

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Azra Selimović

**Definiranje preferencijalne konzumacije kokaina i
metamfetamina kod *Drosophila melanogaster***

Diplomski rad

Rijeka, 2017. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Azra Selimović

**Definiranje preferencijalne konzumacije kokaina i
metamfetamina 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 57 stranica, 23 slike i 57 literaturnih navoda.

Sažetak

Ovisnost je stanje u kojem organizam osjeća jaku psihičku ili fizičku potrebu za opojnom supstancom. Psihostimulativne droge, poput kokaina i metamfetamina, djeluju na centre u mozgu koji reguliraju procesuiranje nagrade. Nagrađujući utjecaj droga kao posljedicu ima povećanu privlačnost droge koja dovodi do ovisničkog ponašanja, a može se ispitivati na laboratorijskim životinjama kao preferencijalna konzumacija. Iako postoje mnogi eseji za mjerenje lokomotornih efekta kokaina i metamfetamina, platforma kojom bi se promatrao nagrađujući utjecaj psihostimulansa kod *Drosophila melanogaster* dosada nije bila razvijena.

Cilj ovog diplomskog rada bio je modificirati Capillary Feeding (CAFE) esej prvotno osmišljen za ispitivanje ovisnosti o alkoholu i definirati karakteristike preferencijalne konzumacije kokaina i metamfetamina kod vinske mušice kao modelnog organizma za izučavanje ovisničkih ponašanja. Utvrdili smo kako mušice prilikom samoadministracije kokaina i metamfetamina razvijaju obrasce ovisničkog ponašanja primijećene u ljudi i modelima glodavaca. One aktivno biraju i preferiraju hranu s kokainom ili metamfetaminom unatoč gorkom okusu ovih psihostimulansa, te nastavljaju konzumaciju usprkos negativnim posljedicama i nakon deprivacije razvijaju ponašanja slična recidivu. Naši rezultati sugeriraju kako su u razvoju preferencijalne konzumacije na kokain uključeni produkti *cycle* gena, u preferenciji metamfetamina produkti *period*, *Clock* i *cycle* gena, te kako dopaminski transporter i receptor tip 1 nisu uključeni u razvoj preferencijalne konzumacije.

Korištenje *Drosophila* u ispitivanjima samoadministracije omogućiti će daljnja istraživanja neuroloških mehanizama koji su u podlozi nagrađujućeg djelovanja psihostimulansa kako bi se u budućnosti dizajnirali farmakološki tretmani za sprječavanje ili liječenje ovisnosti.

Ključne riječi: samoadministracija, psihostimulansi, *Drosophila melanogaster*, preferencijalna konzumacija

Summary

Title: Preferential consumption of psychostimulants in *Drosophila melanogaster*

Addiction is a condition where organism feels a strong psychological or physical need for narcotic substance. Psychostimulative drugs, like cocaine and methamphetamine, affect neural mechanisms involved in the processing of rewards. Because of the rewarding effect of a drug, attraction for a drug leads to addictive behavior. This behavior can be investigated in laboratory animals as preferential consumption. Although there are many assays to measure locomotor effects of cocaine and methamphetamine, a way to measure rewarding influence of psychostimulants in *Drosophila melanogaster* has not yet been developed.

The aim of this thesis was to define the characteristics of preferential consumption for cocaine and methamphetamine in fruit flies as a model organism to study addictive behaviors. In order to do that, we modified the Capillary Feeding (CAFE) assay initially designed to test alcohol dependence. We find that fruit flies willingly self-administrate cocaine and methamphetamine and develop patterns of addictive behavior similar to ones observed in humans and rodent models. Fruit flies actively choose and prefer food with cocaine or methamphetamine despite of bitter taste of these psychostimulants, they continue to consume drugs despite negative consequences and after deprivation develop behaviors similar to relapse. Our results suggest that the development of preferential consumption for cocaine depends on *cycle* gene products, that preference for methamphetamine involves *period*, *Clock* and *cycle* genes, and that dopamine transporter and dopamine receptor type 1 are not involved in the development of preferential consumption.

The use of *Drosophila* in self-administration experiments will be useful in further research on neurological mechanisms of rewarding action of psychostimulants, with final goal of designing pharmacological treatments for prevention and treatment of addiction.

Keywords: self-administration, psychostimulants, *Drosophila melanogaster*, preferential consumption

Sadržaj:

1. Uvod	1
1.1. Ovisnost	1
1.1.1. Mehanizam djelovanja kokaina i metamfetamina.....	2
1.2. Samoadministracija.....	4
1.2.1. Samoadministracija droge unatoč negativnim posljedicama	5
1.2.2. Recidiv	6
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> kao modelni organizam za istraživanje ovisnosti	6
1.3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> u istraživanjima samoadministracije.....	7
1.4. Genetski utjecaj na ovisnička ponašanja	8
1.4.1. Mutanti dopaminskog transportera i receptora	8
1.4.2. Cirkadijalni mutanti.....	9
2. Cilj rada	12
3. Metode i materijali	13
3.1 Uzgoj i priprema mušica za eseje	13
3.2 Kemikalije.....	13
3.3 Bihevioralni esej – CAFE esej.....	14
3.3.1. Utjecaj oznake i lokacije kapilara na preferencijalnu konzumaciju	15
3.4. Statistička obrada rezultata	16
4 Rezultati	18
4.1 Preferencijalna konzumacija kokaina i metamfetamina	18
4.2 Utjecaj oznake i lokacije kapilara na preferencijalnu konzumaciju	22
4.3 Konzumacija droge unatoč negativnim posljedicama	25
4.4 Utjecaj recidiva	29
4.5 Preferencijalna konzumacija kod cirkadijalnih mutanata	31
4.6 Preferencijalna konzumacija mutanata dopaminskog transportera i receptora .	33
5. Rasprava	35
6. Zaključak	43
7. Literatura	45
8. Dodatni materijali	49
9. Životopis.....	55

1. Uvod

1.1. Ovisnost

Ovisnost je stanje u kojem organizam osjeća jaku psihičku ili fizičku potrebu za opojnom supstancom (1). Ovisnost o drogama uključuje niz kognitivnih, psihičkih i fizičkih simptoma pa se karakterizira i kao teška kronična bolest (1). Fizički simptomi očituju se kao tolerancija ili senzitivacija, odnosno, smanjenje ili povećanje bihevioralnog odgovora nakon ponovljenih administracija iste doze droge (2). Psihički simptomi uključuju nekontroliranu potrebu za konzumacijom droge iako je osoba svjesna opasnosti i štetnosti konzumacije (3) te pojavu recidiva (povećane žudnje za drogom nakon perioda apstinencije (2)).

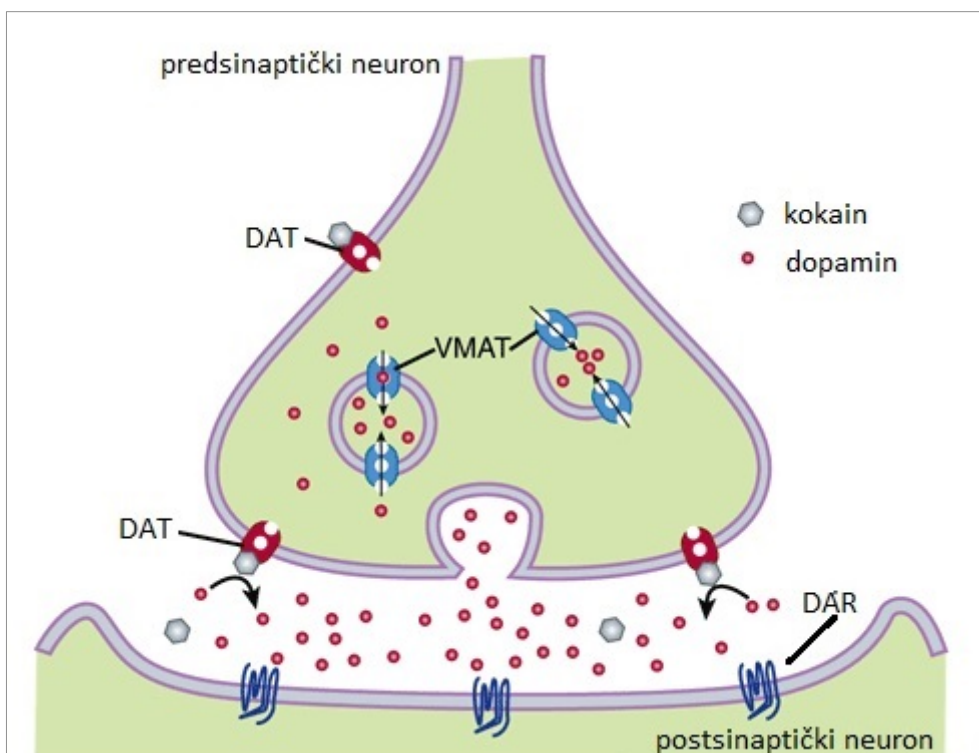
Opetovana konzumacija droga dovodi do dugoročnih promjena funkcije odnosno plastičnosti živčanog sustava u centrima mozga koji reguliraju procesuiranje nagrade (4). Centri za procesuiranje nagrade evoluirali su kako bi procesuirali primarne nagrade neophodne za preživljenje vrste, kao što su hrana i razmnožavanje. Procesuiranje nagrade u mozgu kontrolirano je prvenstveno dopaminergičnim sustavom (4). Primarni molekularni cilj psihostimulansa je blokada dopaminskih transportera koji recikliraju dopamin nakon dopaminske transmisije (5). Konzumacija psihostimulansa remeti dopaminsku transmisiju u centrima za nagradu pa u odsutnosti droge dolazi do povećane privlačnosti droge, koja dovodi do ovisničkog ponašanja i recidiva.

Zbog velike kompleksnosti bolesti, ovisnost je nemoguće ispitivati kao cjelinu u laboratorijskim uvjetima (6), stoga se u istraživanjima mehanizma ovisnosti ispituju jednostavnija ponašanja koja se očituju u bolesti. Osim već spomenutih simptoma tolerancije, senzitivacije i recidiva, kod životinjskih modela ispituje se i samoadministracija droga, kontinuirana konzumacija unatoč negativnim posljedicama i promjene u ponašanju (primjerice promjene spavanja i seksualne aktivnosti) (6–8).

U ovom radu željeli smo ispitati obrasce preferencijalne konzumacije kokaina i metamfetamina u *Drosophila melanogaster* kako bi ukazali mogućnost da mušice imaju slične centre za procesuiranje nagrade te su pogodni modeli za daljnja istraživanja neuroloških mehanizama ovisnosti kod sisavaca.

1.1.1. Mehanizam djelovanja kokaina i metamfetamina

Kokain je alkaloid koji se nalazi u lišću biljke koke. Ima jako psihostimulativno djelovanje zbog čega se često neovlašteno koristi. Mehanizam djelovanja kokaina bazira se na inhibiciji monoaminskih transportera na membrani neurona koji nakon eksitacije postsinaptičke stanice vraćaju neurotransmitere u presinaptičku stanicu (5) (slika 1.). U farmakodinamici kokaina posebice je važan dopaminski transporter čija inhibicija dovodi do povišene razine dopamina u sinaptičkoj pukotini što uzrokuje povećani lokomotorni odgovor i utječe na procesuiranje nagrade (9). Osim na dopaminske, kokain djeluje i na transportere serotonina i noradrenalina (5). Prilikom prvih konzumacija kokain potiče osjećaj ugone s pojačanim radom osjetila. Emocije, osjećaji samosvijesti i važnosti su povišeni dok je anksioznost u takvim trenucima smanjena zbog čega osobe često počinju opetovano konzumirati kokain (10).

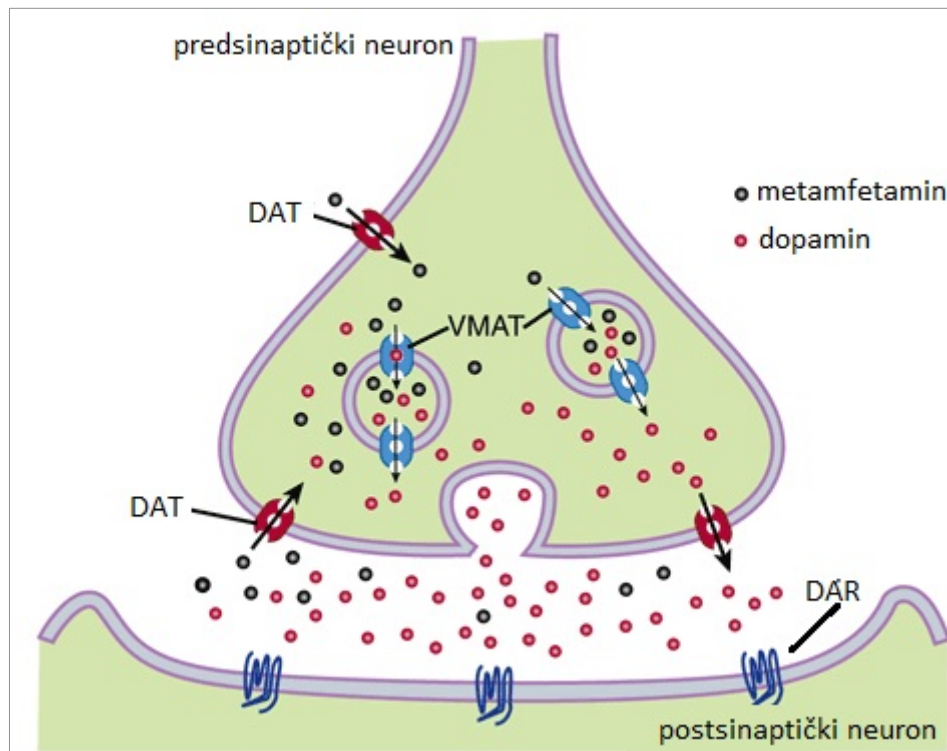


Slika 1. **Mehanizam djelovanja kokaina.** (VMAT- vezikularni monoaminski transporter; DAT- dopaminski transporter; DAR-dopaminski receptor) (11).

Metamfetamin je spoj iz klase amfetamina. Iako se koristi u terapijske svrhe liječenja poremećaja hiperaktivnosti i deficita pažnje (12), često se zlorabljuje zbog psihostimulativnog djelovanja. Za razliku od kokaina, metamfetamin ulazi u neurone i veže se na vezikularne monoaminske transportere tip 2 (VMAT2) (12). Njihovo vezanje potiče redistribuciju monoamina iz skladišnih vezikula u citosol zbog čega dopaminski, noradrenalinski i serotoninški transporter na membrani presinaptičkog neurona pojačano izbacuju monoamine u sinaptičku pukotinu (12) (slika 2.). Obrnuta funkcija monoaminskih transportera onemogućuje povratak neurotransmitera u presinaptičku stanicu. Povišena koncentracija neurotransmitera, posebice dopamina u sinaptičkoj pukotini uzrokuje povećanu uzbuđenost dopaminskih receptora na postsinaptičkoj stanici što uzrokuje povišenu lokomotivnu, stereotipno ponašanje životinja (pojačano čišćenje, kretanje u krug i nekontrolirani pokreti tijela) i psihoze u višim koncentracijama (13).

Iako su primarni efekti i mehanizmi djelovanja kokaina i metamfetamina dobro opisani, nisu još dovoljno razjašnjene dugotrajne posljedice pojačane

dopaminske transmisije na pre- i postsinaptičke neurone, kao i utjecaji psihostimulansa na gensku aktivnost.



Slika 2. **Mehanizam djelovanja metamfetamina.** (VMAT- vezikularni monoaminski transporter; DAT- dopaminski transporter; DAR-dopaminski receptor) (11).

1.2. Samoadministracija

Samoadministracija droga je jedno od karakterističnih ovisničkih ponašanja. Kod životinjskih modela, zbog činjenice da životinje same administriraju drogu, pretpostavljamo da droge djeluju na dopaminski sustav nagrade u mozgu koji potiče motivaciju za uzimanjem droge (14). Povećana razina dopamina i njegovo produženo zadržavanje u sinaptičkim pukotinama neurona uslijed opetovanih konzumacija psihostimulansa dovode do neuroadaptacije u centrima za nagradu što se povezuje s motivacijom za uzimanjem droge u njenoj odsutnosti (8,14).

Razvijene su mnoge metode samoadministracije za istraživanje specifičnih aspekata ovisnosti (15). Droge mogu biti administrirane putem intravenoznih i intramuskularnih injekcija, oralnim putem ili inhalacijom (15). Osim za

razumijevanje faktora koji utječu na ovisnost, ove metode korisne su prilikom karakterizacije genetičkih razlika u preferenciji i inicijalnim studijama o efektima farmakoloških terapija na konzumaciju i preferenciju droga (15). U ispitivanjima samoadministracije kokaina i metamfetamina, osim ljudi, najčešće se koriste modeli miševa, štakora i majmuna.

U istraživanjima na glodavcima, miševi ili štakori moraju napraviti određeni zadatak (primjerice, pritisnuti polugu u kavezu) kako bi dobili jednu dozu psihostimulansa. S druge strane, eksperimenti mogu biti dizajnirani na način da je glodavcima dopušten slobodan izbor između hrane ili vode s ili bez droge sa slobodnim pristupom hrani u svakom trenutku. Ovisno o platformi, moguće je mjeriti volumen konzumirane hrane ili vode s drogom ili broj administracija koje je životinja napravila u određenom vremenu.

U istraživanjima samoadministracije najčešće se koriste miševi i štakori, tek zatim *Drosophila melanogaster* (vinska mušica), dok je kod svih životinjskih modela najčešće ispitivana supstanca etanol.

1.2.1. Samoadministracija droge unatoč negativnim posljedicama

Gotovo u svakom opisu ovisnosti navodi se kako je to poremećaj karakteriziran upotrebom droge unatoč negativnim posljedicama koje ima na ljudski organizam. Kod modelnih organizama ne možemo proučavati utjecaj konzumacije droge na njihov socijalan status, niti možemo biti sigurni je li životinja svjesna štetnosti. Način na koji se ispituje ova karakteristika ovisnosti je da se uz ponuđenu drogu veže odbojan stimulus. Kako bi konzumirale etanol, vinske mušice ignoriraju elektro-šokove (16) ili gorak okus kinina koji je životinjama evolucijski odbojan jer ga povezuju s toksičnošću (17). Na isti način glodavci prebrode odbojne stimuluse zbog velike žudnje ili motivacije za uzimanjem kokaina (18–20). U takvim situacijama možemo reći da modeli konzumiraju drogu unatoč negativnim posljedicama.

1.2.2. Recidiv

U eksperimentima samoadministracije, osim ispitivanja konzumacije droge unatoč negativnim posljedicama, ispituje se i pojava recidiva. Općenito u medicini recidiv označava ponovnu pojavu bolesti. U slučaju ovisnosti, recidiv se očituje kao povećana žudnja za drogom nakon perioda apstinencije. Recidiv se u eksperimentima samoadministracije očituje kao održavanje razine preferencije droge u danima nakon deprivacije na većoj ili jednakoj razini preferencije prije deprivacije(17). U prvoj fazi eksperimenta modelima je ponuđen slobodan izbor između hrane s drogom i hrane bez droge. Zatim slijedi kratkotrajna ili dugotrajna faza deprivacije koja traje ovisno o modelnom organizmu: kod glodavaca kratkotrajne deprivacije traju oko 5 dana, a dugotrajne oko 30 dana, dok su u eksperimentima s mušicama ti periodi skraćeni na jedan, odnosno 2-3 dana (17,18). Pokazalo se kako štakori u danima nakon deprivacije konzumiraju jednaku ili veću količinu hrane s kokainom u usporedbi s količinom konzumiranom dan prije deprivacije (18,21).

1.3. *Drosophila melanogaster* kao modelni organizam za istraživanje ovisnosti

Modelni organizmi neophodni su za izučavanje genetskih i molekularnih mehanizama bolesti jer omogućuju ispitivanja koja se ne mogu provesti na ljudima zbog etičkih ili tehničkih razloga. *Drosophila melanogaster* (vinska mušica) koristi se kao modelni organizam više od 100 godina zbog jednostavnog, jeftinog i brzog uzgoja u laboratoriju. Potpuno sekvencionirani i lako manipulativni genom, visoka homologija s ljudima na nivou gena te funkcionalna očuvanost genetskih interakcija dovela su do velikih otkrića u medicini.

Zbog sličnosti s ljudima u osnovnim procesima neuronske fiziologije, *Drosophila* se sve češće koristi u području neuroznanosti. Iako mušice i sisavci nemaju jednak sustav neurotransmisije, dopaminergični sustav *Drosophile* koji predstavlja glavnu metu djelovanja psihostimulansa, ima veliku homologiju s

čovjekovim. To čini *Drosophila* pogodnom za istraživanja učinka psihostimulansa na promjenu dopaminske neurotransmisije.

U dosadašnjim istraživanjima na *Drosophila* mjerio se učinak volatiliziranog kokaina i oralno administriranog metamfetamina. Kada su izložene niskim koncentracijama volatiliziranog kokaina, mušice imaju povećanu lokomotornu aktivnost i stereotipno ponašanje (pojačano čišćenje, kretanje u krug i nekontrolirani pokreti tijela) kao i sisavci (3). U istraživanjima ponašanja koristilo se video snimanje i praćenje kretanja mušica u arenama. Osim direktnog promatranja, razvijeni su eseji za bolju kontrolu dostave droge i jednostavnije analize ponašanja. Primjerice, eseji za kvantifikaciju negativne geotaksije i pozitivne fototaksije, sustavi za mjerenje lokomocije i preferencijalne konzumacije (3).

Oralno administriran metamfetamin kod mušica potiče pojačanu lokomotornu aktivnost, isprekidanost sna i povećava seksualnu aktivnost kod mužjaka (22). U istraživanjima biheavioralnog odgovora mušica na metamfetamin uglavnom se koriste metode kvantificiranja lokomotorne aktivnosti.

Oba psihostimulansa povećala su lokomotornu aktivnost *Drosophila* što je primijećeno i kod glodavaca (2,23). U oba laboratorijska modela, senzitivacija može biti inducirana jednim izlaganjem životinje volatiliziranom kokainu, no njezin efekt jača nakon ponovljenih administracija i ovisi o vremenskom intervalu između dva izlaganja kokainu (24). Velika sličnost vinskih mušica i glodavaca u razvoju lokomotorne senzitivacije na kokain ukazuje da je mehanizam djelovanja kokaina sličan u oba modela, te kako vinske mušice mogu biti pogodni modeli za ispitivanje ovisnosti o psihostimulansima.

1.3.1. *Drosophila melanogaster* u istraživanjima samoadministracije

Iako već godinama proučavana za potrebe istraživanja ovisnosti, *Drosophila melanogaster* se tek odnedavno počela koristiti u ispitivanjima samoadministracije. Ta se istraživanja uglavnom baziraju na ispitivanju samoadministracije etanola. Mušice pokazuju preferencijalnu konzumaciju hrane u kojoj je pomiješan etanol, naspram ekvivalentne bez etanola (17). Međutim,

kritika studija na mušicama je da je privlačnost etanola kod *Drosophila* evolucijski uvjetovana jer je *Drosophila* evoluirala u okruženju gdje je privlačnost fermentiranog voća povezana s prisutnošću etanola. Psihostimulansi poput kokaina i metamfetamina nisu inherentno privlačni mušicama, štoviše, gorkog su okusa koji je mušicama evolucijski odbojan, pa bi njihova preferencijalna konzumacija bila prikladnija za ispitivanje neuralnih mehanizama nagrađujućeg djelovanja droga.

U pokusima samoadministracije etanola kod *Drosophila* koristi se Capillary feeding (CAFE) esej u kojem mušice imaju slobodan izbor između konzumacije hrane s etanolom i hrane bez etanola, te se preferencija određuje pomoću mjerenja količine hrane koju su pojele u određenom vremenu (25). Iako je prvog dana hrana s etanolom odbojna, preferencija mušica prema etanolu raste tijekom uzastopnih dana (16). Štoviše, mušice su spremne prevazići odbojan okus kinina kako bi konzumirale etanol, što modelira ovisničko ponašanje konzumiranja droge unatoč negativnim posljedicama. U testiranjima pojave recidiva, preferencija mušica prema kokainu ne opada ni nakon perioda deprivacije (17).

U dosadašnjim istraživanjima samoadministracija kokaina i metamfetamina u *Drosophila* nije bila ispitivana.

1.4. Genetski utjecaj na ovisnička ponašanja

1.4.1. Mutanti dopaminskog transportera i receptora

Zbog visoke homologije *Drosophila* i ljudi u genima uključenim u farmakodinamiku (sintezu, transport, sekreciju i metabolizam) i signalnu transdukciju dopamina, studije na *Drosophila* često se koriste kao bazična istraživanja za razumijevanje osnovnih molekularnih mehanizama dopaminske biologije kod viših organizama (26). Kako je dopaminska transmisija u centrima za procesuiranje nagrade u mozgu glavna meta djelovanja psihostimulansa, vinska mušica mogla bi biti dobar modelni organizam za izučavanje ovisnosti o kokainu i metamfetaminu.

Kod vinske mušice pronađena su 3 tipa dopaminskih receptora: tip 1 (D1-like), tip 2 (D2-like) i ne-kanonski tip dopaminskog receptora (eng. non-canonical) (26). D1 i ne-kanonski receptori aktiviraju signalni put cAMP, dok ga D2 receptori inhibiraju (27). Aktivacija dopaminskih receptora D1 koji su isključivo ekspresirani na postsinaptičkim neuronima ima umjereno stimulirajući učinak na lokomotornu aktivnost, dok je uloga receptora D2 mnogo složenija zbog ekspresije na pre- i postsinaptičkim neuronima (28). Mutanti dopaminskog receptora tipa 1 zovu se *dumb* mutanti. U istraživanjima obrazaca pobuđenosti živčanog sustava (pojačane aktivnosti i osjetljivosti na određeni stimulus) pokazano je kako ovi mutanti imaju pojačan odgovor na ponavljajući, kratkotrajni nagli podražaj (startle) tokom dana i smanjenu noćnu uzbuđenost (više spavaju od wt mušica), dok kokain djeluje suprotno na ove obrasce uzbuđenosti (29).

Dopaminski transporter nalaze se na pre- i postsinaptičkim neuronima i sudjeluju u recikliranju dopamina nakon izvršene dopaminske transmisije. U farmakodinamici psihostimulansa predstavljaju glavnu metu vezanja ovih droga. Mutanti *Drosophila* koji nose mutaciju u genu koji kodira za dopaminski transporter zovu se *fumin* (*fmn*) (30). *dumb* i *fumin* koriste se za proučavanje fenotipa koji u temelju molekularnog mehanizma imaju dopaminsku transmisiju, poput procesuiranja nagrade i ponašanja uzrokovana konzumacijom psihostimulansa (31).

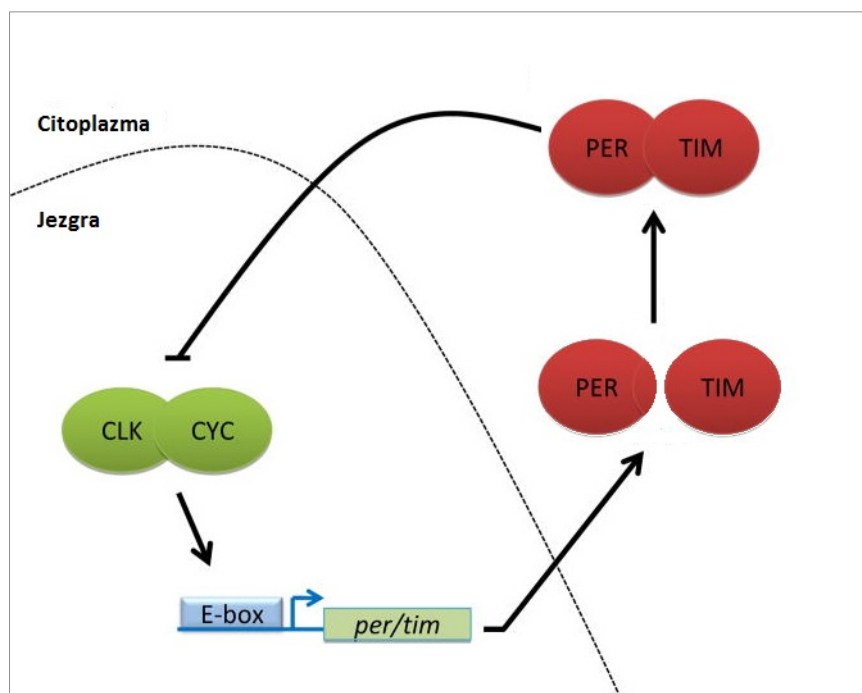
1.4.2. Cirkadijalni mutanti

Cirkadijalni ritmovi su fizičke, psihičke i bihevioralne ritmične promjene u aktivnosti organizma koje prate 24 satni ciklus. Prilagođeni su signalima iz okoliša te osiguravaju da se određeni fiziološki procesi odvijaju u optimalno doba dana i noći. Molekularna osnova cirkadijalnog sata temelji se na oscilacijama aktivacije određenih gena ovisno o dobu dana (32).

Remećenje cirkadijalnih ritmova okolišnim utjecajima ili genetskim promjenama može utjecati na razvoj i progresiju ovisnosti (33). U ispitivanjima na ljudima i životinjama dokazana je povezanost cirkadijalnih ritmova i ovisnosti,

no uzročno-posljedična pozadina veze još nije utvrđena. Ovisnici imaju poremećene cirkadijalne ritmove, no i remećenje cirkadijalnih ritmova može povećati rizik zlouporabe droge i pojave recidiva (33). Studijama na mišjim i štakorskim modelima ispituje se kako promjena funkcije cirkadijalnih gena utječe na neuroplastičnost i ponašanje prilikom konzumiranja droga.

Osnovni mehanizam cirkadijalnog sata kod *Drosophile* čini negativna povratna sprega transkripcije cirkadijalnih gena i proteina kodiranih tim genima (32) (slika 3.). *Clock* (CLK) i *cycle* (cyc) geni kodiraju za transkripcijske faktore CLK i CYC. Heterodimer CLK-CYC veže se na E-box promotorske regije gena *period* (*per*) i *timeless* (*tim*) i potiče njihovu transkripciju. U prisutnosti svjetla protein cryptochrome (CRY) veže se na TIM i potiče njegovu ubikvitinaciju i proteasomalnu razgradnju. *Double time* (DBT) fosforilira PER u suvišku i označuje ga za degradaciju. Kada se u citoplazmi nakupi dovoljna količina PER i TIM proteina stvaraju se PER-TIM heterodimeri koji ulaze u jezgru i potiču fosforilaciju CLK-CYC dimera i time inhibiraju daljnju transkripciju vlastitih *per* i *tim* gena. (34)



Slika 3. **Mehanizam cirkadijalnog sata u *Drosophile*** (34)

Miševi s mutiranim *Clock* genom u pokusima samoadministracije konzumiraju više kokaina od divljeg tipa (35), dok se akutni odgovor mutanata *period* gena (*per1* i *per2*) ne razlikuje od odgovora divljeg tipa (36). Mnoga istraživanja na glodavcima naznačuju ulogu cirkadijalnih ritmova u centrima za procesuiranje nagrade u mozgu i ukazuju na ritmičnost kod simptoma ovisnosti povezanih s istim regijama mozga (37–40). U istraživanjima na *Drosophila* otkriveno je kako mutanti *period*, *Clock*, *cycle* i *doubletime* gena ne razvijaju lokomotornu senzitivaciju na opetovane administracije volatiliziranog kokaina, za razliku od *timeless* mutanata (41). Ovi rezultati ukazuju na utjecaj cirkadijalnih gena u razvoju senzitivacije na kokain. Različiti odgovori mutanata *per* i *tim* gena (čiji produkti u kontroli cirkadijalnih ritmova djeluju sinergistički tvoreći heterodimer PER-TIM) upućuju na različitost uloge cirkadijalnih gena u procesima regulacije razvoja lokomotorne senzitivacije i regulacije cirkadijalnih ritmova (41). Kako bi provjerili odnosi li se ova razlika i na druge odgovore mušica na psihostimulanse (preferencijalnu konzumaciju) ispitali smo samoadministraciju kokaina i metamfetamina *per⁰¹*, *Clk^{Jrk}*, *cyc⁰¹* i *tim⁰¹* mutanata.

Ovim istraživanjem željeli smo istražiti da li mušice samoadministriraju kokain i metamfetamin te pokazati da je Capillary Feeding (CAFE) esej prikladan za istraživanje nagrađujućih i ovisničkih svojstava kokaina i metamfetamina. Ukoliko mušice pokazuju obrasce ovisničkog ponašanja prisutnog kod ljudi, poput preferencijalne konzumacije, konzumiranja droge unatoč negativnim posljedicama i pojave recidiva, ukazati će se mogućnost posjedovanja sličnih centara za procesuiranje nagrade, što čini *Drosophila* pogodnim modelom za daljnja istraživanja neuroloških mehanizama ovisnosti kod sisavaca.

2. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati da li postoji, te ako da definirati karakteristike preferencijalne konzumacije kokaina i metamfetamina kod *Drosophila melanogaster* (vinske mušice) kao modelnog organizma za ispitivanje složenih obrazaca ponašanja povezanih s razvojem ovisnosti o psihostimulansima.

U radu je korišten Capillary Feeding (CAFÉ) esej u kojem su mušice imale slobodan izbor konzumacije hrane s kokainom ili metamfetaminom i hrane bez droge između kojih su aktivno birale. Testirali smo da li mušice preferiraju konzumaciju psihostimulansa tako što smo mjerili količinu konzumirane hrane s drogama naspram hrane bez droga. Dozna ovisnost ispitana je tako što smo napravili eksperimente s različitim koncentracijama kokaina i metamfetamina i odredili s kojima se postiže najjača preferencija droge. Jačina preferencije unatoč negativnim posljedicama ispitana je dodavanjem gorkog okusa u hranu s drogom. Kako bi provjerili postoji li povezanost cirkadijalnih gena i razvoju preferencije testirali smo cirkadijalne mutanate *period*, *timeless*, *Clock* i *cycle* gena. Povezanost dopaminergične transmisije s razvojem preferencije kokaina ispitati smo korištenjem mutanata dopaminskog receptora i transportera.

Rezultati ovog rada omogućit će daljnja istraživanja neuroloških mehanizama koji su u podlozi nagrađujućeg djelovanja psihostimulansa kako bi se u budućnosti mogli dizajnirati farmakološki tretmani za sprječavanje ili liječenje ovisnosti.

3. Metode i materijali

3.1 Uzgoj i priprema mušica za eseje

Drosophila melanogaster uzgaja se u plastičnim bocama s hranom od kukuruznog brašna. Boce s mušicama čuvaju se u inkubatoru na temperaturi oko 22°C i vlazi od 60-75% s izmjenom ciklusa svjetla i mraka od 12 sati. Razvoj mušice od jajašca do odrasle jedinke u ovakvim uvjetima traje 10 do 12 dana. Hrana od kukuruznog brašna priprema se kuhanjem bijelog šećera, agara tip II, kukuruznog brašna i suhog kvasca s dodatkom nipagina i propionske kiseline kako bi se spriječio razvitak plijesni. Svakih dva tjedna potrebno je prebaciti mušice na svježju hranu kako bi im se osigurala dovoljna količina hrane i mjesto za polaganje jajašaca.

U ovom radu korišten je soj *Drosophila melanogaster* Canton S kao wild type (wt), cirkadijalni mutanti: *period* (*per*⁰), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*) i *cycle* (*cyc*) te mutanti u dopaminskom receptoru (*dumb*) i transporteru (*fumin*- *fmn*). Sve eksperimente započinjali su s 3-5 dana starim mužjacima. Sortiranje mužjaka od ženki provedeno je koristeći mikroskop i CO₂ anesteziju.

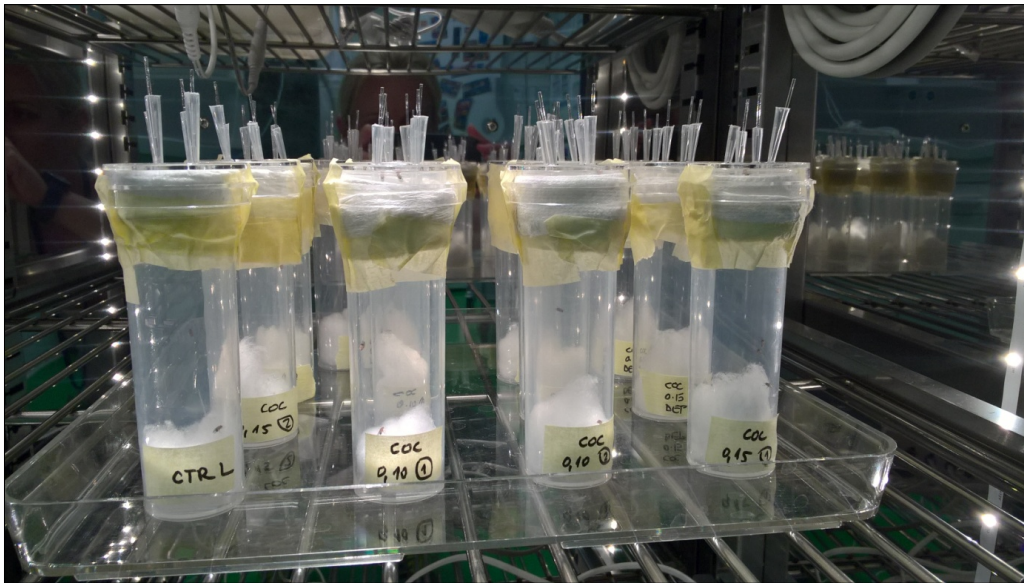
3.2 Kemikalije

U svim eksperimentima PI se izračunavao naspram 100mM otopine saharoze. Droge su ponuđene u 100mM otopinama saharoze s dodatkom kokain hidroklorida u koncentracijama 0,05mg/mL , 0,10 mg/mL, 0,15 mg/mL , 0,20 mg/mL , 0,25 mg/mL , 0,50 mg/mL , 1,00 mg/mL i 1,50 mg/mL ili metamfetamin hidroklorida u koncentracijama 0,10 mg/mL , 0,20 mg/mL , 0,30 mg/mL i 0,40 mg/mL. Kod istraživanja preferencije unatoč negativnim posljedicama koristila se 300μM otopina kinina ili 300 μM otopina kinina s 0,10 mg/mL i 0,15 mg/mL kokain hidroklorida ili 0,10 mg/mL i 0,20 mg/mL metamfetamin hidroklorida.

3.3 Bihevioralni esej – CAFE esej

Capillary feeding (CAFE) esej je esej u kojem je omogućeno odrediti preferenciju mušica pomoću mjerenja količine hrane koju su pojele u određenom vremenu(25). Mušicama je ponuđen slobodan izbor dva izvora hrane između kojih aktivno biraju, a preferencija se određuje kao omjer konzumirane hrane iz oba izvora (3).

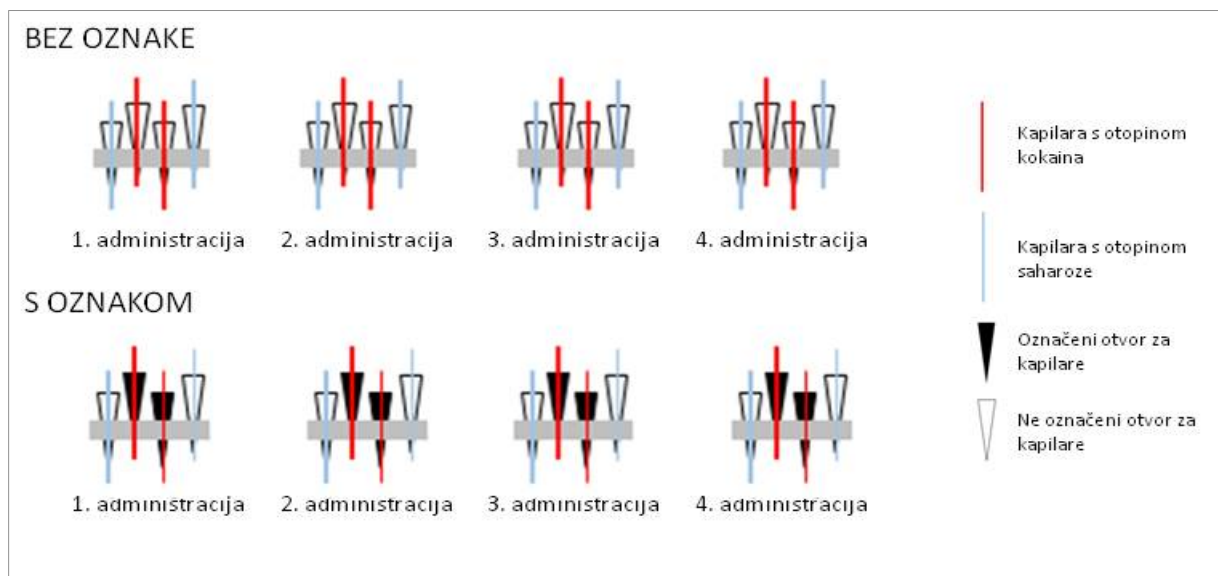
CAFE esej mjeri se u komoricama koje se sastoje od plastičnih vijalica s poklopcem od dna plastične petrijeve posudice s 4 otvora za kapilare s hranom. Da bi se spriječila dehidracija na dno komorice postavi se vata navlažena s 1mL vode. U svaku komoricu prebaci se 6 mušica prethodno anestetiziranih pomoću CO₂. U 5μl kapilaru dodaje se 1-2mm mineralnog ulja kako bi se spriječilo isparavanje hrane, a ostatak se nadopuni otopinom saharoze ili otopinom ispitivane supstance. Kako bi punjenje kapilara bilo moguće, mineralno ulje i hrana moraju prije punjenja biti ohlađeni na 4°C. Prije postavljanja kapilara u komorice, označi se granica između mineralnog ulja i hrane u kapilari, te se izmjeri visina stupca hrane i preračuna u volumen. Dužina od 5mm predstavlja 1μL u 5μL kapilari (promjer kapilare 0,44mm). Kapilare se postavljaju kroz za to predviđene otvore na vrhu komorica na način da se kraj s mineralnim uljem nalazi izvan, a kraj s hranom unutar komorica. Komorice se ostave 24 sata u inkubatoru na temperaturi od 23°C i 70% vlage, s 12 satnom izmjenom svjetlosti i mraka. Sutradan se izmjeri preostala količina hrane u kapilarama, te se one zamijene novima. Postupak izmjene kapilara se ponavlja svakodnevno ovisno o duljini trajanja pokusa. Iz izračunatih volumena pojedene hrane izračunava se indeks preferencije (PI) koji označava preferenciju mušica prema hrani s drogom naspram otopine čiste saharoze. Formula za izračunavanje indeksa je: (količina pojedene hrane s drogom – količina pojedene otopine šećera) / ukupna količina pojedene hrane. PI se izračunava po jednoj komorici za svaku administraciju. Pozitivan PI označava da su mušice više konzumirale otopinu s psihostimulansom dok negativan znači da su je izbjegavale.



Slika 4. **CAFE esej**

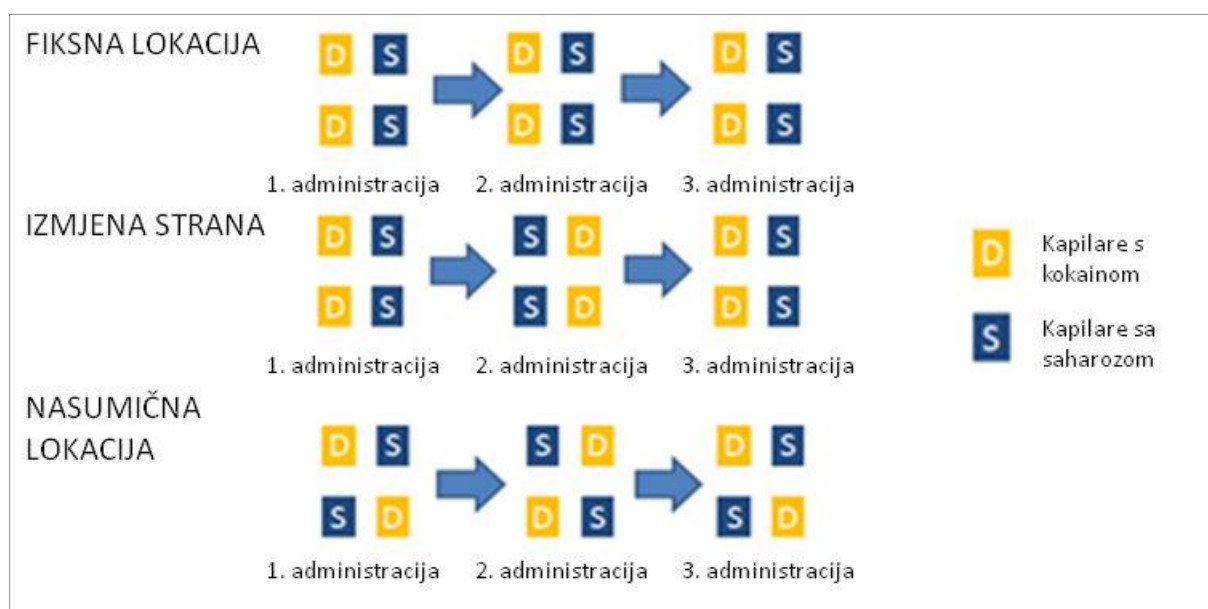
3.3.1. Utjecaj oznake i lokacije kapilara na preferencijalnu konzumaciju

U eksperimentima određivanja utjecaja oznake na preferenciju prema kokainu mušice su bile podijeljene u dvije skupine. Skupina „s oznakama“ bila je smještena u komorice koje su imale označene otvore (crnim obrubom debljine 2mm) kroz koje su prolazile kapilare s otopinom kokaina. U skupini „bez oznaka“ svi otvori izgledali su jednako (slika 5.)



Slika 5. **Shema kapilara u CAFE esej**u postavljenom za istraživanje utjecaja CUE na preferenciju kokaina

U ispitivanju utjecaja razmještaja kapilare s kokainom na preferenciju korištene su komorice s oznakama. Tijekom 4 uzastopna dana kapilare su postavljane na različite načine u trima ispitivanim skupinama: skupina *fiksna lokacija* imala je postavljene kapilare s kokainom svakog dana na istom mjestu na lijevoj strani komorice (L1, L2), skupini *izmjena strana* svakog narednog dana kapilare s kokainom postavljene su na drugu stranu (prvog dana L1,L2; drugog dana D1,D2 itd.), a grupi *nasumična lokacija* mijenjao se raspored kapilara s kokainom na način da su svakog slijedećeg dana bile raspoređene u drugoj dijagonali (prvog dana L1,D2; drugog dana L2, D1 itd.) (slika 6.).



Slika 6. **Shema razmještaja kapilara u CAFE eseju postavljenom za istraživanje utjecaja lokacije kapilara na preferenciju kokaina**

3.4. Statistička obrada rezultata

Statistički testovi su provedeni u programu Statistica 8. Za utvrđivanje razlika PI jedne grupe mušica između dana korištena je ANOVA za ponavljana mjerenja. Za usporedbu prosječnih indeksa preferencije tijekom uzastopnih dana između različitih grupa korišten je t-test za nezavisne uzorke (za 2 grupe), odnosno One-way ANOVA (za 3 ili više grupa). Za utvrđivanje privlačnosti/odbojnosti korišten je one sample t-test. Za usporedbu indeksa

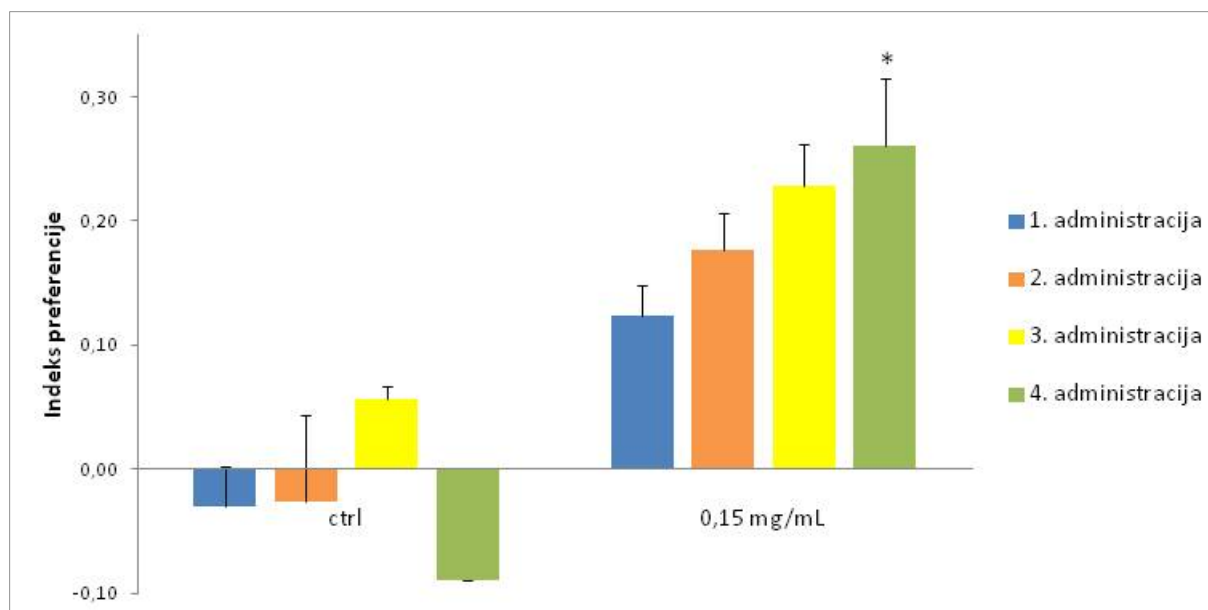
preferencije prema više faktora (tretman i dani) korištena je Repeated measures two-way ANOVA. U svim ANOVA analizama provedena je i post-hoc analiza Tukey's multiple comparison testa. Razina statističke značajnosti iznosi $p < 0,05$.

4 Rezultati

4.1 Preferencijalna konzumacija kokaina i metamfetamina

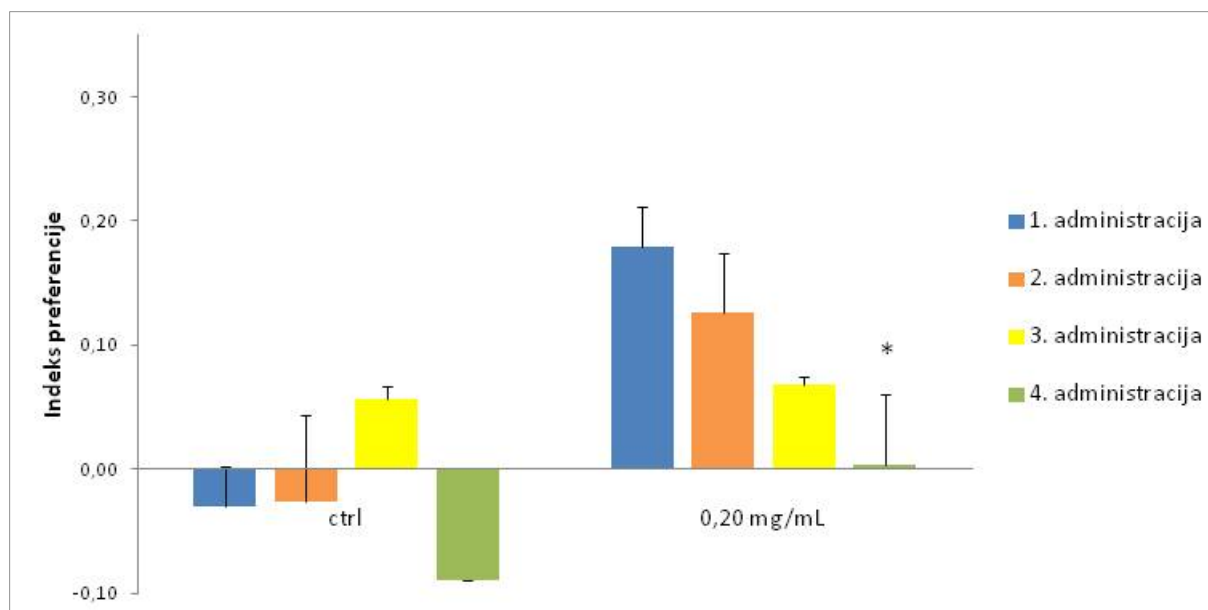
Kako bi ispitili hoće li mušice samovoljno konzumirati psihostimulanse kokain i metamfetamin mjerili smo količinu popijene vodene otopine psihostimulansa u različitim koncentracijama u usporedbi s količinom popijene vodene otopine saharoze koristeći CAFE esej. Rezultati su prikazani u obliku indeksa preferencije (preference indeks - PI) izračunatog prema formuli: (količina pojedene hrane s drogom – količina pojedene otopine šećera) / ukupna količina pojedene hrane. Pozitivan PI označava da su mušice više konzumirale otopinu s psihostimulansom dok negativan znači da su je izbjegavale i više konzumirale otopinu čiste saharoze.

Mušice već prilikom prve administracije pokazuju preferenciju prema kokainu koja tijekom uzastopnih dana raste (slika 7.)(ANOVA za ponavljana mjerenja, $p < 0,05$). U usporedbi između pojedinih administracija indeks preferencije četvrtog dana bio je značajno viši od indeksa preferencije prvog dana (Tukey's multiple comparison test, $p < 0,05$). Kao kontrolu koristili smo jednako postavljan CAFE esej gdje je u svim kapilarama bila otopina saharoze. Na slici možemo vidjeti kako kontrolna skupina nije pokazala preferenciju tijekom uzastopnih dana (one sample t test, $p > 0,05$) niti se ona statistički razlikovala između administracija (ANOVA za ponavljana mjerenja, $p > 0,05$). To ukazuje da je razlog preferencije kokaina sadržaj kapilare, a ne njen položaj ili neki drugi vanjski utjecaj zbog kojeg bi mušice mogle preferirati određene kapilare više od drugih. Eksperiment je ponovljen i s otopinama kokaina u koncentracijama 0,05mg/ml, 0,10mg/ml, 0,20mg/ml gdje je uočen isti trend (slika 1. u dodatnim materijalima).

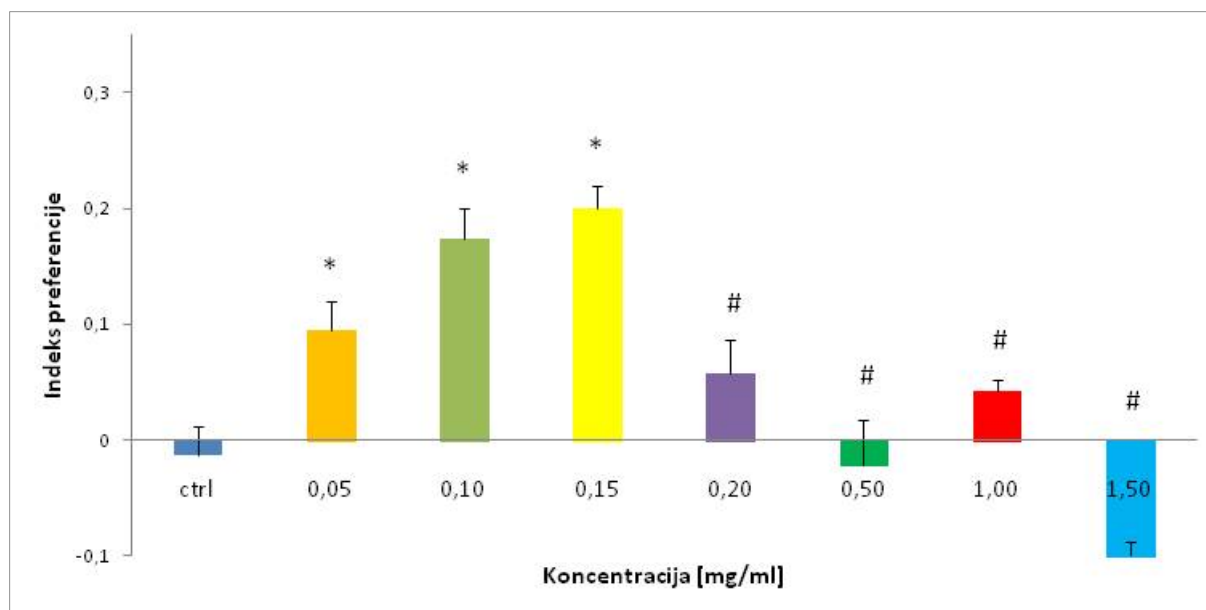


Slika 7. **Preferencijalna konzumacija kokaina kod *Drosophila* raste tijekom uzastopnih dana.** U eksperimentu su korišteni mužjaci stari 7 dana koji su se hranili otopinama iz 4 kapilare. Kontrolna skupina imala je vodenu otopinu saharoze u sve četiri kapilare dok se ispitivanoj skupini u dvije kapilare nalazila otopina saharoze, a u druge dvije vodena otopina kokaina u koncentraciji 0,15mg/ml. Volumen ispijene tekućine mjeren je svakih 24 sata te je preračunat u indeks preferencije. Eksperiment je ponavljen 2 puta s 2 tube od kojih se u svakoj nalazilo po 6 mušica (n=24). Za utvrđivanje razlika indeksa preferencije između dana korištena je ANOVA za ponavljana mjerenja, Tukey's multiple comparison * $p < 0,05$.

Na isti način napravljen je eksperiment kako bi se ispitala preferencija prema metamfetaminu. Pokazalo se kako je prilikom prve administracije preferencija mušica prema otopini metamfetamina koncentracija 0,20mg/ml pozitivna, no za razliku od kokaina, ona tijekom uzastopnih dana opada (slika 8.) (ANOVA za ponavljana mjerenja, Tukey's multiple comparison $p < 0,05$).

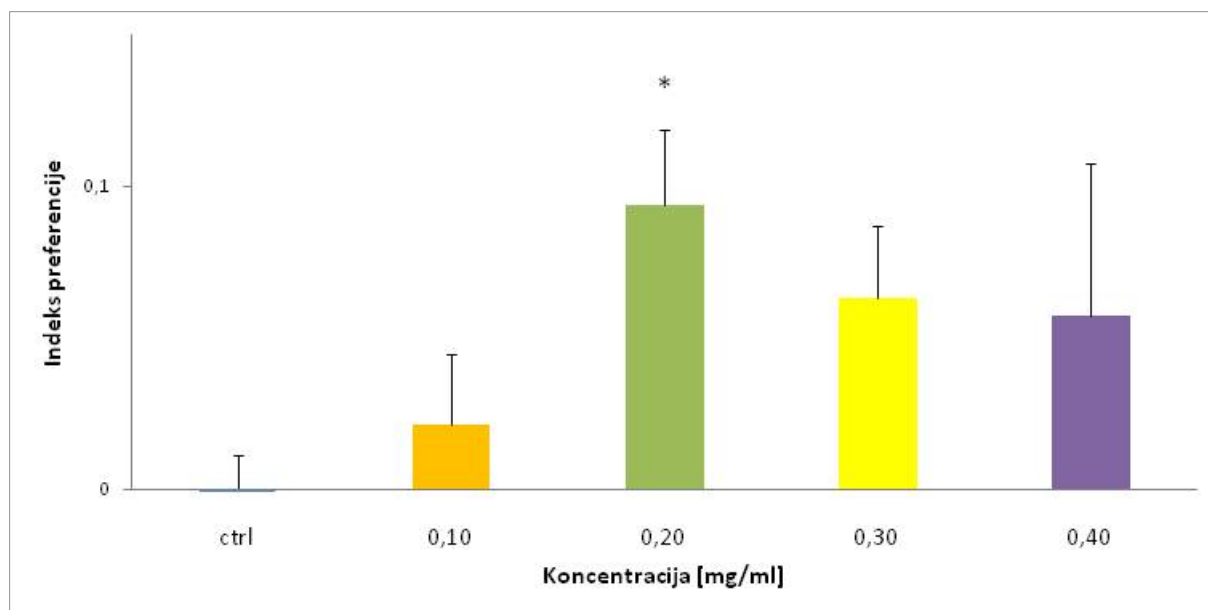


Slika 8. **Preferencijalna konzumacija metamfetamina kod *Drosophile* pada tijekom uzastopnih dana.** U eksperimentu su korišteni mužjaci stari 7 dana koji su se hranili otopinama iz 4 kapilare. Kontrolna skupina imala je vodenu otopinu saharoze u sve četiri kapilare dok se ispitivanoj skupini u dvije kapilare nalazila otopina saharoze, a u druge dvije vodena otopina metamfetamina u koncentraciji 0,20mg/ml. Volumen ispijene tekućine mjereno je svakih 24 sata te je preračunato u indeks preferencije. Eksperiment je ponovljen 2 puta s 2 tube od kojih se u svakoj nalazilo po 6 mušica (n=24).). Za utvrđivanje razlika indeksa preferencije između dana korištena je ANOVA za ponavljana mjerenja, Tukey's multiple comparison $p < 0,05$.



Slika 9. **Ovisnost indeksa preferencije i koncentracije kokaina.** Mušicama je tijekom 5 dana ponuđen izbor između otopine čiste saharoze i otopine kokaina različitih koncentracija: 0,05mg/ml, 0,10mg/ml, 0,15mg/ml, 0,20mg/ml, 0,50mg/ml, 1,00mg/ml i 1,50mg/ml. Kontrolna skupini dana je otopina čiste saharoze u svim kapilarama. Na slici su prikazani prosječni indeksi preferencije kokaina tijekom 5 uzastopnih dana za svaku koncentraciju. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu, # $p < 0,05$ u odnosu na skupine 0,10mg/ml i 0,15mg/ml (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison).

Kako bi utvrdili ovisi li preferencija psihostimulansa o koncentraciji otopine, te kako bi saznali koje koncentracije su najoptimalnije za daljnja istraživanja ponovili smo pokuse s različitim koncentracijama kokaina i metamfetamina. Na slici 9 prikazani su prosječni indeksi preferencije kokaina tijekom 5 uzastopnih dana. Skupine koje su imale izbor između otopine čiste saharoze i otopine kokaina koncentracija 0,05mg/ml, 0,10mg/ml i 0,15mg/ml imale su pozitivnu preferenciju prema kokainu koja se statistički značajno razlikovala od preferencije kontrolne skupine ($p < 0,05$ One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison). Preferencija prema koncentracijama višim od 0,15mg/ml nije se razlikovala od kontrole. Te su preferencije bile značajno niže od preferencija prema otopinama koncentracija 0,10mg/ml i 0,15mg/ml ($p < 0,05$ One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison) te su čak neke imale negativne vrijednosti (odbojnost prema kokainu). Stoga je odlučeno kako će se u daljnjim pokusima koristiti otopine koncentracija 0,10mg/ml i 0,15mg/ml.



Slika 10. **Ovisnost indeksa preferencije i koncentracije metamfetamina.** Mušicama je tijekom 5 dana ponuđen izbor između otopine čiste saharoze i otopine metamfetamina različitih koncentracija: 0,10mg/ml, 0,20mg/ml, 0,30mg/ml, i 0,40mg/ml. Kontrolna skupini dana je otopina čiste saharoze u svim kapilarama. Na slici su prikazani prosječni indeksi preferencije metamfetamina tijekom 5 uzastopnih dana za svaku koncentraciju. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison).

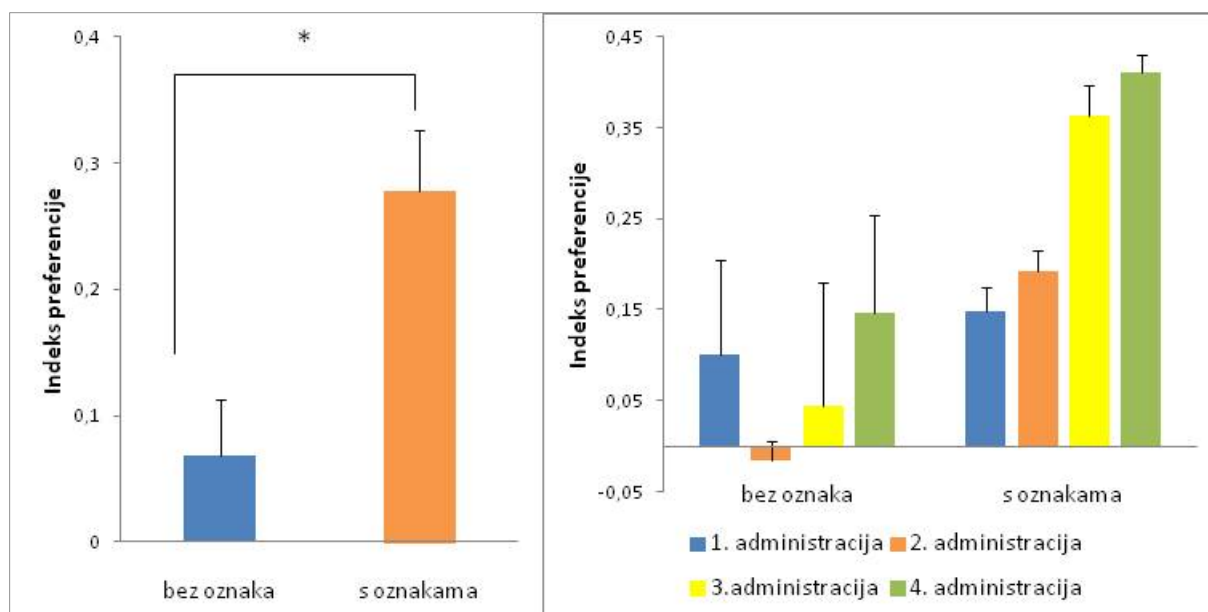
Preferencija prema metamfetaminu ispitana je s otopinama koncentracija 0,10mg/ml, 0,20mg/ml, 0,30mg/ml i 0,40mg/ml. Samo se prosječna preferencija prema otopini metamfetamina od 0,20mg/ml statistički značajno razlikovala od kontrole (slika 10.) ($p < 0,05$ One way ANOVA, Tukey's multiple comparison) pa je odlučeno kako će ta koncentracija biti korištena u slijedećim pokusima.

4.2 Utjecaj oznake i lokacije kapilara na preferencijalnu konzumaciju

Kontrolama smo ustanovili kako mušice nemaju određenu preferenciju prema pojedinim kapilarama ukoliko se u svima nalazi otopina čiste saharoze. Da bi utvrdili da li učenje utječe na preferencijalnu konzumaciju, ispitali smo PI u komoricama s fizičkom oznakom (cue) na kapilarama s psihostimulansom. Ako je

PI veći kada postoji fizička oznaka na kapilari s drogom to znači da mušice povezuju fizičku oznaku s drogom i tokom dana ciljano piju iz označenih kapilara.

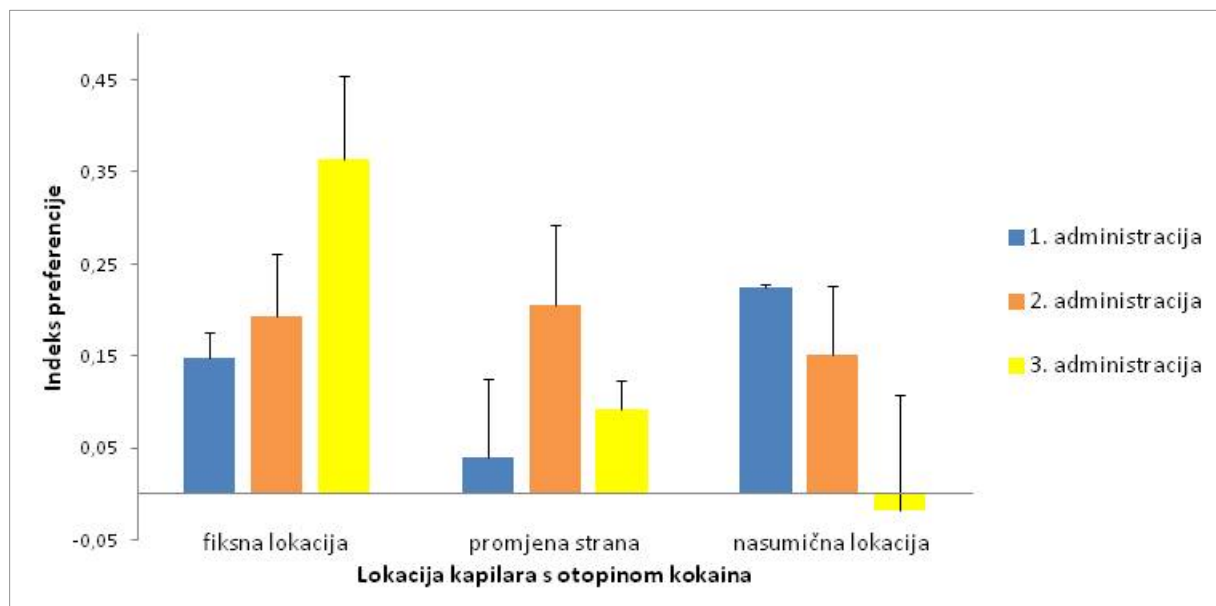
Jednu grupu mušica postavili smo u komorice kojima su dva otvora kroz koje su prolazile kapilare s kokainom koncentracije 0,15mg/ml bila označena crnim rubom širine 2mm, a drugu u komorice kod kojih kapilare s drogom nisu imale označene otvore. Pokazalo se da je PI mušica prema kokainu značajno viši ukoliko su otvori za kapilare sa drogom jasno obilježeni od slučaja kada su svi otvori jednaki (slika 11.a) (T test za nezavisne uzorke, $p < 0,01$). PI mušica s označenim kapilarama je tijekom uzastopnih dana imao stabilni trend rasta što kod mušica koje nisu imale označene kapilare s drogom nije bio slučaj (slika 11.b). Statistički, indeksi preferencije unutar skupine s oznakama međusobno su se razlikovali po administracijama (ANOVA za ponavljana mjerenja, $p < 0,05$), dok u grupi bez oznaka nije bilo značajne razlike (ANOVA za ponavljana mjerenja, $p > 0,05$). Označene komorice uvrstili smo u standardni protokol CAFE eseja i korištene su u svim slijedećim eksperimentima.



Slika 11. **Preferencijalna konzumacija kokaina kod *Drosophila* ovisi o oznaci na komorama.** Mušicama su dane dvije kapilare s otopinom čiste saharoze i dvije s otopinom kokaina koncentracije 0,15mg/ml. Jedna skupina imala je označene otvore kapilara u kojima se nalazila droga, dok se kod druge otvori sve četiri kapilare nisu razlikovali. Na slici (a) prikazani su prosječni indeksi preferencije za četiri

administracije. * $p < 0,01$ (t test za nezavisne uzorke). Na slici (b) prikazani su indeksi preferencije po administracijama (ANOVA za ponavljana mjerenja, $p = 0,05$)

Zatim smo željeli ispitati ima li razmještaj označene kapilare s drogom tijekom uzastopnih dana utjecaj na preferenciju konzumacije. To je ispitano na način da su kapilare s 0,15mg/ml (slika 12.) i 0,10mg/ml (slika 2. u dodatnim materijalima) kokaina postavljene svaki dan na isto mjesto (grupa fiksna lokacija), ili se njihova lokacija izmjenjivala po stranama (grupa izmjenjena strana) ili po dijagonalama (grupa nasumična lokacija). Pokazalo se da ukoliko se kapilare s drogom nalaze svakog dana na istom mjestu, preferencija mušica prema kokainu je pozitivna i raste (one sample t test, $p < 0,01$). Kada se svakog dana mijenja strana na kojoj se nalazi droga („promjena strana“) preferencija prema kokainu je pozitivna no nema zadanog obrasca ponašanja, dok se prilikom mijenjanja lokacije u dijagonalama („nasumična lokacija“) smanjuje. Prosječna preferencija prema kokainu nije razlikovala po grupama (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, $p > 0,05$). U eksperimentima s koncentracijom kokaina 0,10mg/ml dobiveni su slični rezultati (nije prikazano).

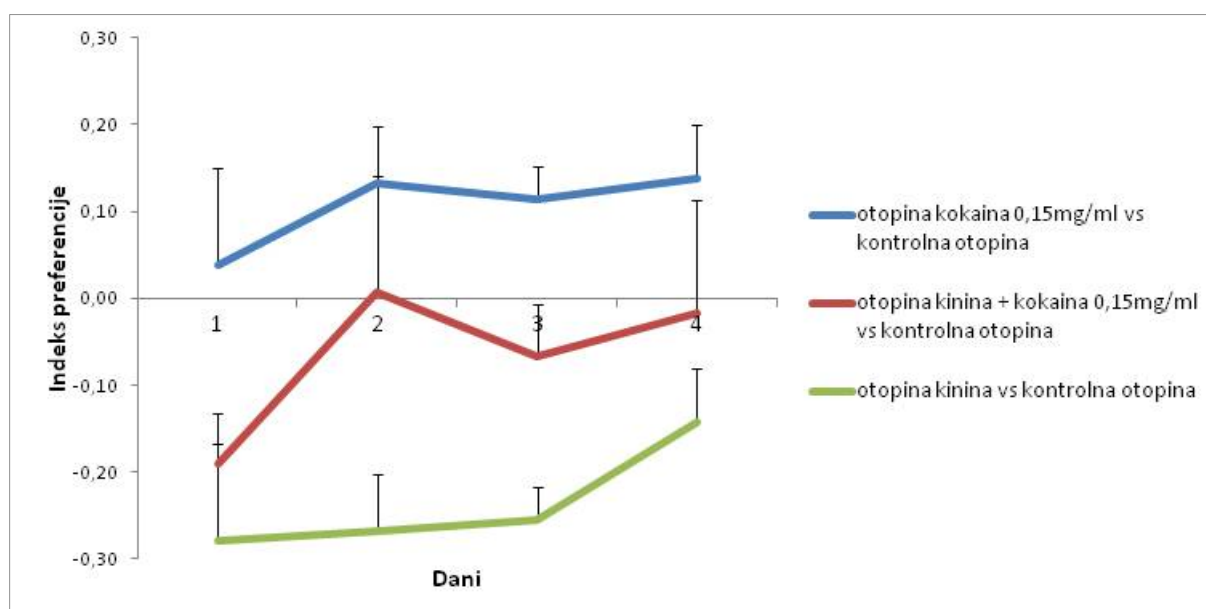
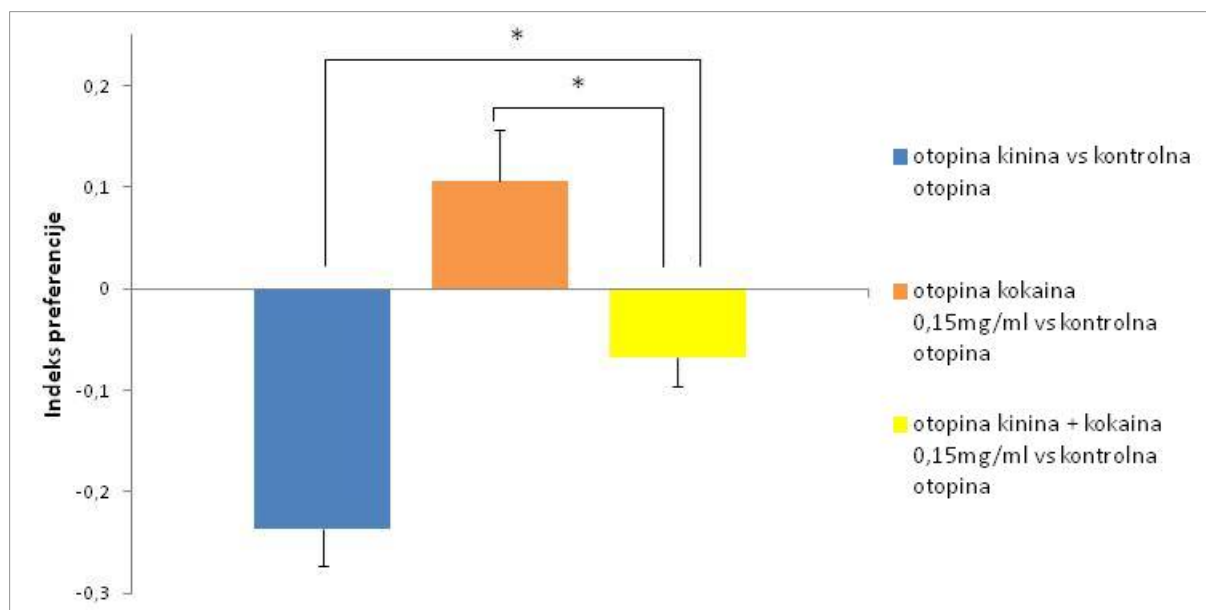


Slika 12. **Preferencijalna konzumacija kokaina kod *Drosophila* tijekom uzastopnih dana ovisi o lokaciji kapilara s drogom.** Mušicama su dane dvije kapilare s otopinom čiste saharoze i dvije s otopinom kokaina koncentracije 0,15mg/ml. Skupina „fiksna lokacija“ dobivala je svakog dana kapilare s kokainom na istoj lokaciji, skupini „promjena strana“ kapilare s kokainom su davane svakog dana na drugoj strani komorice, a skupini „nasumična lokacija“ se lokacija izmjenjivala u dijagonalama. U

eksperimentu je korišteno po dvije komorice za svaku skupinu, u kojoj od svake se nalazilo po 6 mušica (n=36). Razlike između grupa utvrđivane su One-way ANOVOM, Tukey's multiple comparison, p=0,05.

4.3 Konzumacija droge unatoč negativnim posljedicama

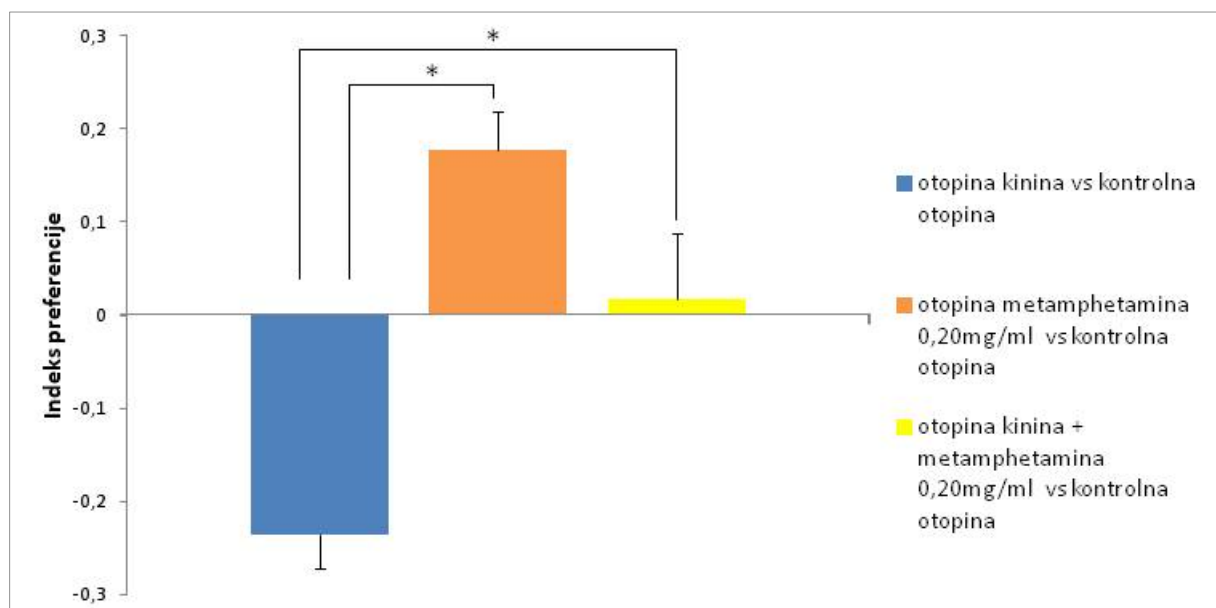
Kako bi ispitali imaju li mušice slične obrasce ovisničkog ponašanja kao i ljudi, ispitali smo hoće li mušice same administrirati drogu iako to dovodi do negativnih posljedica. U radu Heberlein et al.(17) negativna posljedica za muhu je gorak okus kinina. Stoga smo napravili eksperiment s 3 skupine: kontrolna skupina imala je standardni izbor između otopine s kokainom (0,10mg/ml ili 0,15mg/ml) i otopine saharoze, u drugoj smo mjerili da li postoji preferencija za kinin (izbor 300 μ M otopine kinina naspram otopine saharoze), a u trećoj smo mjerili da li mušice preferiraju kokain ako se u njega doda kinin (izbor između otopine kokaina (0,10mg/ml i 0,15mg/ml) s kininom koncentracije 300 μ M naspram otopine čiste saharoze).

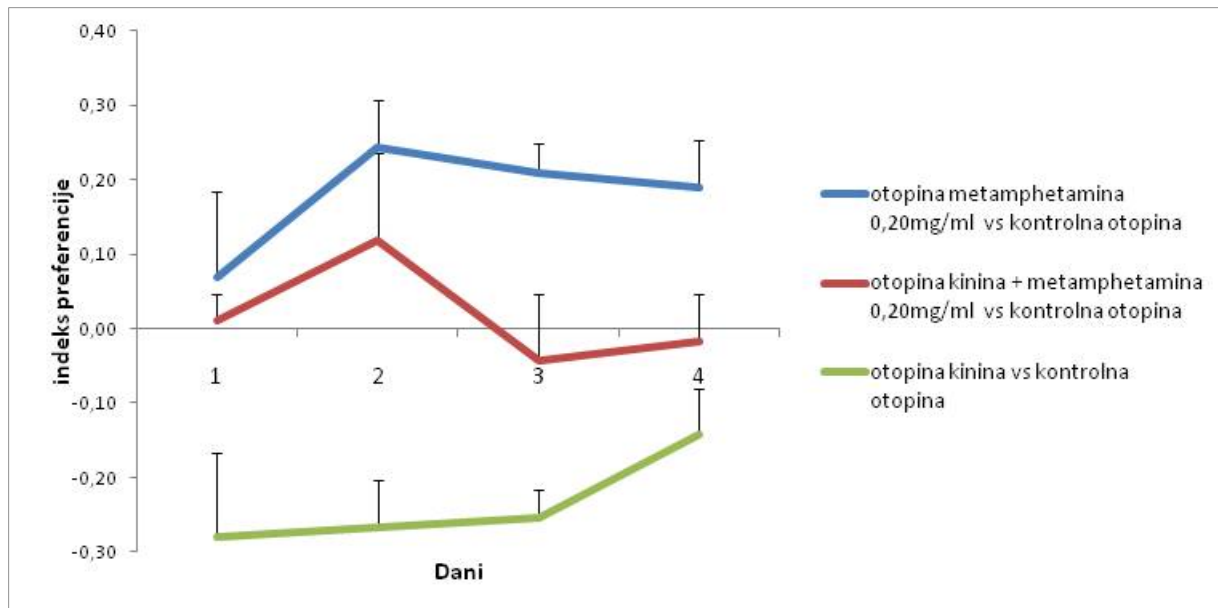


Slika 13. Mušice samoadministriraju kokain unatoč gorkom okusu kinina. Mušice su razdvojene u tri skupine te im je tokom 4 dana pružen izbor administracije: 1) 300 μ M otopine kinina naspram otopine saharoze, 2) otopine kokaina koncentracije 0,15mg/ml naspram otopine saharoze i 3) otopine 300 μ M kinina i kokaina koncentracije 0,15mg/ml naspram saharoze. Nakon svakog dana izmjerena je količina popijenih otopina te je izračunat indeks preferencije prema svakoj od otopina naspram otopini saharoze. Na slici (a) prikazani su prosječni indeksi preferencije za četiri administracije. * $p < 0,001$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison). Na slici (b) prikazani su indeksi preferencije po danima. Za analizu je korišten one-sample t test, $n = 8$.

U kontrolnoj grupi potvrdili smo da mušice imaju preferenciju prema kokainu (pozitivan prosječan PI od 0,11). Kada je ponuđen izbor između otopine saharoze i otopine kinina, mušice su izbjegavale kapilare s kininom (negativan prosječan PI od -0,24). Prema otopini kinina i kokaina mušice su također pokazivale negativan PI (prosječni PI -0,07), no ona je imala statistički značajno viši PI od otopine samog kinina (slika 13.a). Razlike prosječnih indeksa preferencije grupa statistički su značajne na razini $p < 0,001$ (One-way ANOVA). Tukey's multiple comparison testom potvrđeno je kako su se sve grupe međusobno razlikovale sa značajnošću $p < 0,05$. Slika 13.b) pokazuje kako se trend porasta indeksa preferencije uzastopnih dana nastavlja, odnosno kod obje otopine s kokainom (sa i bez dodatka kinina) indeks preferencije raste. Tokom svih dana otopina kinina je bila odbojna (one sample t-test, $p < 0,05$),

Isti eksperiment ponovljen je s koncentracijom kokaina 0,10mg/ml, te su dobiveni slični rezultati (slika 3. u dodatnim materijalima).



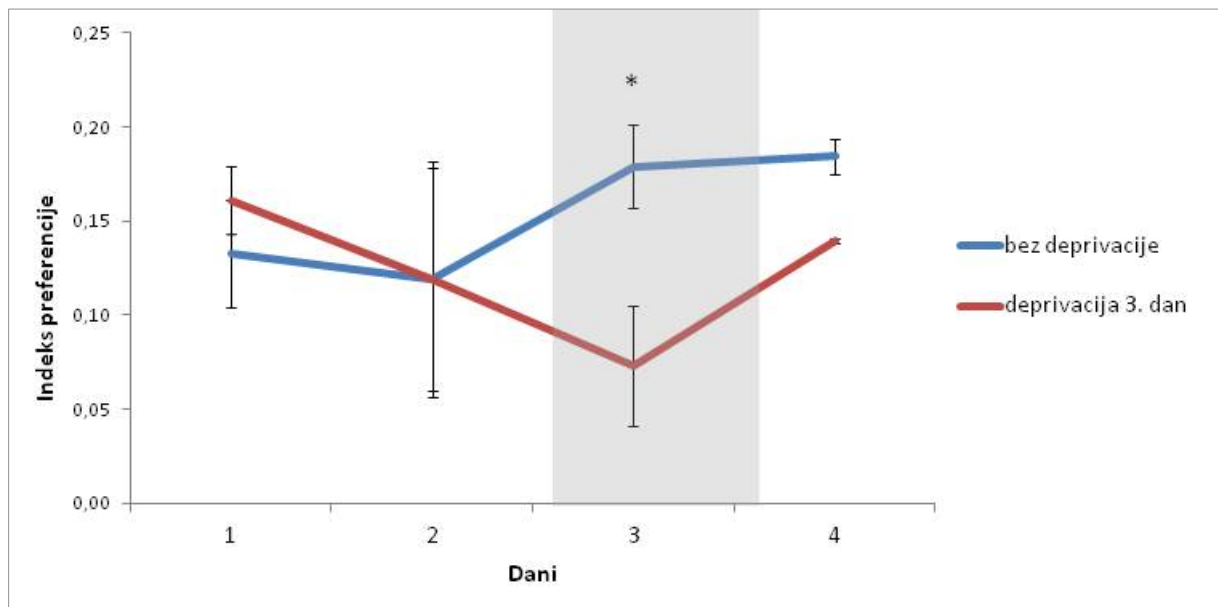


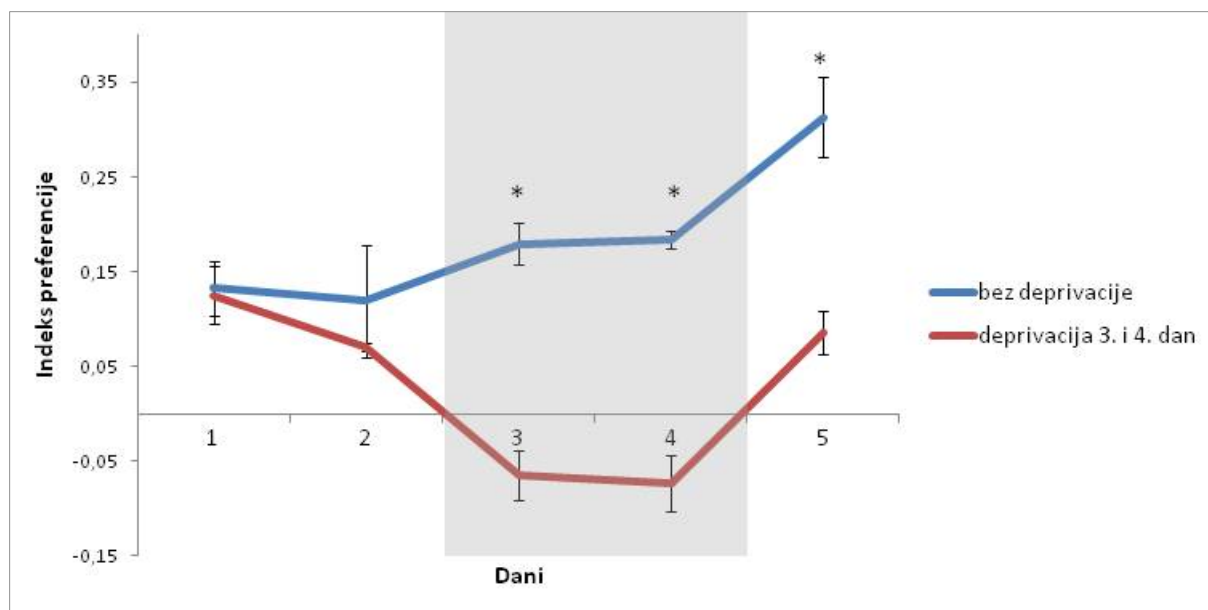
Slika 14. **Mušice samoadministriraju metamfetamin unatoč gorkom okusu kinina.** Mušice su razdvojene u tri skupine te im je tokom 4 dana pružen izbor administracije: 1) 300 μ M otopine kinina naspram otopine saharoze, 2) otopine metamfetamina koncentracije 0,20mg/ml naspram otopine saharoze i 3) otopine 300 μ M kinina i metamfetamina u koncentraciji od 0,20mg/ml naspram saharoze. Nakon svakog dana izmjerena je količina popijenih otopina te je izračunat indeks preferencije prema svakoj od otopina naspram otopini saharoze. Na slici (a) prikazani su prosječni indeksi preferencije za četiri administracije. * $p < 0,001$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison). Na slici (b) prikazani su indeksi preferencije po danima. Za analizu je korišten one-sample t test, $n=8$.

Isti eksperiment ponovljen je s otopinom metamfetamina koncentracije 0,10mg/ml i 0,20mg/ml. Mušice su pokazale preferenciju prema otopini s metamfetaminom (prosječan PI 0,18), te odbojnost prema otopini kinina (kontrola jednaka onoj iz pokusa s kokainom, prosječan PI -0,24). Prema otopini s metamfetaminom i kininom pokazana je slaba preferencija naspram otopini čiste saharoze (prosječan PI 0,02). Ova otopina imala je statistički značajno povišen indeks preferencije u usporedbi s otopinom kinina (slika 14.a) (One-way Anova, Tukey's multiple comparison $p < 0,001$). Tijekom uzastopnih dana indeks preferencije otopine kinina i metamfetamina je opadao, dok je otopina samog kinina tijekom svih dana bila odbojna (slika 14.b) (one sample t test, $p < 0,05$).

4.4 Utjecaj recidiva

U ispitivanju utjecaja recidiva korišten je CAFE esej postavljen prema protokolu bez oznaka. Recidiv je mjereno nakon jednog ili dva dana deprivacije kada mušice nisu imale pristup drogi. U danima deprivacije u svim kapilarama nalazila se otopina saharoze te je PI izračunat za kapilare na lokacijama na kojima se prethodnog i slijedećeg dana nalazila otopina 0,10mg/ml kokaina, stoga on ne predstavlja preferenciju prema kokainu već prema određenoj poziciji kapilara. Radi lakšeg praćenja rezultata, ti su dani osjenčani na grafovima.





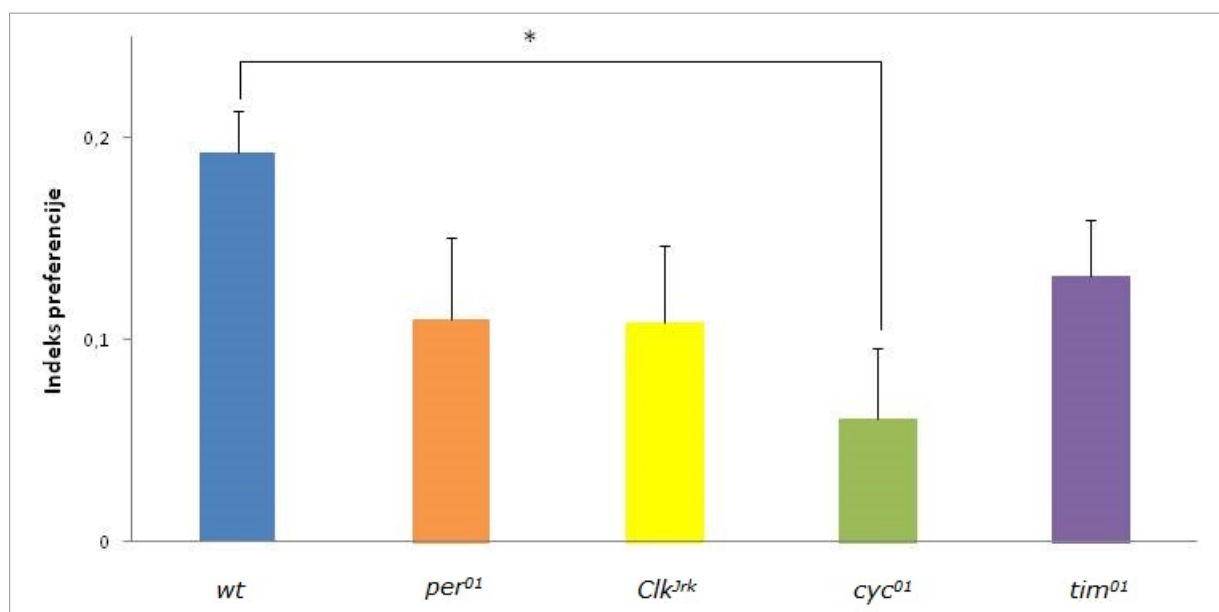
Slika 15. **Utjecaj recidiva na preferencijalnu konzumaciju kokaina.** Tokom 5 dana mjerena je količina popijene hrane s kokainom koncentracije 0,10mg/ml naspram otopine čiste saharoze te su rezultati preračunati u indeks preferencije prema kokainu. Na slici a) prikazana je usporedba grupa koje su svakog dana imale izbor između otopine kokaina i čiste otopine saharoze (bez deprivacije) i grupa koje trećeg dana nisu imale pristup kokainu (deprivacija 3. dan). Na slici b) prikazana je usporedba grupa bez deprivacije i grupa koje nisu imale pristup kokainu 3. i 4. dan. Rezultati su prikazani kao srednja aritmetička sredina indeksa preferencije \pm standardna pogreška. * $p < 0,05$ u odnosu na PI druge grupe istog dana administracije (Repeated measures two way ANOVA, Tukey's multiple comparison). Za usporedbu indeksa preferencije unutar depriviranih grupa također je korištena Repeated measures two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, $p = 0,05$.

U ovom eksperimentu recidiv se očituje kao održavanje preferencije u danima nakon deprivacije na većoj ili jednakoj razini preferencije prije deprivacije. Nakon jednodnevne deprivacije (slika 15.a) preferencija kokaina četvrtog dana pokusa nije se statistički značajno razlikovala od preferencije iste grupe prije deprivacije (drugog dana) (Repeated measures two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, $p > 0,05$). U slučaju dvodnevne deprivacije (slika 15.b) indeks preferencije kokaina je nakon deprivacije (peti dan) ponovno porastao na razinu prije deprivacije (drugog dana) ($p > 0,05$). Time su u oba eksperimenta zadovoljeni su uvjeti recidiva. Kod jednodnevne deprivacije značajne razlike između deprivacijske i kontrolne grupe bez deprivacije postojale su samo kada ispitivana grupa nije imala pristup kokainu ($p < 0,05$). U eksperimentu dvodnevne deprivacije preferencija deprivacijske grupe se osim u

danima bez kokaina značajno razlikovala od preferencije kontrolne grupe i petog dana eksperimenta (Repeated measures two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, $p < 0,05$).

4.5 Preferencijalna konzumacija kod cirkadijalnih mutanata

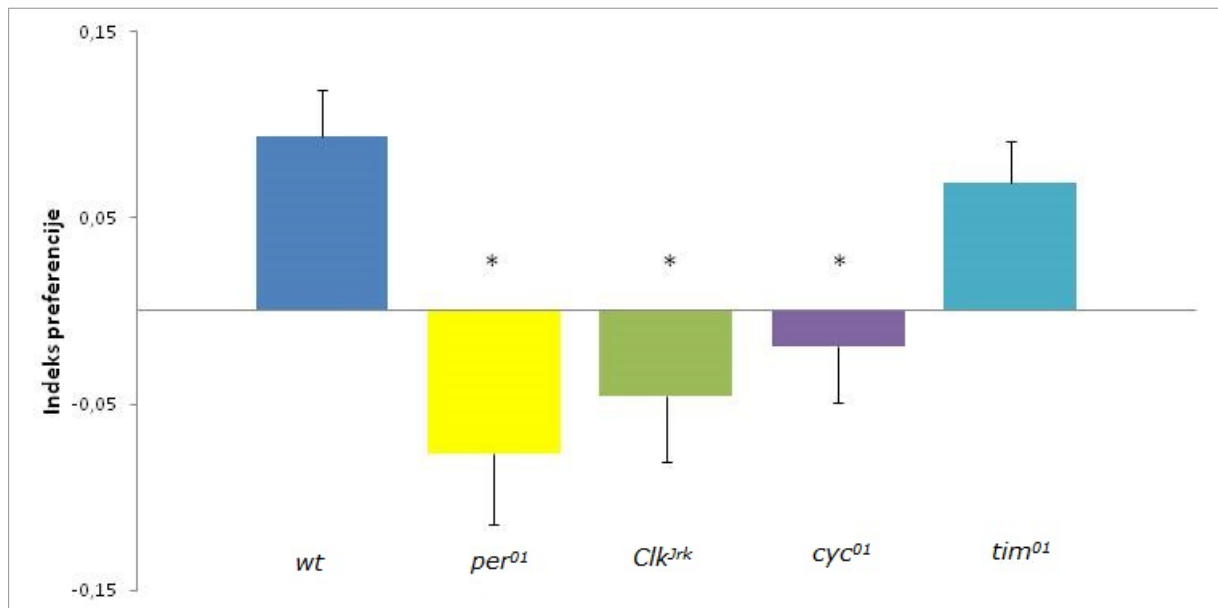
Budući da su cirkadijalni geni *period*, *clock* i *cycle* povezani s odgovorom i razvojem senzitivacije na kokain (Andretić et al.(41)), željeli smo ispitati utječu li na preferencijalnu konzumaciju. U pokusima su korištene *wild type* (*wt*) kontrole te 4 cirkadijalnih mutanata: *per⁰¹*- mutanti za *period* gen, *Clk^{Jrk}*- mutanti za *Clock* gen, *cyc⁰¹*- mutanti za *cycle* gen i *tim⁰¹*- mutanti za gen *timeless*. Pokusi su izvedeni prema standardnom protokolu s oznakama s otopinom kokaina koncentracije 0,15mg/ml. Indeks preferencije 4 administracije svih mutanata bio je niži od indeksa preferencije *wt* mušica, no samo kod *cyc⁰¹* mutanata je ta razlika bila statistički značajna (slika 16.) ($p < 0,05$ one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison).



Slika 16. **Cyc⁰¹** cirkadijalni mutanti imaju smanjenu preferenciju prema kokainu od *wt* mušica. Mušice su bile podijeljene u grupe prema genotipu: *wt*- *wild type*, *per⁰¹*- mutanti za *period* gen, *Clk^{Jrk}*- mutanti za *Clock* gen, *cyc⁰¹*- mutanti za *cycle* gen i *tim⁰¹*- mutanti za gen *timeless*. Tokom pet dana mušicama je dan izbor između otopine kokaina koncentracije 0,15mg/ml i otopine čiste saharoze. Svakih 24 sata izmjerena je količina popijene otopine koja je preračunata u indeks preferencije. Na grafu

je prikazan prosječan indeks preferencije tokom 4 administracije za svaki genotip. Za utvrđivanje razlike između grupa korištena je one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison * $p < 0,05$.

U ispitivanju preferencijalne konzumacije metamfetamina korištene su mušice istog genotipa kojima je ponuđen izbor otopine metamfetamina koncentracije 0,20mg/ml. Na slici 17. prikazane se su prosječne vrijednosti indeksa preferencije tijekom 4 administracije. *tim⁰¹* mutanti imali su pozitivnu prosječnu preferenciju prema metamfetaminu koja se nije statistički razlikovala od PI *wt* mušica ($p > 0,05$ one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison). *per⁰¹*, *Clk^{Jrk}* i *cyc⁰¹* mutanti imali su statistički značajno različitu prosječnu preferenciju od *wt* mušica koja je za neke dane bila negativna ($p < 0,05$ one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison).

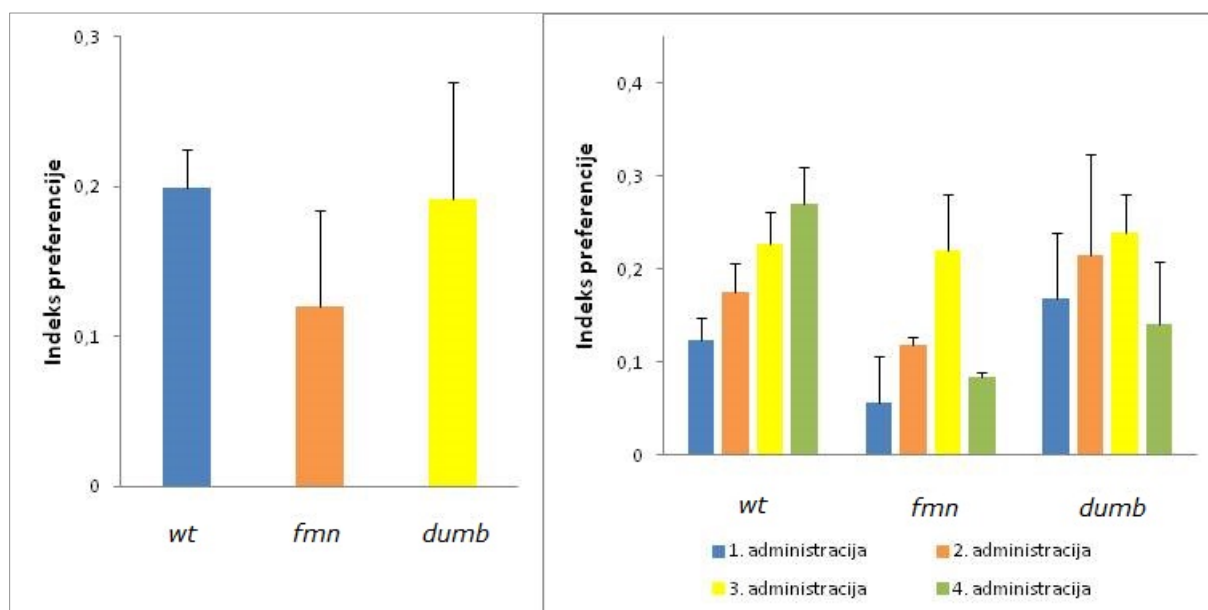


Slika 17. ***per⁰¹*, *Clk^{Jrk}* i *cyc⁰¹* cirkadijalni mutanti imaju smanjenu preferenciju prema metamfetaminu od *wt* mušica.** Mušice su bile podijeljene u grupe prema genotipu: *wt*- *wild type*, *per⁰¹*- mutanti za *period* gen, *Clk^{Jrk}*- mutanti za *Clock* gen, *cyc⁰¹*- mutanti za *cycle* gen i *tim⁰¹*- mutanti za gen *timeless*. Tokom pet dana mušicama je dan izbor između otopine metamfetamina koncentracije 0,20mg/ml i otopine čiste saharoze. Svakih 24 sata izmjerena je količina popijene otopine koja je preračunata u indeks preferencije. Na grafu je prikazan prosječan indeks preferencije tokom 4 administracije za svaki genotip. Za utvrđivanje razlike između grupa korištena je one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison. * $p < 0,05$ u odnosu na wild type.

Za razliku od *wt* mušica, čija preferencija prema kokainu raste tokom uzastopnih dana, PI kokaina kod ispitanih cirkadijalnih mutanata opada (slika 4. u dodatnim materijalima). Suprotno kokainu, u ispitivanjima s metamfetaminom PI *wt* mušica opada tokom uzastopnih dana. Iako imaju najniži prosječan PI, *per⁰¹* mutanti imali su porast PI metamfetamina tokom uzastopnih dana. Kod ostalih cirkadijalnih mutanata nije bilo značajnih obrazaca rasta ili pada preferencije (slika 5. u dodatnim materijalima).

4.6 Preferencijalna konzumacija mutanata dopaminskog transportera i receptora

Dopamin je glavni neurotransmiter uključen u mehanizam djelovanja kokaina. Stoga smo željeli provjeriti hoće li mutanti dopaminskog transportera i receptora imati različitu preferenciju prema kokainu od *wt* mušica. Koristili smo mutante dopaminskog transportera *fumin* (*fmn*) i *dumb*- mutante dopaminskog receptora tipa 1. Budući da je dopaminski transporter ključan u mehanizmu djelovanja kokaina, očekivali smo da će *fmn* mutanti imati različitu preferenciju od *wt* i *dumb* mušica.



Slika 18. **Mutanti dopaminskog receptora i transportera nemaju različitu preferenciju prema kokainu od *wt* mušica.** Mušice su bile podijeljene u grupe prema genotipu: *wt*- *wild type*, *fmn*- *fumin*, mutant dopaminskog transportera i *dumb*-mutant dopamin-like receptora 1. Tokom pet dana mušicama je dan izbor između otopine kokaina koncentracije 0,15mg/ml i otopine čiste saharoze. Svakih 24 sata izmjerena je količina popijene otopine koja je preračunata u indeks preferencije. Na slici a) prikazan je

prosječan indeks preferencije tokom 4 administracije za svaki genotip. Na slici b) prikazani su indeksi preferencije svakog genotipa po administracijama. Za utvrđivanje razlika između grupa korištena je one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison.

Rezultati pokazuju kako mutanti dopaminskog transportera i dopaminskog receptora imaju sličan prosječni PI kao *wt* mušice ($p > 0,05$ one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison). Tijekom uzastopnih dana niti jedan od mutanata nije imao jednoznačni trend rasta preferencije koji je vidljiv kod *wt* mušica. (slika 18.)

5. Rasprava

Ovisnost je karakterizirana samovoljnom konzumacijom opojne supstance koje dovode do promjena u mozgu i razvoja patoloških stanja kod ljudi. Životinje kao modelni organizmi na kojima se ispituje neurobiologija ovisnosti ne samoadministriraju sve droge koje ljudi zloupotrebljavaju (pr. halucinogene supstance) (1). U prijašnjim istraživanjima dokazano je da glodavci samoadministriraju kokain i metamfetamin, no takva istraživanja dosad nisu napravljena na *Drosophili melanogaster*. Stoga je naš prvi cilj bio ustanoviti da li će mušice, kada im je pružen slobodan izbor između hrane s kokainom ili metamfetaminom i hrane bez droge, aktivno samoadministrirati ove psihostimulanse.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju kako mušice aktivno samoadministriraju kokain i metamfetamin te preferiraju hranu s psihostimulansima u usporedbi s običnom hranom što isprva nije bilo očekivano jer su ove supstance gorkog okusa koji je mušicama odbojan. Slično kao i u studijama na štakorima (42), mušice od prvog dana pokusa pokazuju pozitivnu preferenciju prema kokainu koja raste tokom uzastopnih dana. U usporedbi s prvim danom eksperimenta, statistički značajno povišenje preferencije mušice razvijaju četvrtog, a štakori petog dana eksperimenta (42). Kod glodavaca je primijećena „eskalacija“ konzumacije kokaina u dugotrajnim periodima samoadministracije (6 dana). Moguće je da nagli porast preferencije mušica četvrtog dana modelira ovaj obrazac ponašanja, no to je potrebno ispitati dužim periodima samoadministracije. Porast preferencije tokom uzastopnih dana bio je očekivan, no nismo očekivali da će preferencija prema kokainu biti pozitivna već od prvog dana jer je u ispitivanju s etanolom PI postepeno rastao iz negativne vrijednosti prvog dana pa sve do pozitivnih u kasnijim danima eksperimenta (25).

Mušice su pokazale preferenciju prema hrani s metamfetaminom samo prvoga dana, no nakon toga PI tokom uzastopnih dana opada. Ovaj rezultat nije bio očekivan s obzirom da kod štakorskih modela preferencija metamfetamina raste kao i u slučaju s kokainom (43). Selektivnim križanjem miševa iz eksperimenata samoadministracije uzgojeni su miševi koji konzumiraju visoke ili

niske doze metamfetamina. Linije koje su konzumirale manje doze metamfetamina imale su pad preferencije tokom uzastopnih dana (44). Znanstvenici smatraju da je smanjena konzumacija uzrokovana pojačanom osjetljivosti miševa na odbojan okus metamfetamina. Kao što je već navedeno, oba psihostimulansa kokain i metamfetamin gorkog su okusa koji je mušicama evolucijski odbojan. Jedno od mogućih objašnjenja pada preferencije metamfetamina bio bi njegov utjecaj na povećanje osjetljivosti na gorak okus hrane, zbog čega mušice sve manje konzumiraju hranu s metamfetaminom. Alternativno objašnjenje temeljilo bi se na različitim mehanizmima djelovanja ovih droga. Za razliku od kokaina, metamfetamin ulazi u neurone gdje potiče pojačano izlučivanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu. Postoji mogućnost da su suprotno štakorima i ljudima, psihološki efekti metamfetamina, posebice oni dugoročni, odbojni mušicama te zbog toga svakoga dana konzumiraju sve manje količine hrane s metamfetaminom u usporedbi s hranom bez droge.

Kako bi utvrdili ovisi li preferencija psihostimulansa o koncentraciji otopine, te kako bi saznali koje koncentracije su najoptimalnije za daljnja istraživanja ponovili smo pokuse s različitim koncentracijama kokaina i metamfetamina. U eksperimentima s kokainom koncentracije od 0,20mg/ml i veće imale su značajno smanjenu preferenciju u odnosu na niže koncentracije. Takva razlika u preferenciji upućuje na to da mušice aktivno biraju ili izbjegavaju određene kapilare, no nije jasno je li uzrok tome gorak okus ili posljedica kokaina na živčani sustav. Štakori koji su u pokusima samoadministracije imali ponuđene više doze kokaina konzumirali su više droge, no pravilne obrasce samoadministracije imali su pri nižim dozama (45). Prema nekim eksperimentima, štakori su čak spremni samoadministrirati letalno visoke koncentracije kokaina (46). Međutim u pokusima samoadministracije na štakorima koristi se intravenska ili direktna administracija kokaina u mozak, dok u CAFE eseju kojeg smo koristili u našem istraživanju mušice oralno administriraju drogu. Zbog toga pretpostavljamo kako bi razlog izbjegavanja viših koncentracija kokaina u ovom istraživanju mogao biti jači gorak okus u usporedbi s nižim koncentracijama. Kako bi se potvrdila ova pretpostavka potrebno je ispitati preferencije okusa različitih koncentracija čiste otopine kokaina. Primjer eseja koji bi se mogao koristiti u tu svrhu je *Proboscis extension*

reflex (PER) esej u kojem se promatra hoće li mušica odgovoriti pružanjem surlice nakon što okusnim pupoljcima na nožicama dotakne ispitivanu otopinu (47).

U nastavku ovog istraživanja odlučili smo koristiti otopine kokaina koncentracije 0,10mg/ml i 0,15mg/ml jer su prema njima mušice pokazale najvišu preferenciju, odnosno 0,20mg/ml metamfetamina budući da se samo preferencija te koncentracije razlikovala od kontrole.

Mnoga istraživanja ovisnosti o psihostimulansima ispituju postojanje Conditioned place preference (CPP) kao dokaza povezanosti učenja i nagrađujućeg utjecaja droga. U njima je administracija droge povezana s jednim okolišem, a administracija placeba s drugim. Nakon nekoliko dana treninga u kojem su životinje imale mogućnost upoznati se s oba okoliša, životinja aktivno bira u kojem okolišu želi boraviti i mjeri se vrijeme koje provede u okolišu povezanim s drogom (1). Duži boravak životinje u okolišu povezanim s drogom upućuje da je droga pozitivna nagrada koju je mušica uspjela povezati s okolišem (15). U našim eksperimentima proveli smo slične manipulacije da bi ispitali utječe li učenje na preferencijalnu konzumaciju. Ispitali smo preferenciju mušica u modificiranim komoricama s fizičkom oznakom na otvorima kapilara s kokainom. Naša hipoteza bila je da ako ispitivani psihostimulansi imaju nagrađujući utjecaj, mušice će imati viši PI kada kapilaru s kokainom mogu povezati s fizičkom oznakom. Rezultati pokazuju kako je PI značajno viši kada su otvori za kapilare s kokainom označeni. Kada su kapilare s kokainom bile postavljene svakog dana na istoj lokaciji preferencija mušica prema kokainu je rasla tokom uzastopnih dana, dok je kod izmjena lokacija bila nasumična. Ovime se potvrđuje naša hipoteza i sugerira povezanost nagrađujućeg utjecaja kokaina to jest motivacije za uzimanjem droge s učenjem o lokaciji droge.

Jedan od obrazaca ovisničkog ponašanja kod ljudi je konzumiranje droge unatoč negativnim posljedicama. Zbog promjena do kojih konzumacija droga dovodi u centrima za nagradu u mozgu, žudnja za drogom dominira unatoč negativnim posljedicama na zdravlje, socijalan status i okolinu ovisnika. Ovo

ponašanje uspješno je modelirano u laboratorijskim uvjetima gdje se mjeri upornost modelnih životinja da konzumiraju drogu unatoč bolnim ili odbojnim posljedicama. Tako, primjerice, štakori konzumiraju kokain (18) ili metamfetamin (48) unatoč elektrošokovima koji slijede nakon svake samoadministracije droge. Prilikom toga sposobnost pamćenja štakora nije promijenjena, pa uzrok nastavka konzumacije nije nemogućnost povezivanja konzumacije droge i elektrošokova (19). Nadalje, kontrole pokazuju kako su štakori koji su samoadministrirali fiziološku otopinu imali smanjenu samoadministraciju dok su grupe otporne na elektrošokove pojačano administrirale metamfetamin u odnosu na ispitivanu grupu (48). Kao objašnjenje navodi se povećana ekspresija oksitocina u nucleus accumbens, dijelu mozga uključenom u procesuiranje nagrada i ugone (49).

U dosadašnjim istraživanjima konzumacije droga unatoč negativnim posljedicama na *Drosophila* ispitivana je samoadministracija etanola (17). U njima je mjerena preferencija hrane s etanolom pomiješana s kininom, supstancom izrazito gorka okusa. U našem istraživanju koristili smo jednaki model negativne posljedice, te smo u hranu s kokainom ili metamfetaminom pomiješali 300 μ M otopinu kinina. Preferencija mušica prema otopinama kinina i droge bila je značajno viša od preferencije otopine samog kinina, no smanjena u odnosu na preferenciju otopine kokaina ili metamfetamina bez kinina. Sukladno istraživanju s etanolom (17), naši rezultati pokazuju da su mušice spremne prevazići odbojan okus kinina kako bi konzumirale kokain ili metamfetamin. Teorija o pojačanoj žudnji kao razlogu nastavka konzumiranja droge mogla bi se dalje ispitati analizom neurotransmitterskih sistema u dijelovima mozga uključenim u procesuiranje nagrade korištenjem microarray eseja i kvantitativnog PCR-a.

Jedna vrsta ovisničkog ponašanja uzrokovana promijenjenom neurotransmisijom u centrima za procesuiranje nagrade je recidiv (50). Recidiv se u eksperimentima samoadministracije očituje kao održavanje razine preferencije droge u danima nakon deprivacije na većoj ili jednakoj razini preferencije prije deprivacije. Postoji mnogo modela samoadministracije kod glodavaca koji se koriste u ispitivanjima pojave recidiva (15). U ovom

istraživanju proveli smo eksperiment sličan eksperimentu ispitivanja recidiva na etanol u *Drosophila* (17). Recidiv je mjereno nakon jednog ili dva dana deprivacije kada mušice nisu imale pristup kokainu. Kao što smo očekivali, u danima deprivacije, kada je sadržaj svih kapilara bio jednak, mušice su konzumirale hranu iz svih kapilara podjednako zbog čega je PI bio značajno niži u odnosu na nedepriviranu grupu. U danima nakon kratkotrajne ili dugotrajne deprivacije, PI mušica prema kokainu ponovno je porastao na razinu prije deprivacije što ukazuje na pojavu recidiva. Potrebno je uzeti u obzir kako je PI etanola u istraživanjima recidiva bio negativan prvog dana, pa pozitivan PI nakon deprivacije sugerira da promjene u mozgu uzrokovane alkoholom nisu nestale tokom deprivacije i mušice nastavljaju konzumirati alkohol bez početne odbojnosti. U našem ispitivanju PI nakon deprivacije ne možemo interpretirati na jednaki način zbog pozitivne preferencije prvog dana eksperimenta.

Nakon jednodnevne deprivacije preferencija mušica prema kokainu bila je na razini grupe bez deprivacije, no nakon dvodnevne deprivacije preferencija deprivirane grupe bila je značajno niža. Ovi rezultati sugeriraju mogućnost postojanja određenog vremenskog okvira unutar kojeg je pojava recidiva vjerojatnija.

U dosadašnjim istraživanjima dokazano je postojanje veze između ovisnosti i gena koji reguliraju cirkadijalno ponašanje, no ne i priroda te veze. Tako je analizom SNP mutacija kod ljudi ovisnih o alkoholu pokazano da su mutacije u genima *Clock*, *Per2* i *Per3* mogući rizični faktori za razvoj alkoholizma u ljudi (51). Istovremeno, kronična konzumacija alkohola dovodi do disrupcije cirkadijalnog uzorka u hormonalnim i bihevioralnim ritmovima (51). U ispitivanjima lokomotorne senzitivacije i ritmičnosti spavanja na glodavcima, korišteni su *Clock* i *period* mutanti koji ne posjeduju funkcionalni protein. Mišji mutanti *Per1* gena nisu pokazivali bihevioralnu senzitivaciju prilikom opetovanih konzumacija kokaina, dok su se mutanti *Per2* gena hipersenzitivirali na kokain (36). Opetovanom administracijom metamfetamina kod aritmičnih štakora vraćena je ritmičnost u spavanju i lokomotornoj aktivnosti (52).

per, *Clk*, *cyc* i *double time* mutanti *Drosophila* se ne senzitiviraju prilikom opetovanih doza volatiliziranog kokaina (41). Na temelju toga i činjenice da mišji

Clk mutanti konzumiraju više kokaina od divljeg tipa u eksperimentima samoadministracije (35) naša hipoteza je bila da će mutacije u *per*, *Clk* i *cyc* genima u *Drosophila* imati promijenjenu preferenciju prema kokainu od *wt* mušica. Naša istraživanja upućuju da je prosječna preferencija *cyc*⁰¹ mutanata prema kokainu bila značajno smanjena, dok se prosječna preferencija ostalih mutanata nije razlikovala od preferencije divljeg tipa. Kod svih mutanata primijećena je inicijalna privlačnost mušica prema kokainu, koja se tokom uzastopnih dana smanjivala. U ispitivanjima lokomotorne senzitivacije (41) navedeno je kako su *Clk* i *cyc* mušice imale povećanu osjetljivost na kokain pa se koncentracija kokaina morala smanjiti kako bi se izazvala bihevioralna senzitivacija. Postoji mogućnost da je i u ovom slučaju ovim cirkadijalnim mutantima dana previsoka koncentracija kokaina zbog čega su imali smanjenu preferenciju i nepravilne obrasce samoadministracije, poput *wt* mušica u eksperimentima s višom dozom kokaina.

U dosadašnjim istraživanjima povezanosti cirkadijalnih ritmova i samoadministracije metamfetamina ispitivani su *wt* štakori kojima su kontroliranom izmjenom ciklusa svjetla i mraka poremećeni cirkadijalni ritmovi (52). Ti su štakori konzumirali manju količinu metamfetamina od kontrola s normalnim cirkadijalnim ciklusom (52). U našem eksperimentu s metamfetaminom, svi mutanti osim *tim*⁰¹ imali su značajno manju preferenciju od *wt* mušica. PI *Clk*^{Jrk} i *cyc*⁰¹ mutanata tokom uzastopnih dana nije se značajno razlikovao od 0, kao da mušice ne percipiraju drogu u kapilarama. *per*⁰¹ mutanti imali su porast preferencije tokom uzastopnih dana od izrazito negativnog do pozitivnog PI, za razliku od trenda pada preferencije kod *wt* mušica. Ovi rezultati sugeriraju da *per*, *Clk* i *cyc* geni utječu na preferencijalnu konzumaciju metamfetamina.

Velike razlike u pozitivnom prosječnom PI kokaina i negativnom prosječnom PI metamfetamina kod *per*⁰¹ mutanata upućuju na različito djelovanje ovih droga. U ispitivanjima oba psihostimulansa, *per*⁰¹ mutanti imali su suprotan obrazac samoadministracije tokom uzastopnih dana od *wt* mušica: PI kokaina je svakog dana bio sve manji, a PI metamfetamina sve veći. Ovi rezultati sugeriraju ulogu *per* gena u razvoju preferencijalne konzumacije oba psihostimulansa, dok ostali cirkadijalni geni djeluju različito ovisno o vrsti droge.

Kako je DAT aktivno mjesto vezanja kokaina, naša hipoteza bila je da će *fmn* mutanti imati manju preferenciju prema kokainu od *wt* mušica. Međutim, prosječna preferencija *fmn* i *dumb* mutanata nije se razlikovala od preferencije *wt* mušica. Slični rezultati dobiveni su i u studiji na miševima gdje su DAT knock-out miševi samoadministrirali kokain u istim količinama kao *wt* miševi (53). Autori su tada ukazali na mogućnost uključenosti serotoninskog transportera u održavanju samoadministracije kod miševa, no ubrzo su istraživanja pokazala kako knock-out miševi za serotoninski i noradrenalinski transporter nemaju promijenjen sustav nagrade na očekivani način, te također samoadministriraju kokain (54,55). Činjenica da nijedno od 3 glavna aktivna mjesta vezanja kokaina nema ključnu ulogu u procesuiranju nagrade povezane sa samoadministracijom sugerira na mogućnost postojanja dodatnih mjesta vezanja kokaina koja još nisu poznata (56). U budućnosti je potrebno na jednaki način ispitati ulogu serotonina i oktopamina, noradrenalinskog analoga u *Drosophila* za koji je pokazano da regulira bihevioralnu senzitivaciju (57).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju kako je *Drosophila melanogaster* dobar modelni organizam za ispitivanje složenih obrazaca ponašanja povezanih s razvojem ovisnosti o psihostimulansima. CAFE esej je prikladan za istraživanje nagrađujućih svojstava kokaina i metamfetamina, no potrebno ga je modificirati kako bi se podaci sakupljali automatski i time bili precizniji, a usporedba s dosadašnjim rezultatima samoadministracije na glodavcima jednostavnija. U CAFE eseju mjeri se količina konzumirane droge dok se kod glodavaca preferencija prema kokainu ili metamfetaminu mjeri kao broj administracija koje miš ili štakor administrira tokom dana. Svaki put, nakon što pritisnu polugu u kavezu, glodavcima se administrira jednaka doza psihostimulansa, pa je moguće izračunati i količinu administrirane droge, no ona u mnogim rezultatima istraživanja nije navedena. Nadalje, u CAFE eseju mjeri se odgovor 6 mušica unutar jednog dana, dok se kod glodavaca mjeri individualni odgovor. U budućnosti je potrebno modificirati metodu kako bi se omogućilo mjerenje individualnog odgovora mušica i frekvencija konzumacija koje mušice naprave u jednom danu.

Još jednom je važno naglasiti kako ispitivanja samoadministracije kokaina i metamfetamina nisu dosad provedena na *Drosophili melanogaster*. Osim važnosti ovog istraživanja u budućim ispitivanjima ovisničkih ponašanja, zbog nagrađujućeg utjecaja kokaina i metamfetamina, istraživanje preferencijalne konzumacije psihostimulansa doprinijeti će razumijevanju općenitog procesuiranja nagrade u *Drosophile*.

6. Zaključak

Ovim istraživanjem pokazali smo kako *Drosophila melanogaster* samostalno bira i preferira konzumaciju kokaina i metamfetamina, te je stoga dobar modelni organizam za ispitivanje ovog oblika ovisničkog ponašanja. Za mjerenje preferencijane konzumacije adaptirali smo postojeću metodu, CAFE esej, kojom je prethodno u *Drosophila* pokazana samoadministracija etanola.

Pri mogućnosti slobodnog odabira između hrane s drogom i hrane bez droge mušice aktivno konzumiraju hranu s kokainom i metamfetaminom. Mušice pokazuju pozitivnu preferenciju prema oba psihostimulansa usprkos njihovom odbojnom gorkom okusu, što ukazuje na nagrađujući utjecaj ovih droga. Tokom uzastopnih dana preferencija kokaina raste, dok preferencija metamfetamina opada.

Pokazali smo kako mušice prilikom samoadministracije kokaina i metamfetamina razvijaju obrasce ovisničkog ponašanja primijećene u ljudi i modelima glodavaca. Mušice konzumiraju kokain i metamfetamin unatoč negativnim posljedicama, te nakon deprivacije razvijaju ponašanje slično recidivu. Ova ponašanja mogu se interpretirati kao pojačana žudnje za drogom, odnosno povećana motivacija za konzumacijom koja nastaje promjenama u centrima za procesuiranje nagrade.

Dosadašnja istraživanja povezanosti ovisnosti i cirkadijalnih ritmova baziraju se na ispitivanju lokomotorne senzitivacije i ritmičnosti spavanja kod mušica. U ovom radu prvi puta je ispitivana samoadministracija cirkadijalnih mutanata *Drosophila melanogaster*. Pokazano je kako *cycle*⁰¹ mutanti imaju manju preferenciju prema kokainu od *wt* mušica, dok je u ispitivanjima s metamfetaminom preferencija bila smanjena kod *period*⁰¹, *Clock*^{rk} i *cycle*⁰¹ mutanata. Naši rezultati pokazuju da je funkcija cirkadijalnih gena u regulaciji preferencije i lokomotorne senzitivacije na kokain i metamfetamin različita.

Suprotno očekivanjima, naši rezultati pokazuju da dopaminski transporter nije uključen u razvoj preferencije prema kokainu, što ukazuje na mogućnost postojanja alternativnih aktivnih mjesta vezanja kokaina u organizmu.

Iako smo u istraživanju dokazali da je CAFE esej prikladan za ispitivanje preferencije psihostimulansa, u budućnosti je potrebno modificirati metodu kako bi se uz mjerenje količine administrirane droge, omogućilo mjerenje frekvencije administracije na individualnoj razini.

Niti jedan životinjski model ne može biti savršen za modeliranje ovisnosti o psihostimulansima jer je ovisnost ljudski fenomen pod utjecajem socijalnih, kulturoloških i kognitivnih faktora. Međutim, životinjski primjeri mogu modelirati pojedine aspekte ovisnosti što smo u ovom istraživanju utvrdili na *Drosophila melanogaster*. Iako naše istraživanje ne definira prirodu preferencije psihostimulansa i moguće sličnosti ili razlike između mušica i sisavaca, naši rezultati biti će korisni u budućim istraživanjima molekularnih mehanizama uključenih u konzumaciju kokaina i metamfetamina koji zatim mogu biti testirani na modelima viših kralježnjaka.

7. Literatura

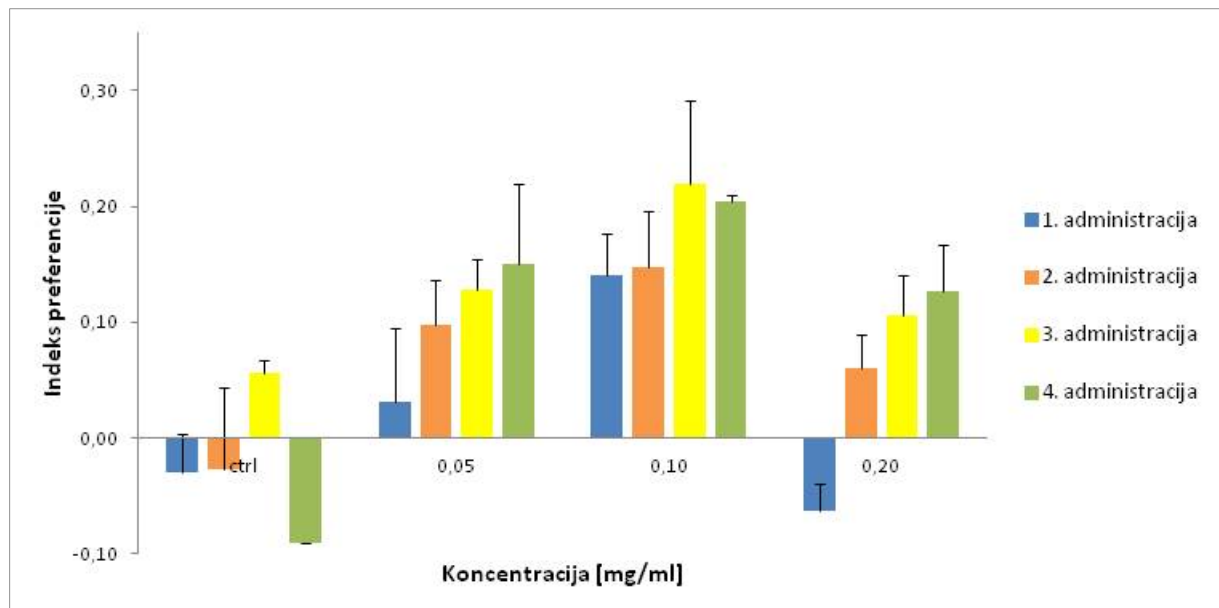
1. Recent Advances in Animal Models of Drug Addiction - Semantic Scholar [Internet]. [citirano 03. srpanj 2017.]. Dostupno na: /paper/Recent-Advances-in-Animal-Models-of-Drug-Addiction-SHIPPENBERG-KOOB/28fc4738942e73d32a270519188e6e779e1a6394
2. Steketee JD, Kalivas PW. Drug Wanting: Behavioral Sensitization and Relapse to Drug-Seeking Behavior. *Pharmacol Rev.* lipanj 2011.;63(2):348–65.
3. Kaun KR, Devineni AV, Heberlein U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Hum Genet.* lipanj 2012.;131(6):959–75.
4. Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* studeni 2007.;8(11):844–58.
5. 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.
6. 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.
7. Lynch WJ, Nicholson KL, Dance ME, Morgan RW, Foley PL. Animal Models of Substance Abuse and Addiction: Implications for Science, Animal Welfare, and Society. *Comp Med.* lipanj 2010.;60(3):177–88.
8. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of Addiction. *Neuron.* rujan 1998.;21(3):467–76.
9. 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 1:97–106.
10. Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol.* travanj 1996.;6(2):243–51.
11. Drugs of Abuse | Basic & Clinical Pharmacology, 13e | AccessPharmacy | McGraw-Hill Medical [Internet]. [citirano 16. kolovoz 2017.]. Dostupno na: <http://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1193§ionid=69108683>
12. Kish SJ. Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *CMAJ Can Med Assoc J.* 17. lipanj 2008.;178(13):1679–82.
13. Courtney KE, Ray LA. Methamphetamine: An Update on Epidemiology, Pharmacology, Clinical Phenomenology, and Treatment Literature. *Drug Alcohol Depend.* 01. listopad 2014.;0:11–21.
14. Wise RA. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend.* 01. lipanj 1998.;51(1–2):13–22.
15. Panlilio LV, Goldberg SR. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addict Abingdon Engl.* prosinac 2007.;102(12):1863–70.
16. Kaun KR, Azanchi R, Maung Z, Hirsh J, Heberlein U. A *Drosophila* model for alcohol reward. *Nat Neurosci.* svibanj 2011.;14(5):612–9.

17. Devineni AV, Heberlein U. Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features of addiction. *Curr Biol CB*. 29. prosinac 2009.;19(24):2126–32.
18. Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. 13. kolovoz 2004.;305(5686):1014–7.
19. Holtz NA, Anker JJ, Regier PS, Claxton A, Carroll ME. Cocaine self-administration punished by i.v. histamine in rat models of high and low drug abuse vulnerability: effects of saccharin preference, impulsivity, and sex. *Physiol Behav*. 02. listopad 2013.;122:32–8.
20. Olmstead MC, Parkinson JA, Miles FJ, Everitt BJ, Dickinson A. Cocaine-seeking by rats: regulation, reinforcement and activation. *Psychopharmacology (Berl)*. listopad 2000.;152(2):123–31.
21. de Wit H, Stewart J. Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1981.;75(2):134–43.
22. Andretic R, van Swinderen B, Greenspan RJ. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr Biol CB*. 12. srpanj 2005.;15(13):1165–75.
23. 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.
24. Wolf ME. Cocaine addiction: clues from *Drosophila* on drugs. *Curr Biol CB*. 21. listopad 1999.;9(20):R770–772.
25. Ja WW, Carvalho GB, Mak EM, de la Rosa NN, Fang AY, Liang JC, i ostali. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. svibanj 2007.;104(20):8253–6.
26. 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.
27. Qi C, Lee D. Pre- and Postsynaptic Role of Dopamine D2 Receptor DD2R in *Drosophila* Olfactory Associative Learning. *Biology*. 21. studeni 2014.;3(4):831–45.
28. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev*. 01. ožujak 2011.;63(1):182–217.
29. 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.
30. A *Drosophila* dopamine transporter mutant, fumin (fmn), is defective in arousal regulation* [Internet]. ResearchGate. [citirano 16. kolovoz 2017.]. Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/227916129_A_Drosophila_dopamine_transporter_mutant_fumin_fmn_is_defective_in_arousal_regulation
31. Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J, Jackson FR. Dopamine Is a Regulator of Arousal in the Fruit Fly. *J Neurosci*. 10. kolovoz 2005.;25(32):7377–84.
32. The *Drosophila* Molecular Clock Model | HHMI's BioInteractive [Internet]. [citirano 16. kolovoz 2017.]. Dostupno na: <http://www.hhmi.org/biointeractive/drosophila-molecular-clock-model>

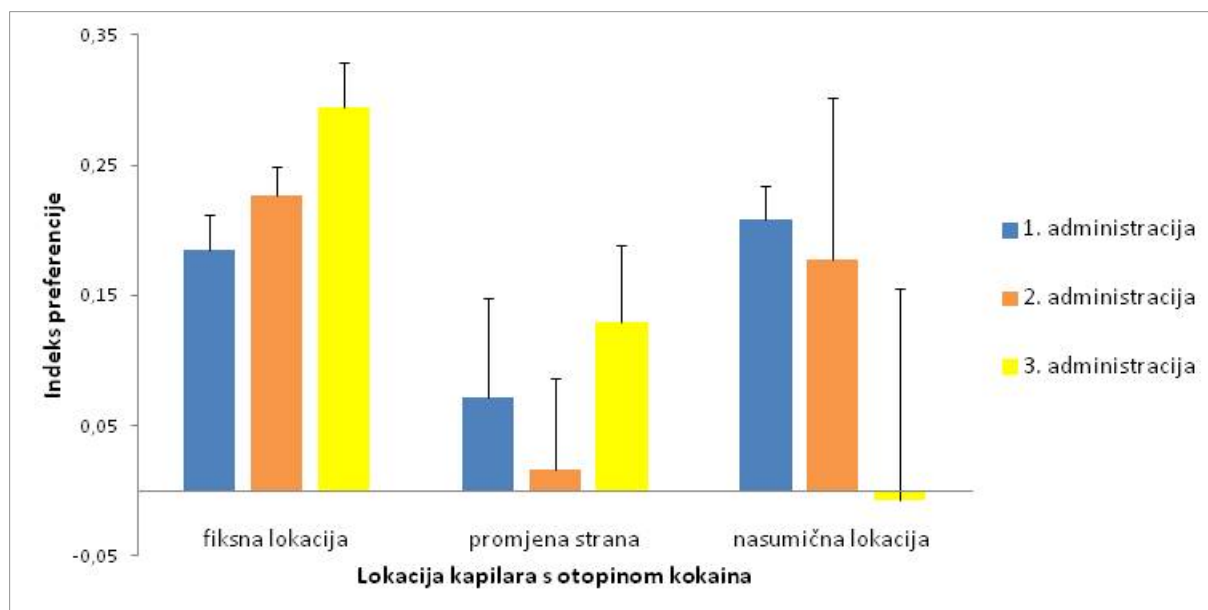
33. Logan RW, Williams WP, McClung CA. Circadian rhythms and addiction: Mechanistic insights and future directions. *Behav Neurosci.* lipanj 2014.;128(3):387–412.
34. Tataroglu O, Emery P. Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods San Diego Calif.* 15. lipanj 2014.;68(1):140–50.
35. Ozburn AR, Larson EB, Self DW, McClung CA. Cocaine self-administration behaviors in *Clock Δ 19* mice. *Psychopharmacology (Berl).* rujun 2012.;223(2):169–77.
36. 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.
37. McClung CA. Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction. *ScientificWorldJournal.* 02. studeni 2007.;7:194–202.
38. Akhisaroglu M, Kurtuncu M, Manev H, Uz T. Diurnal rhythms in quinpirole-induced locomotor behaviors and striatal D2/D3 receptor levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* ožujak 2005.;80(3):371–7.
39. Baird TJ, Gauvin D. Characterization of cocaine self-administration and pharmacokinetics as a function of time of day in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* veljača 2000.;65(2):289–99.
40. Sleipness EP, Sorg BA, Jansen HT. Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 19. siječanj 2007.;1129(1):34–42.
41. Andretic R, Chaney S, Hirsh J. Requirement of circadian genes for cocaine sensitization in *Drosophila*. *Science.* 13. kolovoz 1999.;285(5430):1066–8.
42. Liu Y, Roberts DCS, Morgan D. Effects of extended-access self-administration and deprivation on breakpoints maintained by cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl).* svibanj 2005.;179(3):644–51.
43. Johansen A, McFadden LM. The neurochemical consequences of methamphetamine self-administration in male and female rats. *Drug Alcohol Depend.* 01. rujun 2017.;178:70–4.
44. Wheeler JM, Reed C, Burkhart-Kasch S, Li N, Cunningham CL, Janowsky A, i ostali. Genetically correlated effects of selective breeding for high and low methamphetamine consumption. *Genes Brain Behav.* studeni 2009.;8(8):758–71.
45. Mantsch JR, Ho A, Schlussman SD, Kreek M. Predictable individual differences in the initiation of cocaine self-administration by rats under extended-access conditions are dose-dependent. *Psychopharmacology (Berl).* 01. kolovoz 2001.;157(1):31–9.
46. Bozarth MA, Wise RA. Toxicity associated with long-term intravenous heroin and cocaine self-administration in the rat. *JAMA.* 05. srpanj 1985.;254(1):81–3.
47. Shiraiwa T, Carlson JR. Proboscis Extension Response (PER) Assay in *Drosophila*. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 29. travanj 2007.;(3). Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2535836/>

48. Krasnova IN, Gerra MC, Walther D, Jayanthi S, Ladenheim B, McCoy MT, i ostali. Compulsive methamphetamine taking in the presence of punishment is associated with increased oxytocin expression in the nucleus accumbens of rats. *Sci Rep.* 21. kolovoz 2017.;7(1):8331.
49. Nestler EJ, Hyman SE, Holtzman DM, Malenka RC. *Neural and Neuroendocrine Control of the Internal Milieu.* U: *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* [Internet]. 3. izd. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015. Dostupno na: neurology.mhmedical.com/content.aspx?aid=1105916097
50. Nicolas C, Tauber C, Lepelletier F-X, Chalon S, Belujon P, Galineau L, i ostali. Longitudinal Changes in Brain Metabolic Activity after Withdrawal from Escalation of Cocaine Self-Administration. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* rujanj 2017.;42(10):1981–90.
51. Parekh PK, Ozburn AR, McClung CA. Circadian Clock Genes: Effects on Dopamine, Reward and Addiction. *Alcohol Fayettev N.* lipanj 2015.;49(4):341–9.
52. Doyle SE, Feng H, Garber G, Menaker M, Lynch WJ. Effects of Circadian Disruption on Methamphetamine Consumption in Methamphetamine-Exposed Rats. *Psychopharmacology (Berl).* lipanj 2015.;232(12):2169–79.
53. Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, i ostali. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci.* lipanj 1998.;1(2):132–7.
54. Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, i ostali. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23. lipanj 1998.;95(13):7699–704.
55. Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, i ostali. Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci.* svibanj 2000.;3(5):465–71.
56. Preedy VR. *The Neuroscience of Cocaine: Mechanisms and Treatment.* Academic Press; 2017. 776 str.
57. Martin CA, Krantz DE. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. *Neurochem Int.* srpanj 2014.;73:71–88.

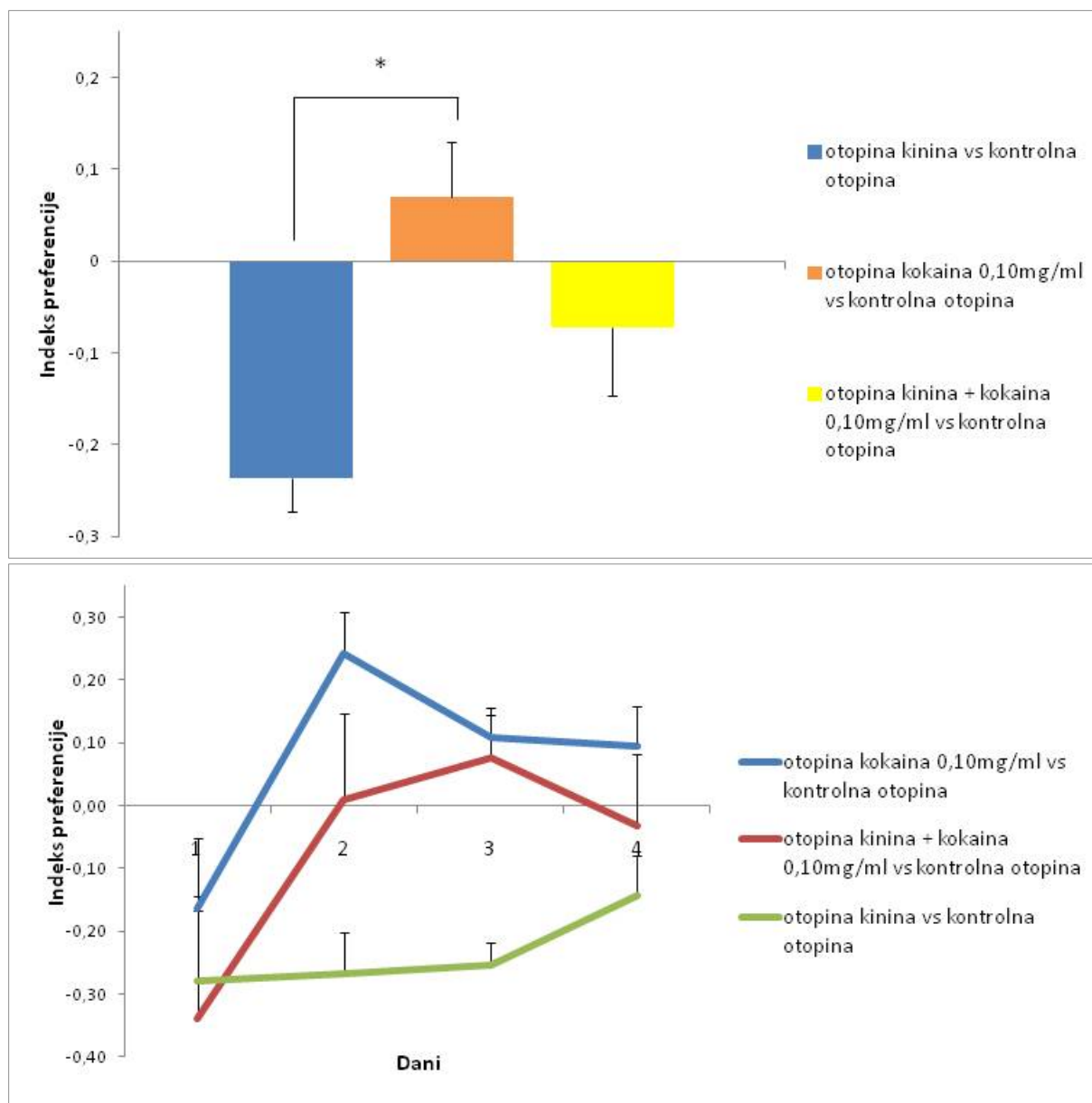
8. Dodatni materijali



Slika 1. **Preferencijalna konzumacija kokaina kod *Drosophila* raste tijekom uzastopnih dana.** U eksperimentu su korišteni mužjaci stari 7 dana koji su se hranili otopinama iz 4 kapilare. Kontrolna skupina imala je vodenu otopinu saharoze u sve četiri kapilare dok se ispitivanoj skupini u dvije kapilare nalazila otopina saharoze, a u druge dvije vodena otopina kokaina u koncentraciji 0,05mg/ml, 0,10mg/ml i 0,20mg/ml. Volumen ispijene tekućine mjeren je svakih 24 sata te je preračunat u indeks preferencije. Eksperiment je ponovljen za svaku koncentraciju 2 puta s 2 tube od kojih se u svakoj nalazilo po 6 mušica (n=24). Za utvrđivanje razlika indeksa preferencije između dana korištena je ANOVA za ponavljana mjerenja, Tukey's multiple comparison ($p=0,05$).

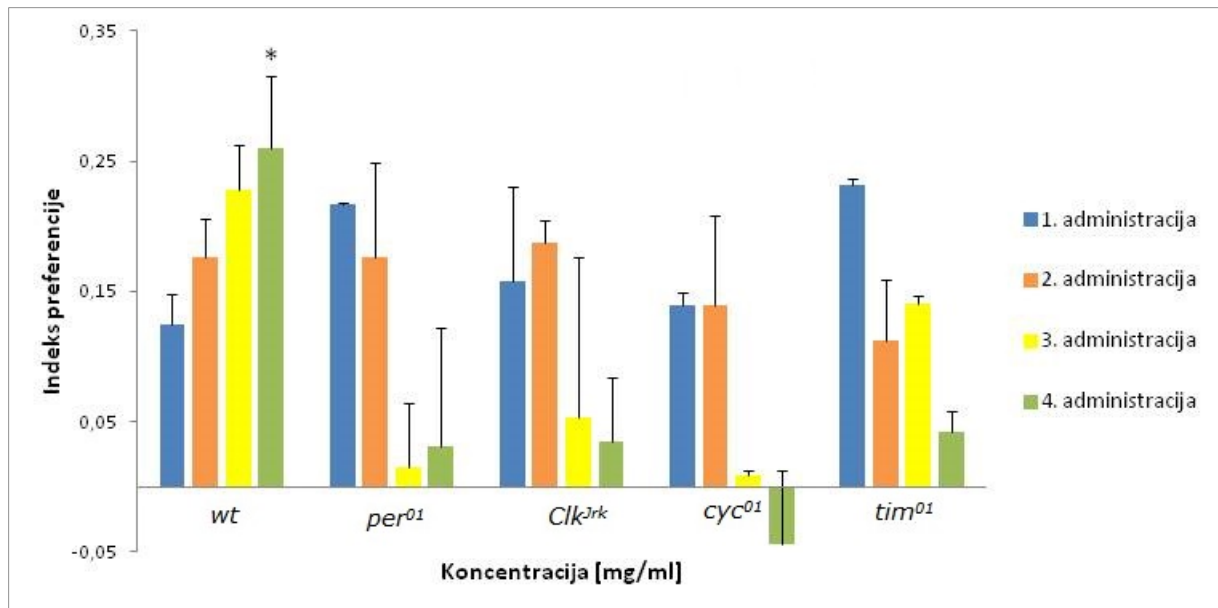


Slika 2. **Preferencijalna konzumacija kokaina kod *Drosophila* tijekom uzastopnih dana ovisi o lokaciji kapilara s drogom.** Mušicama su dane dvije kapilare s otopinom čiste saharoze i dvije s otopinom kokaina koncentracije 0,10mg/ml. Skupina „fiksna lokacija“ dobivala je svakog dana kapilare s kokainom na istoj lokaciji, skupini „promjena strana“ kapilare s kokainom su davane svakog dana na drugoj strani komorice, a skupini „nasumična lokacija“ se lokacija izmjenjivala u dijagonalama. U eksperimentu je korišteno po dvije komorice za svaku skupinu, u kojoj od svake se nalazilo po 6 mušica (n=36). Razlike između grupa utvrđivane su One-way ANOVOM, Tukey's multiple comparison, p=0,05.

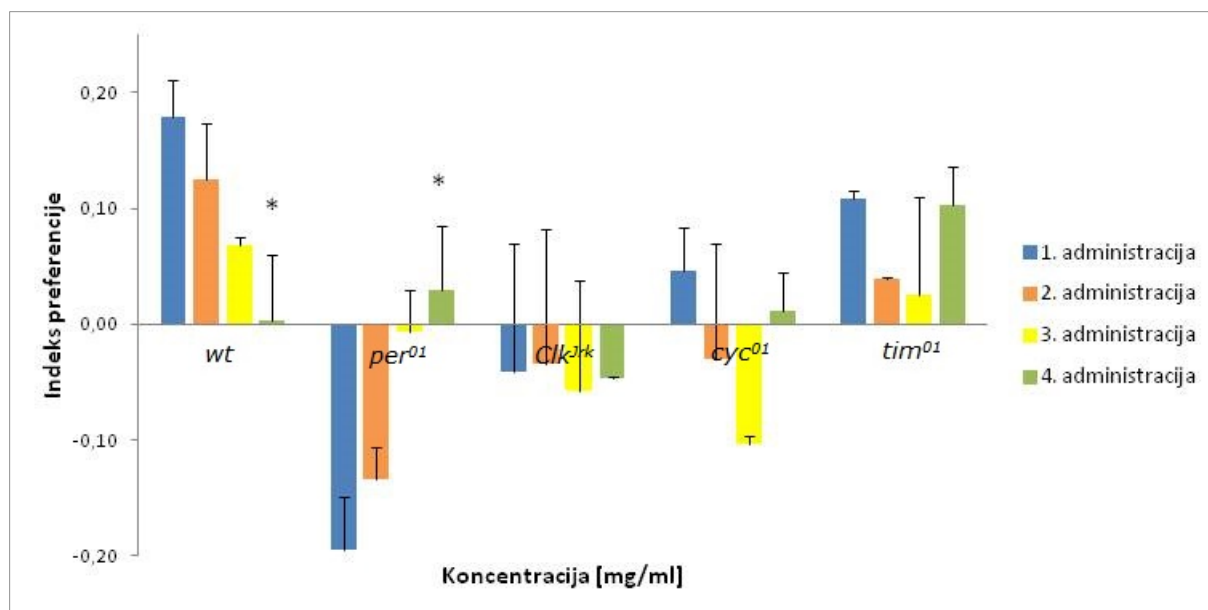


Slika 3. **Mušice samoadministriraju kokain unatoč gorkom okusu kinina.**

Mušice su razdvojene u tri skupine te im je tokom 4 dana pružen izbor administracije: 1) 300 μ M otopine kinina naspram otopine saharoze, 2) otopine kokaina koncentracije 0,10mg/ml naspram otopine saharoze i 3) otopine 300 μ M kinina i kokaina koncentracije 0,10mg/ml naspram saharoze. Nakon svakog dana izmjerena je količina popijenih otopina te je izračunat indeks preferencije prema svakoj od otopina naspram otopini saharoze. Na slici (a) prikazani su prosječni indeksi preferencije za četiri administracije. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison). Na slici (b) prikazani su indeksi preferencije po danima. Za analizu je korišten one-sample t test, $n=8$.



Slika 4. **Prikaz preferencijalne konzumacija kokaina kod cirkadijalnih mutanata *Drosophila*.** Mušice su bile podijeljene u grupe prema genotipu: *wt*- *wild type*, *per⁰¹*- mutanti za *period* gen, *Clk^{Jrk}*- mutanti za *Clock* gen, *cyc⁰¹*- mutanti za *cycle* gen i *tim⁰¹*- mutanti za gen *timeless*. Tokom pet dana mušicama je dan izbor između otopine kokaina koncentracije 0,15mg/ml i otopine čiste saharoze. Svakih 24 sata izmjerena je količina popijene otopine koja je preračunata u indeks preferencije. Na grafu je prikazan indeks preferencije tokom 4 administracije za svaki genotip. Za utvrđivanje razlika indeksa preferencije između dana korištena je ANOVA za ponavljana mjerenja, Tukey's multiple comparison (* $p < 0,05$ u odnosu na 1.administraciju *wt* mušica).



Slika 5. **Prikaz preferencijalne konzumacija metamfetamina kod cirkadijalnih mutanata *Drosophila*.** Mušice su bile podijeljene u grupe prema genotipu: *wt*- *wild type*, *per⁰¹*- mutanti za *period* gen, *ClkJ^{rk}*- mutanti za *Clock* gen, *cyc⁰¹*- mutanti za *cycle* gen i *tim⁰¹*- mutanti za gen *timeless*. Tokom pet dana mušicama je dan izbor između otopine metamfetamina koncentracije 0,20mg/ml i otopine čiste saharoze. Svakih 24 sata izmjerena je količina popijene otopine koja je preračunata u indeks preferencije. Na grafu je prikazan indeks preferencije tokom 4 administracije za svaki genotip. Za utvrđivanje razlika indeksa preferencije između dana korištena je ANOVA za ponavljana mjerenja, Tukey's multiple comparison (* $p < 0,05$ u odnosu na 1.administraciju *wt*, odnosno *per⁰¹* mušica)

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

OSOBNE INFORMACIJE **Azra Selimović**

📍 Veprinac Balač 4, 51414 IČIČI (Hrvatska)

☎ (+385) 95 55 00 686

✉ azraselimovic@net.hr

OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

2015–danas **Diplomski studij "Biotehnologija u medicini"**
Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

02/2016–07/2016 **Studijski boravak u sklopu razmjene studenata**
Fakultet kemije, Sveučilište u Varšavi, Varšava (Poljska)

2012–2015 **Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova**
Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

2008–2012 **Prva sušačka hrvatska gimnazija, opć smjer, Rijeka (Hrvatska)**

RADNO ISKUSTVO

10/2016–07/2017 **Istraživački rad**
Laboratorij za genetiku ponašanja, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)
Izrada diplomskog rada: "Preferencijalna konzumacija kokaina i metamfetamina kod *Drosophila melanogaster*"

2015–2016 **Demonstrator na laboratorijskim vježbama kolegija Bioeseji**
Odjel za Biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

06/2015–07/2015 **Stručna praksa na Odjelu kontrole kvalitete**
Jadran - Galenski laboratorij d.d, Rijeka (Hrvatska)

OSOBNE VJESTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Citanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C1	C2
	Oxford English Placement test- BHV Education, Zagreb				
talijanski	A1	A1	A1	A1	A1

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

Komunikacijske vještine Dobre komunikacijske i prezentacijske vještine stečene tijekom studija prilikom pripreme i prezentacije različitih tema na seminarima i vježbama.

Organizacijske / rukovoditeljske vještine - sudjelovanje u organizaciji i provedbi Otvorenih dana sveučilišnih odjela Sveučilišta u Rijeci, projekt Tetragon
akademska godina 2012./2013. - demonstracija pokusa „Elektrokemija – izrada galvanskih članaka, mjerenje napona, reakcije oksidacije/redukcije“
akademska godina 2013./2014. – demonstracija pokusa "Proteini i polifenoli se vole"
akademska godina 2016./2017. – demonstracija pokusa "Drosophila kao model organizam u neuroznanosti"

- sudjelovanje u provedbi Otvorenih dana sveučilišnih odjela Sveučilišta u Rijeci, projekt Laboratorij otvoreni za razgled
2013., 2014., 2015. i 2017. godine

Digitalna kompetencija

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

Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

-Pretraživanje baza podataka: PubMed, Ensembl, Protein Data Bank, ...
-Programi za molekularno modeliranje: Pymol, Chimera, Marvin
-Programi za statističku analizu podataka: Statistica
-Programi za uređivanje sekvence gena: A plasmid Editor-ApE

Ostale vještine - kreiranje i razvoj kreme: "Bee care- krema s pčelinjim otrovom"
-voditelj brodice B kategorije/boat skipper

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Konferencije -Aktivni sudionik na poster sekciji 6. hrvatskog kongresa neuroznanosti - Osijek (Hrvatska) 2017.
Naslov postera: "Preferential consumption of psychostimulants in Drosophila melanogaster: introduction of self-administration paradigm"
Autori: Azra Selimović, Ana Filošević, Rozi Andrečić, Waldowski

-Aktivni sudionik s prezentacijom na 7. studentskom kongresu neuroznanosti NeuRi- Rijeka/Rab (Hrvatska) 2017.
Autori: Ana Filošević, Azra Selimović, Rozi Andrečić, Waldowski

-Kongresi bez prisustvovanja: poster sekcija, 19th Annual Genes, Brain & Behavior Meeting- Madrid (Španjolska) 2017.

Naslov postera: *Drosophila melanogaster* as model for studying drug addiction – introduction of self-administration paradigm

Autori: Ana Filošević, Azra Selimović i Rozi Andrečić Waldowski

Projekti - suradnica na projektu:

Definiranje uloge cirkadijnih gena kod bihevioralne senzitivacije na psihostimulansu kod *Drosophila melanogaster*.

Financijska potpora: Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ br. 4920)

- suradnica na projektu:

FlvHigh- utjecaj oksidativnog stresa

Financijska potpora: Studentski zbor Sveučilišta u Rijeci- SZSUR

Priznanja i nagrade -dobitnica stipendije Grada Opatije na temelju akademskog uspjeha

-dobitnica ERASMUS+ stipendije

-više godišnja korisnica Državne stipendije

-završen preddiplomski studij s pohvalom MAGNA CUM LAUDE