fakultetu u Trstu 2009. godine.</p> <p>Dobitnik sam sveučilišne stipendije za izvrsnost u 2016. godini (na konačnoj listi dobitnika objavljenoj 26.04.2016. nalazim se na 29. mjestu od ukupno 100 sa ostvarenih 23 boda od mogućih 28).</p> <p>Preporuku za izvrsnost dao mi je profesor biokemije Dr.sc. Roberto Antolović, tada red.prof, predstojnik Zavoda za sistemsku i molekularnu biomedicinu Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.</p>
Ostala sudjelovanja	<p>U lipnju 2016. ušla sam u drugi krug natječaja za Plivinu stipendiju i bila na testiranju u tvrtci Pliva d.o.o</p>