

Utjecaj kvercetina na razvojne posljedice metamfetamina u vinske mušice

Medija, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:215459>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-01**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Marta Medija

Utjecaj kvercetina na razvojne posljedice metamfetamina u vinske mušice

Završni rad

Rijeka, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Marta Medija

Utjecaj kvercetina na razvojne posljedice metamfetamina u vinske mušice

Završni rad

Rijeka, rujan 2022.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Rozi Andretić Waldowski

Ko-mentor rada: dr. sc. Ana Filošević Vujnović

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
University undergraduate program
„Biotechnology and drug research“

Marta Medija

**The effect of quercetin on the developmental consequences of
methamphetamine in fruit fly**

Bachelor thesis

Rijeka, September 2022.

Mentor of the thesis: Asst.Prof.dr.sc. Rozi Andretić Waldowski

Co-mentor of the thesis: dr. sc. Ana Filošević Vujnović

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Rozi Andreć Waldowski

Završni rad obranjen je dana 22. rujan 2022. pred povjerenstvom:

1. izv.prof.dr.sc. Rozi Andreć Waldowski
2. izv.prof.dr.sc Jelena Ban
3. doc.dr.sc. Źeljka Minić

Rad ima 37 stranica, 13 slika i 33 literaturna navoda.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Razvojni ciklus vinske mušice	1
1.2 Utjecaj METH-a na redoks ravnotežu.....	3
1.3 Antioksidativna obrana.....	4
1.4 Kvercetin.....	5
1.5 Utjecaj redoksa na epigenetske promjene	7
2. Cilj rada	8
3. Materijali i metode	9
3.2. Kemikalije	9
3.3. Priprema uzoraka za <i>FlyBong</i>	9
3.4. Administracija METH-a	10
3.5. Selekcija mužjaka i kvantifikacija razvojnog ciklusa	11
3.6. Obrada podataka, statistička analiza i prikaz rezultata	12
4. Rezultati	13
4.1. METH povećava broj embrija u F1 generaciji	13
4.2. METH-a nije utjecao na razvojni ciklus F2 generacije.....	19
5. Rasprava	23
6. Zaključak.....	27
7. Literatura	28
8. Životopis	36

Sažetak

Metamfetanim (METH) je psihostimulans koji dovodi do razvoja ovisnosti. Naši preliminarni rezultati su pokazali da METH dovodi do promjena u broju potomaka mužjaka vinske mušice. Razvojni ciklus je povezan s metabolizmom, a time i sa razvojem reaktivnih oksidacijskih vrsta. METH povećava stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i ometa njihovo uklanjanje, uzrokujući oksidativni stres. Kvercetin (QUE) je molekula s poznatim antioksidativnim svojstvima koja bi potencijalno mogla djelovati na promjene u razvojnem ciklusu uzrokovane METH-om.

Cilj eksperimentalnog rada je bio ispitati kako promjene u oksidacijskom statusu (QUE) utječu na broj potomaka mužjaka izloženih vMETH-a. METH je administriran grupi mužjaka pomoću FlyBong metode, nakon čega je izdvojeno 20% mužjaka s najvećim lokomotornim odgovorom na METH. Mužjaci su pareni sa netretiranim ženka na hrani s različitim koncentracijama QUE (0.6 mM i 3.2 mM). Praćen je utjecaj QUE na broj potomaka tijekom tri generacije.

Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje broja embrija prve generacije u skupini koja je bila izložena METH-u kao i trend povećanog broja čahura i mušica. Utjecaji METH-a se nije prenio na naredne generacije, dok je utjecaj QUE-a bio vidljiv u drugoj, ali ne i trećoj generaciji. Rezultati upućuju na potencijalan transgeneracijski utjecaj QUE na redoks ravnotežu.

Kako bi se ovi rezultati statistički potvrdili, eksperiment je potrebno ponoviti s povećanim brojem replika i poboljšanom formulacijom hrane.

Ključne riječi: *Drosophila melanogaster*, volatilizirani metamfetamin, razvojni ciklus, oksidacijski status, kvercetin.

Summary

Methamphetamine (METH) is a psychostimulant that leads to the development of addiction. Our preliminary results showed that METH leads to changes in the number of male fruit fly offspring. The development cycle is connected with metabolism, and thus with the development of reactive oxidation species. METH increases the generation of reactive oxygen species (ROS) and interferes with their removal, causing oxidative stress. Quercetin (QUE) is a molecule with known antioxidant properties that could potentially act on METH-induced changes in the developmental cycle.

The aim of the experimental work was to examine how changes in oxidation status (QUE) affect the number of offspring of males exposed to vMETH. METH was administered to a group of males using the FlyBong method, after which 20% of males with the highest locomotor response to METH were selected. Males were mated with untreated females on food with different concentrations of QUE (0.6 mM and 3.2 mM). The influence of QUE on the number of offspring was monitored over three generations.

The results showed a statistically significant increase in the number of embryos of the first generation in the group that was exposed to METH, as well as a trend of an increased number of cocoons and flies. The effects of METH were not transmitted to subsequent generations, while the influence of QUE was visible in the second but not the third generation. The results suggest a potential transgenerational influence of QUE on redox balance.

In order to statistically confirm these results, the experiment needs to be repeated with an increased number of replicates and an improved food formulation.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, volatilized methamphetamine, developmental cycle, oxidation status, quercetin.

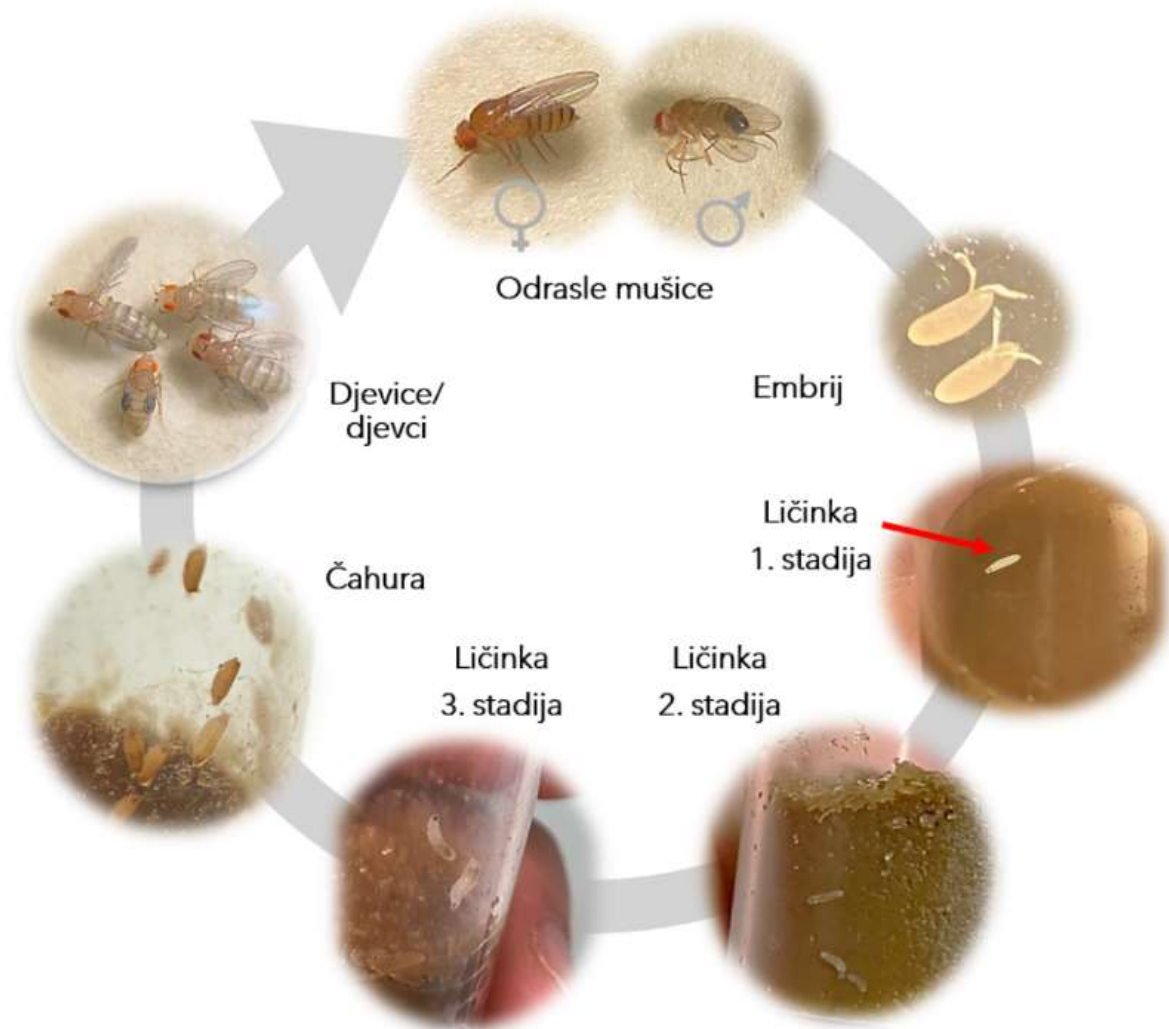
1. Uvod

1.1 Razvojni ciklus vinske mušice

Razvojni ciklus vinske mušice *D. melanogaster* je relativno kratak što omogućuje lako uzgajanje velikog broja mušica za genetička, biokemijska i molekularna istraživanja. Brzina razvoja uvelike ovisi o temperaturi. Pri višim temperaturama ciklus je kraći dok se na nižim produljuje (pri 18°C ciklus traje 18-20 dana) [1]. U standardnim uvjetima koji se održavaju u našem laboratoriju na temperaturi od 25°C, 70%-tnoj vlažnosti zraka i hrani na bazi kukuruznog brašna ili melase, agara, šećera, kvasca i vode razvojni ciklus traje oko 10 dana.

Vinske mušice su holometabolni kukci što znači da prolaze kroz potpunu metamorfozu tijekom svog razvojnog ciklusa koji se može podijeliti u četiri stadija: jajašce (embrij), ličinka, čahura (kukuljica) i odrasla mušica (Slika 1) [1]. Razvojni ciklus započinje kada ženka, nakon parenja, položi jajašca (embrije) na hranjivi medij. Embriju je potreban 1 dan da se razvije u ličinku 1. stadija koja puže po površini hranjivog medija kako bi se hranila. Ličinka 1. stadija raste i presvlači se u ličinku 2. stadija koja kreće u potragu za hranom dublje kroz hranjivi medij. Unutar hranjivog medija ličinka se hrani naredna 3-4 dana. Nakon 4 dana izlazi iz hranjivog medija i postaje ličinka 3. stadija koja puže po stijenci tubice u potrazi za mjestom na kojem će se začahuriti i provesti razdoblje metamorfoze. Metamorfoza se može podijeliti u dva stadija: prijelaz iz ličinke u čahuru (12 sati) i razdoblje čahure koje traje 84 sata. Prijelaz ličinke u čahuru je obilježeno naglim oslobađanjem ekdisteroidnog hormona izlučenog iz prstenaste žlijezde. Kutikula ličinke postaje omotač čahure te dolazi do povlačenje epidermisa s kutikule ličinke. Zatim se u abdomenu formira plinski mjehurić što omogućuje da čahura u razvoju može plutati u vodi. Izvrtnje glave označava početak pravog stadija čahure. U ovom stadiju većina tkiva ličinke se razgrađuje i dolazi do formiranja vanjskih struktura i organa kao što je oblik glave, prsni koš, abdomen, krila i noge [2].

Mušice koje su tek izašle iz čahure nazivaju se djevice/djevci i razlikuju se od odraslih mušica. Djevice/djevci su svjetliji i napuhnutiji u odnosu na odrasle mušice te imaju tamnu točku na abdomenu koja se naziva mekonij (ostatci prehrane ličinke) koji nestane par sati od izlaska iz čahure. Djevice i devci prvih par sati nakon izlaska iz čahure nisu spolno aktivni (8-12 sati). Ženke postaju spolno zrele 1-4 dana nakon izlaska iz čahure, dok mužjaci to čine za 2-3 dana [3], [4]. Vrhunac plodnosti, koji se obično postiže između 3 i 5 dana nakon izlaska iz čahure, omogućuje ženkama da polože do 100 jaja dnevno, a mogu proizvesti između 1000 i 3000 jajašaca tijekom svog životnog vijeka [5].



Slika 1. Prikaz razvojnog ciklusa vinske mušice. Razvojni ciklus vinske mušice se sastoji od četiri stadija: embrij, 3 stadija ličinke, čahura i odrasla mušica.

1.2 Utjecaj METH-a na redoks ravnotežu

Održavanje homeostaze neophodno je za pravilnu funkciju svakog organizma. Stvaranje reaktivnih oksidacijskih (ROS) i dušikovih vrsta (NOS) te njihovo uklanjanje sastavni je mehanizam održavanja redoks ravnoteže stanice. Ukoliko stvaranje reaktivnih vrsta (ROS i NOS) premaši antioksidativni kapacitet stanice nastaje oksidativni stres. Oksidativni stres može uzrokovati oštećenja funkcionalnih jedinica stanice što u konačnici može dovesti do stanične smrti [6].

Izlaganje opojnima drogama i psihostimulansima dovodi do stvaranja ovisnosti, a time i do razvoja ROS-a. Poznato je da su svojstva ovisnosti o psihostimulansima i njihova terapijska učinkovitost pod utjecajem genetskih i okolišnih čimbenika, no identificirano je vrlo malo gena koji reguliraju te procese kod ljudi. To je uglavnom zbog heterogenosti populacije koja podrazumijeva potrebu za velikim uzorcima. *Drosophila melanogaster* pokazuje slične psihostimulativne odgovore kao i ljudi, visok stupanj očuvanja gena i omogućuje provođenje testova ponašanja u velikoj populaciji, stoga je vrlo korišten modelni organizam u istraživanjima neurogenetike u koju spadaju istraživanja ovisnosti [7]. Ovisnost o psihostimulansima kao što su kokain, amfetamin i metamfetamin (METH) temelji se na njihovoj sposobnosti da povećaju dopaminergičku neurotransmisiju u sustavu nagrađivanja [8]. METH je snažan modulator dopaminskog sustava koji je važan za stvaranje osjećaja nagrade, ali i izvor ROS-a u mozgu, stoga igra ulogu u određivanju redoks homeostaze neurona [9]. Izlaganjem METH-u u dopaminergičkim neuronima se povećavaju citoplazmatske i izvanstanične razine dopamina (DA). Povećane razine DA podliježu autooksidaciji čime stvaraju ROS, kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^-) i superoksidni radikal (O_2^-) koji mogu oštetiti proteine, lipide, DNA i RNA stanice ako se ne detoksificiraju antioksidansima ili antioksidativnim enzimima [10].

1.3 Antioksidativna obrana

Detoksikacijom slobodnih radikala i sprječavanjem oštećenja stanica, antioksidativni obrambeni sustav funkcionira kao mehanizam za čišćenje. Antioksidativna obrana se sastoji od enzimskih (endogenih) i neenzimatski (egzogenih) antioksidansa koji sustavno djeluju na uklanjanje slobodnih radikala. Enzimski antioksidativni sustav glavna je obrana protiv ROS-a *in vivo* i sastoji se od superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR) [10]. Nakon interakcije sa reaktivnim vrstama enzimski antioksidansi se učinkovito recikliraju [11]. SOD može katalizirati reakciju razgradnje superoksidnih anionskih radikala u vodikov peroksid, koji će se zatim pretvoriti u vodu i kisik pomoću CAT ili GPx [12].

Neenzimski antioksidativni sustav služi kao drugi obrambeni sustav protiv slobodnih radikala. Neenzimski antioksidansi direktno sudjeluju u hvatanju slobodnih radikala i pojačavaju funkciju endogenih enzimskih antioksidansa sinergističkim uklanjanjem reaktivnih slobodnih radikala [12], [13]. U reakciji djeluju doniranjem elektrona ili protona radikalima i time stvaraju stabilnu strukturu radikala, pri čemu sam antioksidans postaje oksidiran. Takav oblik antioksidansa je štetan za stanicu i mora biti reduciran. Primjerice, tijekom peroksidacije lipida stvara se lipidni peroksilni radikal štetan za stanicu. Na njega kao čistač djeluje vitamin E pri čemu se vitamin E oksidira i postaje toksičan i beskoristan antioksidativnoj obrani. Oksidiran oblik vitamina E reducira GSH (glutation) stvarajući GSSG (oksidirani oblik GSH), čime je vitamin E očuvan [13]. Osim vitamina, studije su pokazale da egzogeni antioksidansi poput flavonoida mogu preuzeti ulogu vitamina E [14]. S obzirom na sposobnosti egzogenih antioksidansa da uklanjaju ROS i slobodne radikale brojne studije su ispitivale moguće djelotvorne učinke antioksidansa na zdravlje. Kod bolesnika s dijabetesom, suplementacija prehrane lipoičnom kiselinom (600 mg/dan) je smanjila parametre oksidativnog stresa i aktivnost NF- κ B [15]. Nadalje, u

istraživanjima na životinjskim modelima gdje su štakorima inducirana oksidacijska oštećenja izazvana kokainom, predtretman antioksidansom (TEMPOL) je smanjio produkciju ROS-a [16].

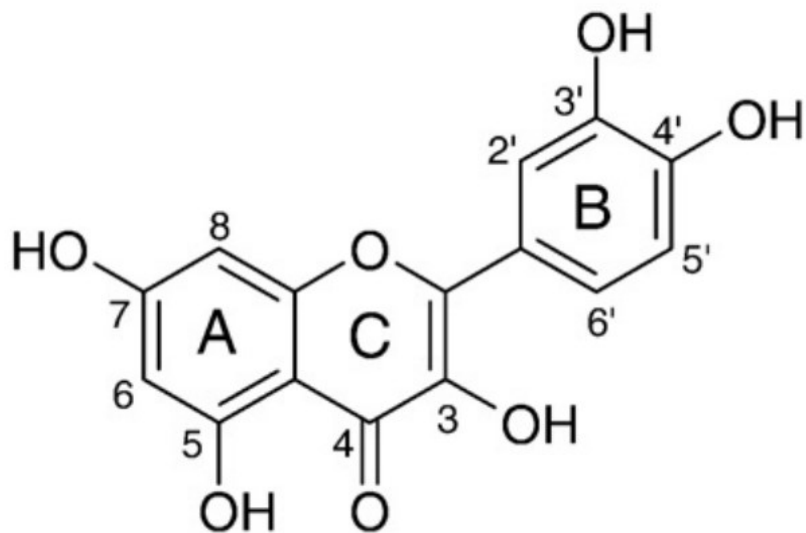
Istraživanja o antioksidativnim efektima egzogenih antioksidansa je proučavana i kod *Drosophila melanogaster* [17]. Zabilježeno je da sastojci hrane, kao što su polifenoli jabuke i ekstrakt borovnice, imaju antioksidativne učinke. Primjerice, otpornost protiv oksidativnog stresa te duljina životnog vijeka je značajno poboljšana kod divljeg tipa vinske mušice, nakon suplementacije prehrane navedenim antioksidansima, u odnosu na mutante s defektnim antioksidativnim enzimima (SOD i CAT) što ukazuje na bitnu ulogu endogenih antioksidansa u posredovanju funkcija egzogenih antioksidansa [18], [19]. Prehrana obogaćena antioksidansima također pozitivno utječe na plodnost i očuvanje reproduktivnog sustava [20].

1.4 Kvercetin

Najaktivniji član obitelji flavonoida je kvercetin (QUE). Njegov naziv dolazi od latinske riječi "Quercetum" što znači hrastova šuma. Jedan je od najrasprostranjenijih flavonoida u prehrani te se može pronaći u raznim namirnicama, uključujući maslinovo ulje, luk, zeleni čaj, crveno grožđe, crno vino, tamne trešnje i bobičasto voće. Prvenstveno se nalazi u agrumima i zelenom lisnatom povrću. Koristi se kao dodatak prehrani i može pomoći u prevenciji raznih bolesti. Kardiovaskularna zaštita, antikancerogeno, protuupalno, antidijabetičko djelovanje i antioksidativna zaštita samo su neki od njegovih pozitivnih učinaka [21].

In vitro ispitivanja su pokazala da je QUE superioran antioksidans i najučinkovitiji čistač ROS-a u obitelji flavonoida. Antioksidativna svojstva QUE pripisuju se postojanju dvaju antioksidativnih farmakofora unutar molekule, naime kateholne skupine u B prstenu i OH skupine na poziciji 3

AC prstena, koje imaju idealnu konfiguraciju za hvatanje slobodnih radikala (Slika 2) [22]. QUE može pomoći u zaštiti od slobodnih radikala uzrokovanim okolišnim utjecajima, poput pušenja. Studija je dokazala da slobodni radikali iz katrana cigareta oštećuju membrane eritrocita te da QUE i njegovi konjugirani metaboliti mogu zaštititi eritrocite od štete koju pušenje čini njihovim membranama [23]. QUE zajedno s askorbinskom kiselinom smanjuje učestalost oksidativnog oštećenja ljudskih limfocita i neurovaskularnih struktura u koži te inhibira oštećenje neurona. Dobro je poznato da štiti moždano tkivo od oksidativnog stresa, koji oštećuje stanice i uzrokuje Alzheimerovu bolest i druge neurološke bolesti [17], [24].



Slika 2. Molekulska struktura kvercetina.

Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299908002884?via%3Dihub>

1.5 Utjecaj redoksa na epigenetske promjene

Epigenetske modifikacije izazvane psihostimulansima koji modificiraju staničnu fiziologiju mozga dovode do oštećenja neurona. Nedavna istraživanja su pokazala da redoks stanje stanice može utjecati na epigenetske modifikacije koje mogu imati značajan utjecaj na ljudsko zdravlje [25]. Primjena psihostimulansa koji povećavaju oksidativne vrste posljedično dovode do epigenetskih promjena koje utječu na mnoge stanične funkcije u mozgu, uključujući neuroplastičnost, upalu i metaboličke procese. Jedna od tih epigenetskih promjena je metilacija DNA koja dominantno regulira ekspresiju gena i modifikaciju proteina u mozgu sisavaca tijekom ovisnosti. Promjene u metilaciji DNA uočene su kod droga, poput kokaina i METH-a [26]. U *Drosophila melanogaster* metilacija DNA nije učestala već se prvenstveno događaju promjene na histonima.

Neurološki problemi povezani sa stvaranjem ROS-a izazvani uporabom psihostimulansa mogu se bolje razumjeti u kontekstu epigenetskih promjena. Novi pristupi liječenju ovisnosti pojavili su se kroz istraživanje epigenetskih mehanizama koji se oslanjaju na redoks reakcije tijekom korištenja psihostimulansa [26]. Iako nema radova koji ispituju utjecaj epigenetskih promjena povezanih s redoks ravnotežom kod *D. melanogaster* ideja je da se administracijom QUE smanje oksidativne vrste, čime bi spriječili negativne posljedice koje ROS ima na neuralnu plastičnost i druge promjene koje se dešavaju u mozgu kao što su epigenetske promjene.

2. Cilj rada

Glavna svrha ovog istraživačkog rada je ispitati potencijalan učinak antioksidansa QUE-a na razvojni ciklus uslijed administracije METH-a kod *Drosophila melanogaster*. Glavna hipoteza se temelji na činjenici da promjene u redoks statusu stanice utječu na histonske promjene u spolnim stanicama mužjaka koji su izloženi METH-u. QUE radi svojih antioksidativnih svojstava, potencijalno može smanjiti učinak oksidativnog stresa uvjetovanog METH-om. Utjecaj QUE-a na razvojni ciklus praćen je nakon izlaganja mužjaka METH-u tako što je pomiješan s hranom u različitim koncentracijama.

Cilj rada je istražiti utjecaj dvaju koncentracija QUE na promjene u razvojnom ciklusu nakon izlaganja vMETH-u kroz kvantifikaciju broja embrija, čahura i mušica.

3. Materijali i metode

3.1. Soj vinske mušice

Za eksperiment su korišteni *wild type Canton S.* mužjaci i ženke vinske mušice, *D. melanogaster*, 3 do 5 dana starosti. Mušice su uzgajane na standardnom mediju od kukuruznog brašna i agara, a čuvane su u inkubatoru u uvjetima svjetlo/mrak (12 sati:12 sati) na temperaturi od 25°C i 70% vlažnosti.

3.2. Kemikalije

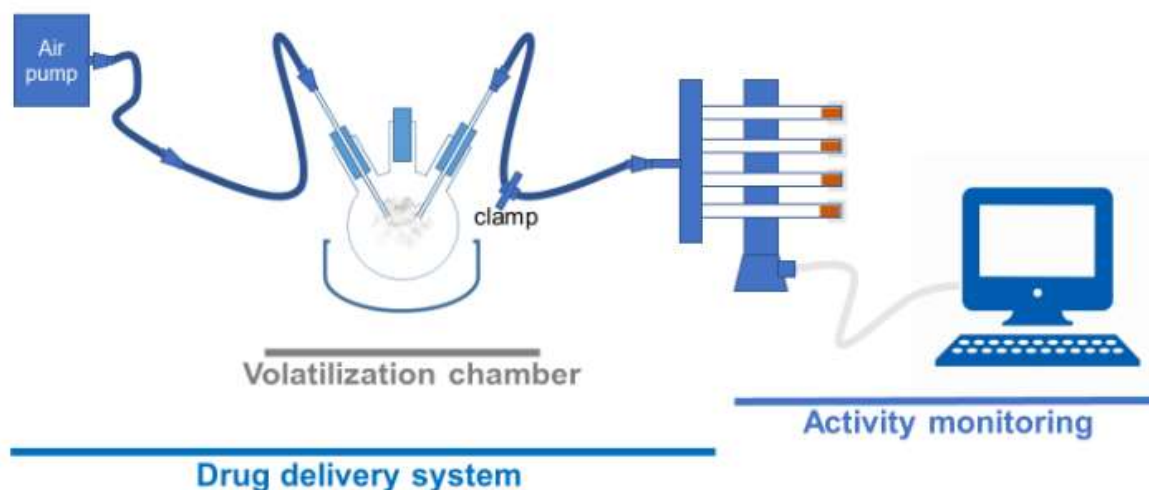
Psihostimulans metamfetamin-hidroklorid (METH) i kvercetin dihidrat (QUE) su dobavljeni od tvrtke Sigma Alrich. QUE je korišten u eksperimentu kao dodatak prehrani, pomiješan s melasa hranom u dvije koncentracije (0.6 mM i 3.2 mM). Korištene koncentracije QUE su prethodno literaturno utvrđene kao netoksične za mušice.

3.3. Priprema uzoraka za *FlyBong*

Dan prije eksperimenta je prikupljeno 128 mužjaka *D. melanogaster* pomoću CO₂ anestezije. Hrana iz vijalica u kojima su mušice uzgojene je korištena za pripremu cjevčica DAM (eng. *Drosophila activity monitoring*) sustava. Hrana je izrezana na ploške debljine 5 mm i ostavljena na papirnatoy maramici kako bi se apsorbirao višak tekućine. Hrana je zatim stavljena u polikarbonatne DAM cjevčice tako da se cjevčica okomito utisne u hranu, a kako se hrana ne bi isušila taj kraj cjevčice se omota parafilmom. Mužjaci su individualno prebačeni u DAM cjevčice pomoću aspiratora najmanje 12 sati prije eksperimenta radi privikavanja na novi okoliš. Na taj način je pripremljeno 128 DAM cjevčica za 4 *FlyBong* monitora.

3.4. Administracija METH-a

FlyBong je metoda za mjerenje lokomotorne aktivnosti mušica nakon izlaganja psihostimulansu (PS). Sastoji se od sustava za administraciju PS i DAM sustava za praćenje lokomotorne aktivnosti (Slika 3). Sustav za administraciju PS čine staklena tikvica s tri grla i grijaća kapa koje zajedno tvore volatilizacijsku komoru. U tikvicu se dodaje otopina PS (75 μ L METH-a) i etanola 4 do 6 sati prije administracije METH-a kako bi se osiguralo potpuno isparavanje etanola. Grijaće kape zagrijavaju tikvicu 8 minuta do temperature 185-200°C, kada dolazi do isparavanja METH-a. Volatilizacijska komora je povezana gumenim cijevima sa zračnom pumpom i DAM sustavom. Nakon zagrijavanja, uključivanjem zračnih pumpi s protokom zraka od 2,5 L/min se putem gumenih cijevi volatilizirani METH (vMETH) potiskuje do DAM sustava 1 minutu [27]. Kontrolna skupina podlegnuta je istom postupku, ali bez vMETH-a tako da je izložena samo vrućem zraku.



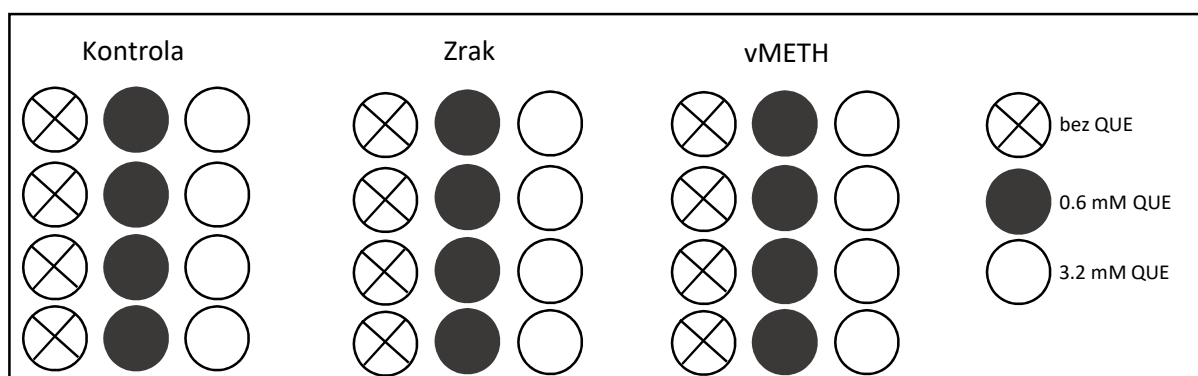
Slika 3. Shema *FlyBong* metode za administraciju vMETH-a i praćenje lokomotorne aktivnosti mušica. U volatilizacijsku komoru se pipetira METH otopljen u etanolu. Nakon što etanol ispari zagrijava se volatilizacijska komora do temperature isparavanja METH-a. Aktiviranjem zračne pumpe mušice se jednu minutu izlažu vMETH-u. Tijekom 30 minuta prije i 30 minuta nakon izlaganja vMETH-u, lokomotorna aktivnost se bilježi za svaku minutu kao broj prelazaka kroz sredinu DAM cjevčice [27].

3.5. Selekcija mužjaka i kvantifikacija razvojnog ciklusa

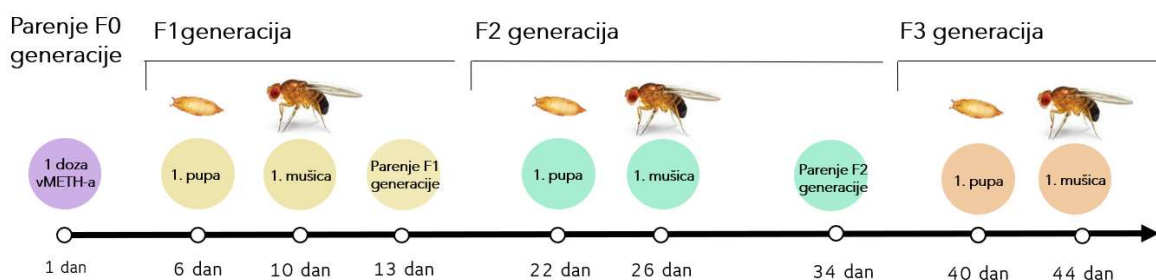
Najveći utjecaj jedne doze METH-a je vidljiv u prvih 10 min nakon administracije, stoga je na temelju tih podataka od ukupno izložena 64 mužjaka odabrano 12 mužjaka s najvećim lokomotornim odgovorom na vMETH i vrući zrak (kontrola za eksperimentalnu grupu - ZRAK. Netretirana kontrola (KONTROLA) bili su mužjaci koji su nasumično odabrani iz kultivacijskih vijalica (12 mužjaka).

Mušjaci su prebačeni u vijalice na hranu bez QUE, ili sa 0.6 mM QUE i 3.2 mM QUE (Slika 4). Svakom mužjaku je dodana netretirana djevica i oni označavaju *F0 generaciju, nakon čega su ostavljeni na hrani 6 dana kako bi oplođene ženke položile jajašca. Embriji su prebrojavani svaki dan tijekom 7 dana od pojave prvog embrija. Prva čahura se pojavila 6. dan, a prva mušica se izlegla 10. dan. Čahure i mušice su prebrojavane svaki dan tijekom 10 dana. Mušice F1 generacije su stavljene na parenje 13 dan od početka eksperimenta. Prve čahure su se pojavile 9. dan, a prve mušice su se izlegle 13. dan od početka parenja F1 generacije. Mušice F2 generacije su stavljene na parenje 34 dan od početka eksperimenta. Prve čahure su se pojavile 6. dan, a prve mušice su se izlegle 10. dan od početka parenja F2 generacije. Čahure F2 i F3 generacije su prebrojavane tijekom 8 dana, a mušice tijekom 10 dana (Slika 5).

*F0 generacija su roditelji; mužjaci izloženi METH-u i netretirane djevice. F1 generacija su potomci F0, F2 su potomci F1, a F3 su potomci F2 generacije.



Slika 4. Dizajn eksperimenta. Eksperiment se sastojao od tri skupine; **KONTROLA**=netretirani mužjaci (n=12), **ZRAK**= mužjaci koji su primili vrući zrak u *FlyBong*-u (n=12) i **vMETH**= mužjaci koji su primili 1 dozu vMETH na 1 min (n=12). U svakoj skupini su bile tri podskupine različitih koncentracija QUE pomiješanog u hranu: križić= hrana bez QUE, crni krug= 0.6 mM QUE i bijeli krug= 3.2 mM QUE. Svakom muškaku je dodana djevnica koja nije bila prethodno tretirana. Mušice su ostavljene na hrani 6 dana. n=broj mužjaka.



Slika 5. Kronološki tijek eksperimenta.

3.6. Obrada podataka, statistička analiza i prikaz rezultata

Za unos podataka korišten je program MS Excel, a daljnje statističke analize su rađene programom GraphPad Prism 9.4.0. Podatci za kontrolnu skupinu (KONTROLA), skupinu ZRAK i eksperimentalnu skupinu (vMETH) su analizirani u programu GraphPad Prism 9.4.0. jednosmjernim ANOVA testom i Tukey testom za višestruku usporedbu. Podaci su analizirani i dvosmjernim ANOVA testom (mješoviti model). Rezultati su prikazani u obliku kumulativnih grafova, histograma i kružnih dijagrama (*engl. pie chart*).

4. Rezultati

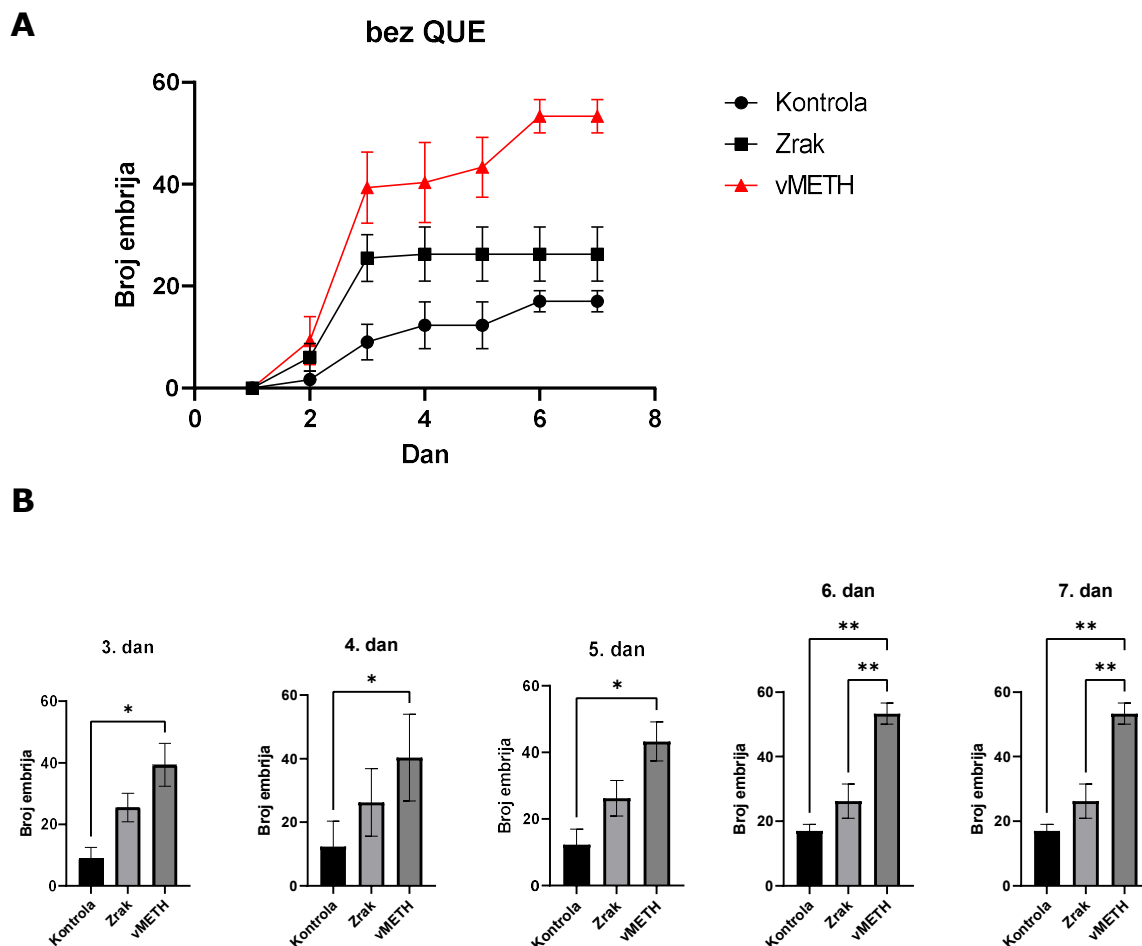
Provedenim pokusom smo ispitali djelovanje antioksidansa (QUE) na promjene u oksidacijskom statusu uslijed izlaganja vMETH-u. *FlyBong* metodom je 64 mužjaka izloženo jednoj dozi vMETH-a (grupa vMETH), a 64 mužjaka je izloženo istom postupku bez METH-a (grupa ZRAK). Izdvojeni su mužjaci s najvećim lokomotornim odgovorom na vMETH i ZRAK te netretirani mužjaci (KONTROLA) koji su pareni 6 dana s netretiranim djevicama u vijalicama s hranom obogaćenom QUE (0.6 mM i 3.2 mM) ili bez QUE. Nakon toga je kvantificiran broj embrija, čahura i mušica. Utjecaj METH-a i QUE-a je praćen tijekom tri generacije.

4.1. METH povećava broj embrija u F1 generaciji

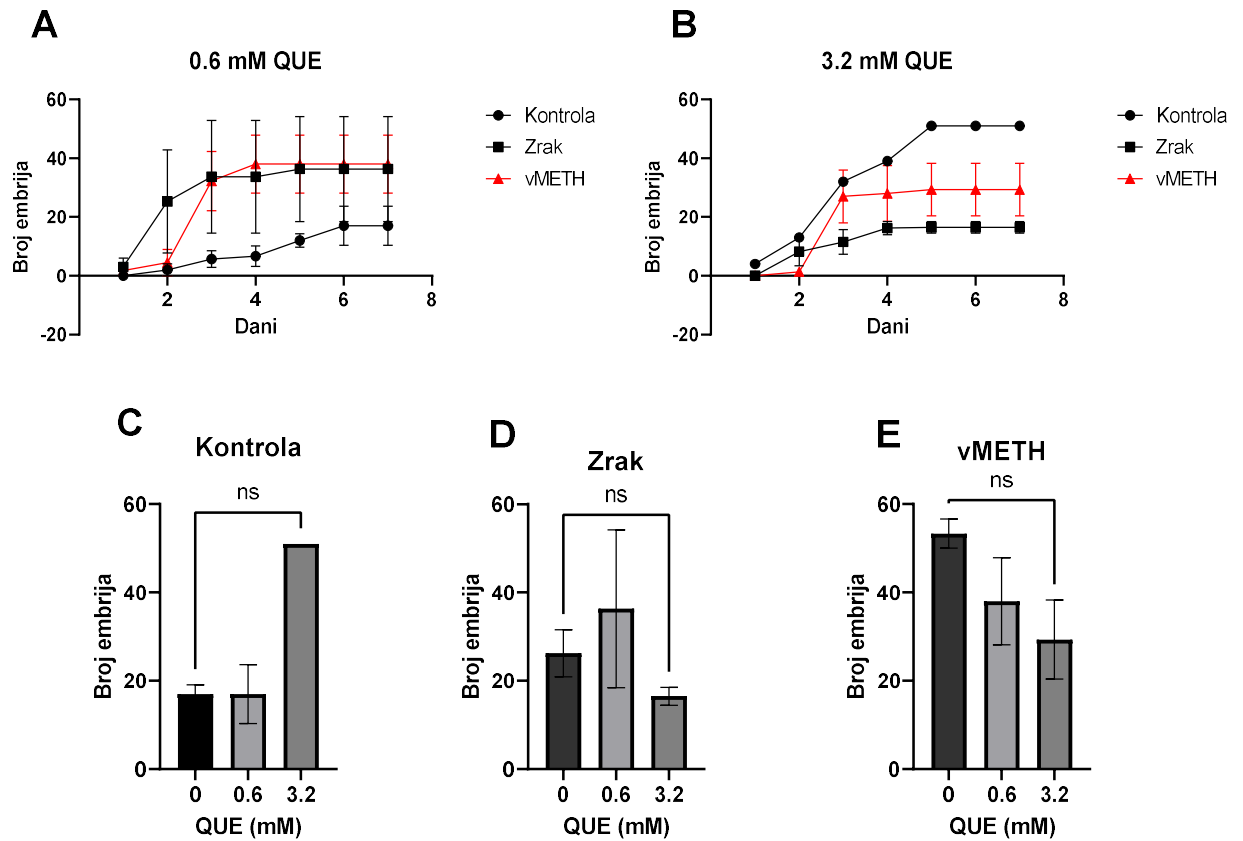
Izlaganje mužjaka vMETH-u bez tretmana QUE dovelo je do značajnog povećanja broja embrija (Slika 6.A). Statistička značajnost je vidljiva od trećega dana od pojave prvog embrija (Slika 6.B). Dodatak 0.6 ili 3.2 mM QUE poništio je utjecaj vMETH-a na povećanje broja embrija (Slika 7.A i B). 0.6 mM koncentracija QUE je smanjila broj embrija u grupi vMETH, a 3.2 mM QUE još više (Slika 7.E). KONTROLNA skupina je imala najmanji broj embrija na hrani bez QUE i 0.6 mM QUE, dok je 3.2 mM QUE povećao broj embrija (Slika 7.C). Rezultati pokazuju da je 3.2 mM QUE povećao broj embrija kod KONTROLNE grupe u odnosu na hranu bez QUE i 0.6 mM QUE. 3.2 mM QUE je osim što je kao i 0.6 mM QUE smanjio broj vMETH embrija, značajnije smanjio broj embrija u grupi ZRAK (Slika 7.D).

S obzirom na dobivene rezultate utjecaja vMETH-a na broj embrija očekivali smo povećan broj čahura i mušica bez tretmana QUE. Međutim, samo izlaganje vMETH-u nije dovelo do očekivanih rezultata te samim time ni QUE nije doveo do značajnog povećanja i smanjenja broja čahura i mušica. Iako nije došlo do statistički značajne razlike u vMETH skupini uočen je trend povećanja broja čahura i mušica (Slika 8.A i D). Najmanji

broj čahura i mušica je i dalje u KONTROLNOJ grupi na hrani bez QUE i 0.6 mM QUE, dok je najveći kod 3.2 mM QUE (Slika 8.). 3.2 mM QUE je smanjio broj čahura u grupi ZRAK (Slika 8.C).

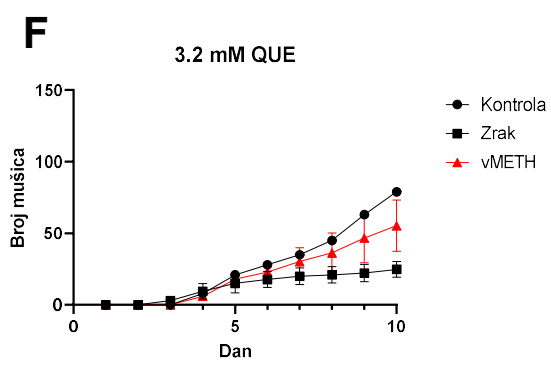
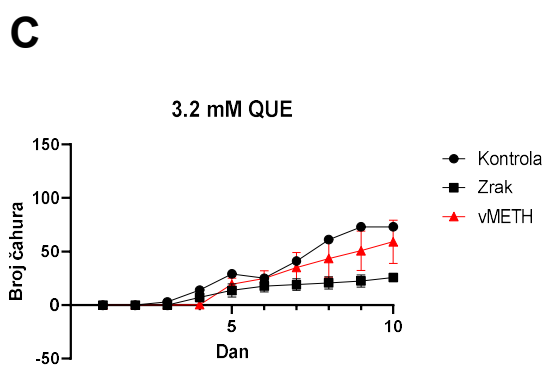
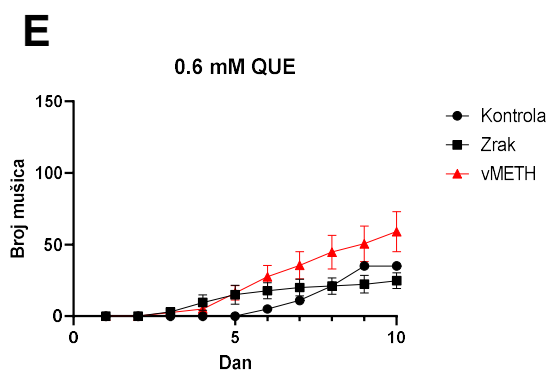
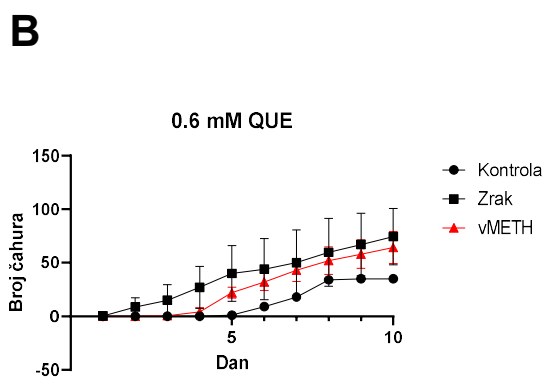
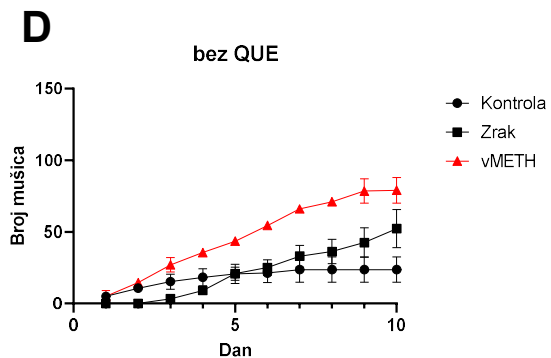
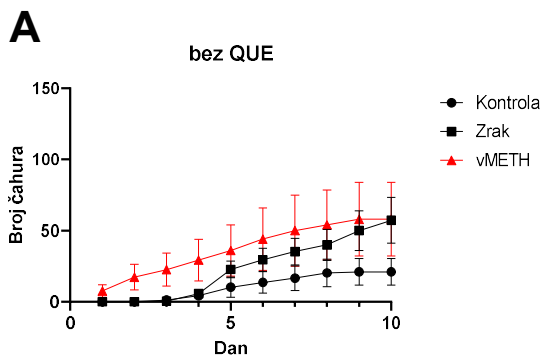


Slika 6. QUE smanjuje povećanje broja embrija uslijed izlaganja vMETH-u. Nakon primljene doze vMETH-a mužjaci su pareni 6 dana s netretiranim djevicama. Embriji su prebrojavani svaki dan tijekom 7 dana. Grafovi prikazuju kumulativni broj embrija tri skupine (KONTROLA=netretirane mušice, ZRAK=kontrola za eksperimentalnu manipulaciju i vMETH=mužjaci izloženi vMETH-u) na hrani: **A**) bez QUE, **C**) 0.6 mM QUE i **D**) 3.2 mM QUE. **B**) Histogramski prikaz kumulativnog broja embrija po danima. Jednosmjerna ANOVA statistička analiza s Tukey testom višestrukih usporedbi pokazala je višestruku značajnost: * značajnost $p < 0,0500$, ** $p < 0,0100$.



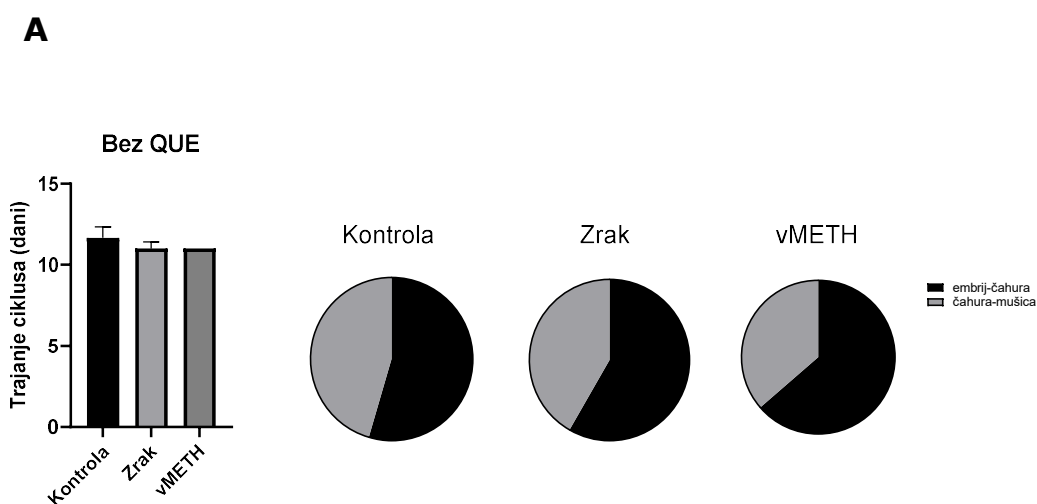
Slika 7. 3.2 mM koncentracija QUE povećava broj embrija kod netretiranih mušica. Grafovi prikazuju kumulativni broj embrija tri skupine (KONTROLA=netretirane mušice, ZRAK=kontrola za eksperimentalnu manipulaciju i vMETH=mužjaci izloženi vMETH-u) na hrani: **A**) 0.6 mM QUE i **B**) 3.2 mM QUE. Histogramski prikaz kumulativnog maksimuma broja embrija za 7 dana kod skupina: **C**) Netretirana KONTROLA, **D**) ZRAK i **E**) vMETH s obzirom na koncentraciju QUE (0, 0.6 i 3.2 mM QUE). Jednosmjerna ANOVA statistička analiza s Tukey testom višestrukih usporedbi nije pokazala statističku značajnost između skupina: ns= nema značajnosti.

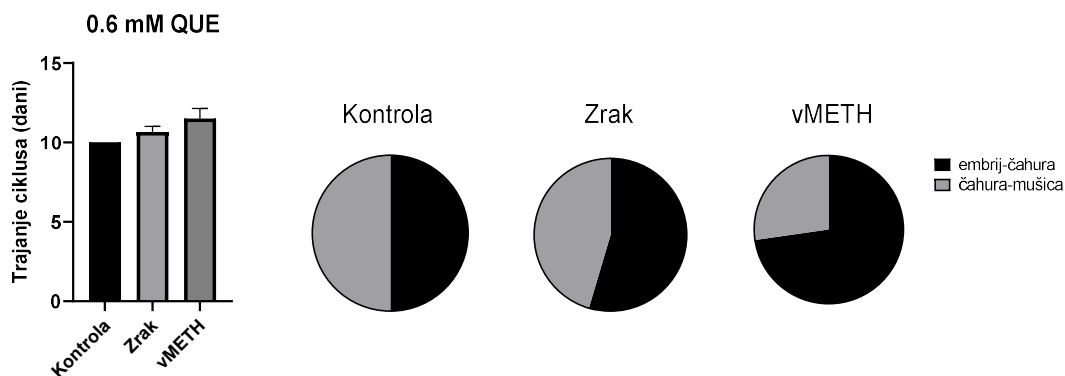
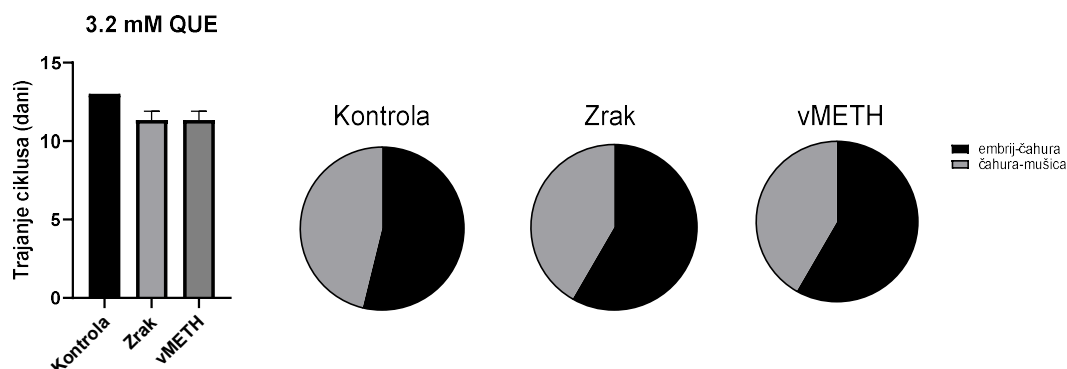
ČAHURE (lijevo) i MUŠICE (desno)



Slika 8. METH ne dovodi do povećanja broja čahura i mušica F1 generacije. Pojavom prve čahure započeto je njihovo prebrojavanje. Čahure i mušice su prebrojavane svaki dan tijekom 10 dana. Na grafovima je prikazan kumulativni broj čahura i mušica s obzirom na koncentraciju QUE u hrani: **A)** čahure odrasle na hrani bez QUE, **B)** hrani s 0.6 mM QUE i **C)** hrani s 3.2 mM QUE, **D)** mušice odrasle na hrani bez QUE, **E)** hrani s 0.6 mM QUE i **F)** hrani s 3.2 mM QUE

Usporedno s brojem embrija, čahura i mušica promatrana je i dužina razvojnih stadija. Praćeno je trajanje razvoja od embrija do čahure i od čahure do mušice. Iako rezultati nisu statistički značajni vidljiv je trend produljenja perioda razvoja od embrija do čahura nakon izlaganja mužjaka vMETH-u. Razvoj je u prosjeku produljen za 1 dan u odnosu na skupine KONTROLA i ZRAK (Slika 9.A). QUE nije imao značajnog utjecaja na skraćenje razvoja u grupi KONTROLA i ZRAK, već je i tu prisutan trend produljenog perioda razvoja za grupu vMETH u usporedbi s kontrolnim skupinama (Slika 9.B i C). Vidljivo je kraće trajanje razvoja embrija do čahure kod kontrolne skupine na 0.6 mM QUE (Slika 9.B), no takav rezultat se može pripisati nedovoljnom broju replika te se stoga taj podatak ne može koristiti za tumačenje utjecaja METH-a i QUE-a.

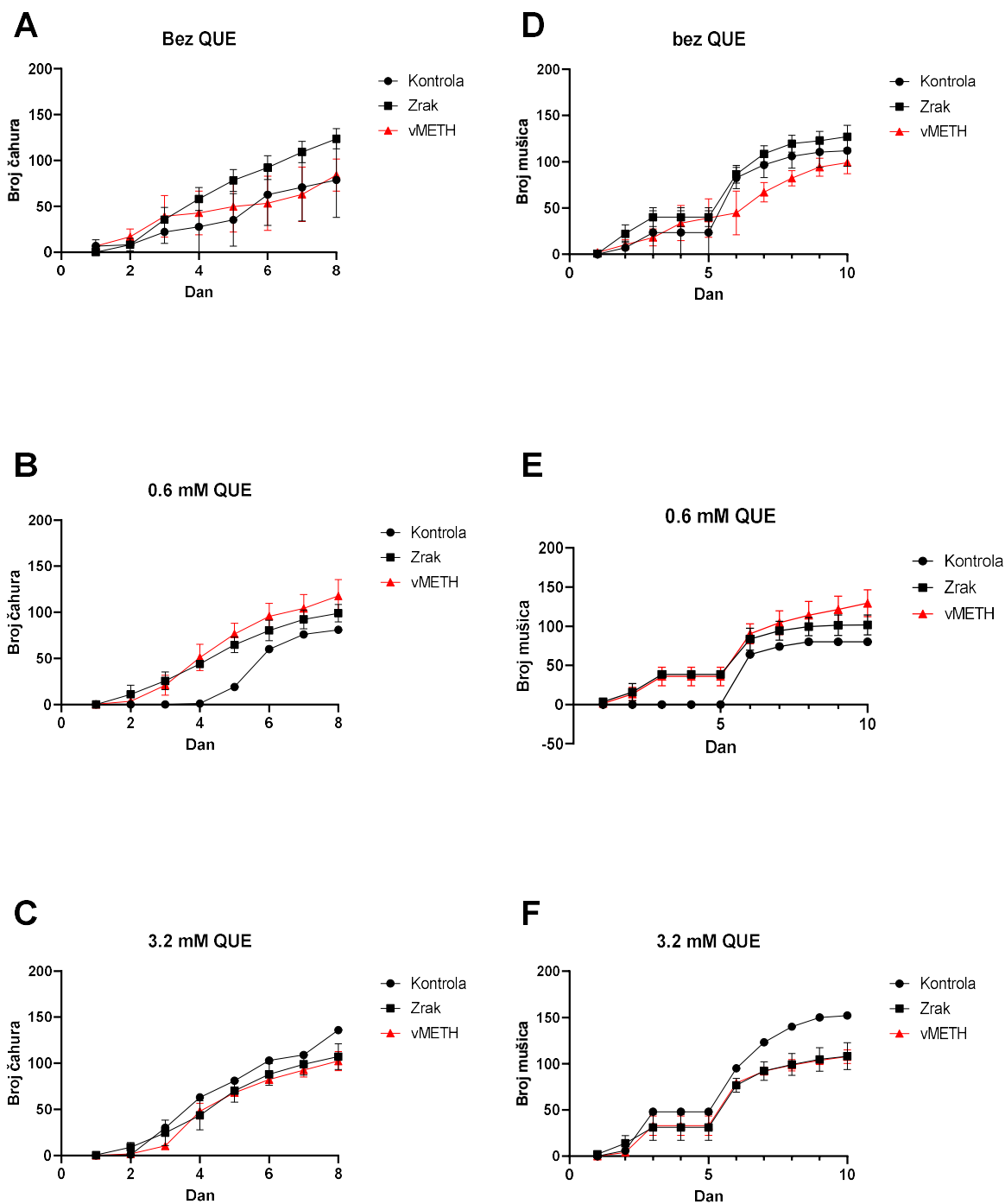


B**C**

Slika 9. Potencijalni utjecaj METH-a na produljenje razvojnog ciklusa od embrija do čahure. A) Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, bez tretmana QUE, po skupinama; KONTROLA (netretirane mušice), ZRAK (kontrola za eksperimentalnu manipulaciju) i vMETH (mužjaci izloženi vMETH-u) s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za opisane skupine, crno= od embrija do čahure, sivo= od čahure do mušice **B)** Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, s tretmanom **0.6 mM QUE**, s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za navedene skupine. **C)** Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, s tretmanom **3.2 mM QUE**, s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za navedene skupine.

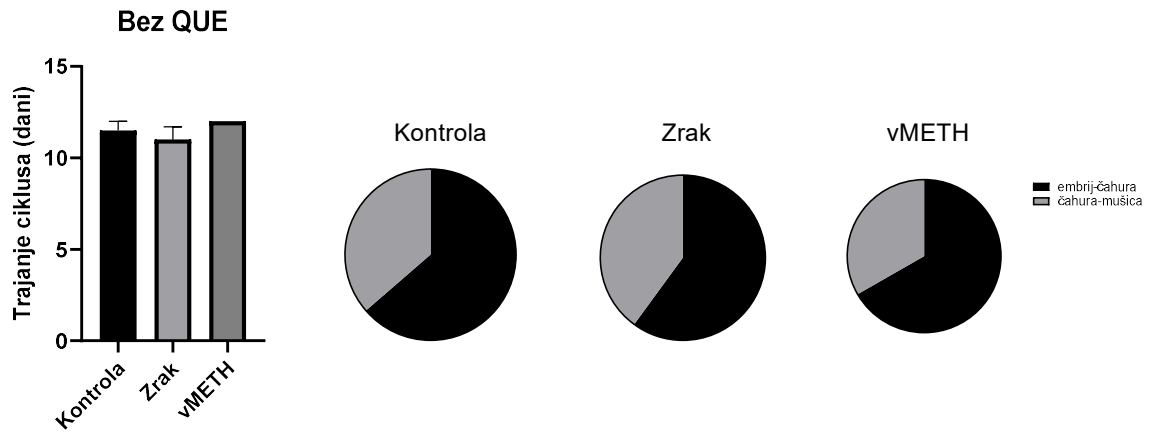
4.2. METH-a nije utjecao na razvojni ciklus F2 generacije

Kako bi uočili prenosi li se utjecaj vMETH-a i QUE-a na F2 generaciju nasumično su odabrani potomci F1 generacije, 3 mužjaka i 3 ženke iz svake skupine (KONTROLA, ZRAK i vMETH), te su stavljeni na hranu bez dodatka QUE. Utjecaj vMETH-a nije prenesen na broj čahura i mušica F2 generacije (Slika 10.), što je očekivano s obzirom da utjecaj nije bilo statistički značajan kod F1 generacije. Nagli skok broja mušica s petog na šesti dan je propust u brojanju mušica jer nedostaju rezultati za četvrti i peti dan (Slika 10.D, E i F). Iako tretman vMETH-om ne dovodi do povećanja broja čahura i mušica F2 generacije, tretman QUE pokazuje trend povećanja broja potomaka kod KONTROLE (Slika 10.C i F). 3.2 mM QUE je u KONTROLNOJ grupi ponovno uvjetovao najveći broj čahura i mušica, dok je na hrani bez QUE i 0.6 mM QUE imao najmanji utjecaj (Slika 10.). QUE i METH nisu imali utjecaja na duljine stadija razvojnog ciklusa (Slika 11.). Skraćenje razvojnog ciklusa u kontrolnoj grupi za 3.2 mM QUE odstupa od ostalih zbog nedostatka replika te stoga rezultat nije značajan za interpretaciju.

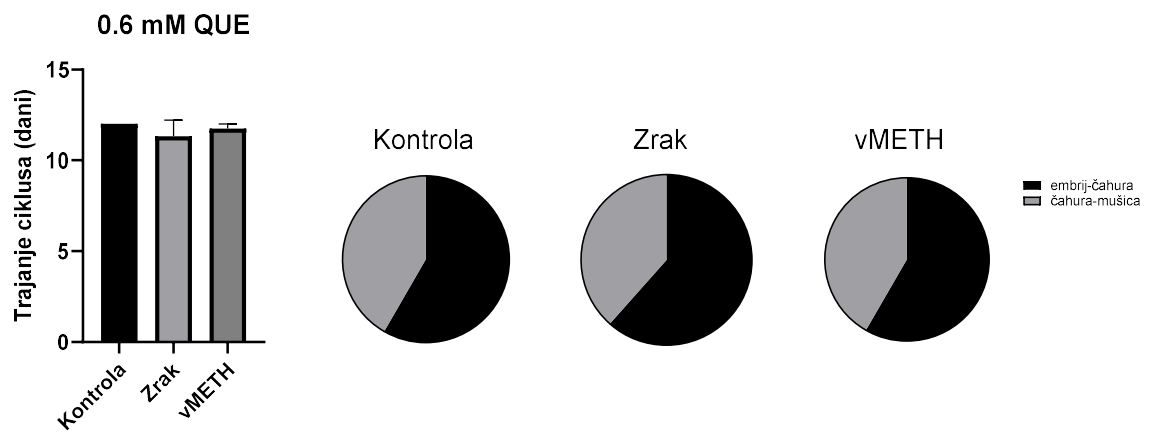


Slika 10. Potencijalni učinak 3.2 mM QUE na povećanje broja čahura i mušica F2 generacije. Kumulativni prikaz broja čahura i mušica F2 generacije. 3 mužjaka i 3 ženke F1 generacije iz svake skupine su stavljeni na parenje na hranu bez dodatka QUE. Pojavom 1. čahure i 1. mušice započeto je njihovo prebrojavanje. Čahure su prebrojavane svaki dan tijekom 8 dana, a mušice tijekom 10 dana. Na grafovima je prikazan kumulativni broj čahura (**A**, **B** i **C**) i mušica (**D**, **E** i **F**) s obzirom na skupinu iz koje su potekle (skupine s obzirom na koncentraciju QUE u hrani).

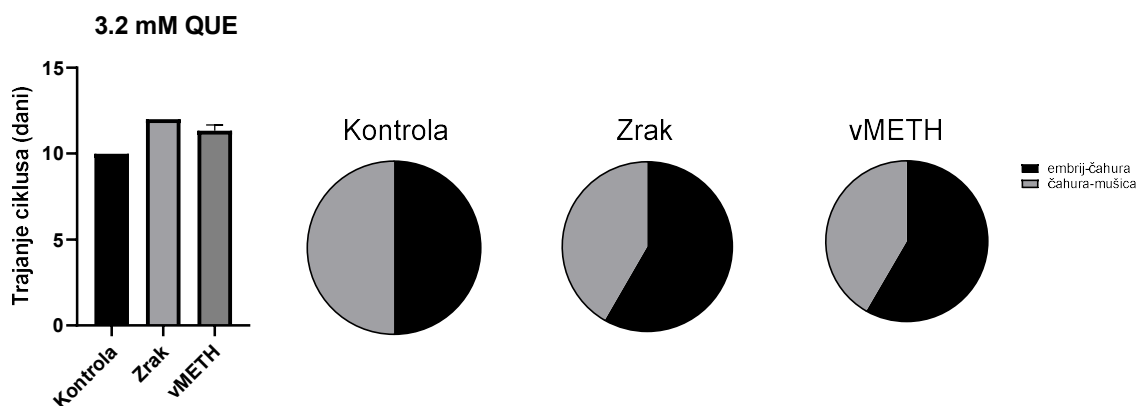
A



B



C



Slika 11. Utjecaj METH-a i QUE-a na duljinu razvojnog ciklusa F2 generacije mušica. A) Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, **bez tretmana QUE**, po skupinama; KONTROLA (netretirane mušice), ZRAK (kontrola za eksperimentalnu manipulaciju) i vMETH (mužjaci izloženi vMETH-u) s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za opisane skupine, crno= od embrija do čahure, sivo= od čahure do mušice **B)** Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, s tretmanom **0.6 mM QUE**, s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za navedene skupine. **C)** Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, s tretmanom **3.2 mM QUE**, s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za navedene skupine.

Isti eksperiment ponovili smo i za F3 generaciju. Nasumičnim odabirom su također izdvojena 3 mužjaka i 3 ženke F2 generacije koji su pareni na hrani bez dodatka QUE. Rezultati su pokazali da nema utjecaja vMETH-a i QUE-a na broj čahura i mušica. Sukladno tome nema razlika u trajanju razvoja od embrija do čahure između skupina (prilog slika 12. i 13.).

5. Rasprava

U ovom eksperimentalnom radu ispitan je utjecaj antioksidansa QUE, na oksidacijske promjene uslijed izlaganja mužjaka vinske mušice vMETH-u. Nakon izlaganja vMETH-u mušice su stavljene na hranu obogaćenu QUE u dvije koncentracije (0.6 mM i 3.2 mM). Prema preliminarnim rezultatima [28] pokazano je da vMETH utječe na razvojni ciklus vinske mušice tako da povećava broj potomaka. Naša hipoteza pretpostavlja da će prehrana obogaćena QUE-om smanjiti učinke koje vMETH-a ima na redoks ravnotežu, a time i poništiti utjecaj METH-a na broj potomaka. Dobiveni rezultati su pokazali da vMETH dovodi do statistički značajnog povećanog broja embrija te vidljivog trenda povećanja broja čahura i mušica F1 generacije što je u suglasnosti s preliminarnim rezultatima [28]. Dobiveni rezultati su također pokazali da postoji potencijalni učinak QUE-a na smanjenje broja potomaka F1 generacije. 3.2 mM koncentracija QUE-a je pokazala trend povećanja broja embrija, čahura i mušica kod netretirane kontrole. Također prema preliminarnim rezultatima pretpostavljeno je da će se utjecaj vMETH-a prenijeti i na F2 generaciju. Međutim, naši rezultati ne pokazuju prijenos utjecaja vMETH-a na F2 i F3 generaciju. No, zanimljivo je da je utjecaj 3.2 mM koncentracije QUE-a pokazala trend povećanja broja čahura i mušica kod netretirane kontrole u F2, ali ne i u F3 generaciji. Ovi rezultati upućuju na potencijalni intergeneracijski i transgeneracijski utjecaj antioksidativne prehrane na broj potomaka.

Okolišni utjecaji, kao što je izloženost drogama i prehrana roditelja poznati su utjecaji koji mogu biti naslijeđeni kroz generacije preko epigenetskih modifikacija. Brojne studije pokazuju nasljeđivanje takvih utjecaja preko majčine linije. Epigenetske promjene mogu se dogoditi kada je majka izložena drogi u različitim periodima, prije trudnoće ili i za vrijeme. Sve je više istraživanja i o izloženosti očeva i važnosti nasljeđivanja preko očeve linije. U studiji na miševima pokazano je da očeva izloženost kokainu utječe na razvoj potomaka. Potomstvo očeva izloženih kokainu je imalo

smanjen promjer glave i poremećaje pažnje i pamćenja [29]. U našem istraživanju nakon izlaganja mužjaka vMETH-u utjecaj se prenio na F1, ali ne i na F2 generaciju te je time pokazan potencijalni intergeneracijski, ali ne i transgeneracijski utjecaj što je djelomično u skladu s našim preliminarnim rezultatima.

Prethodne studije o transgeneracijskim učincima kod *Drosophila melanogaster* sugeriraju da roditeljska prehrana može utjecati na veličinu tijela, trajanje razvoja i veličinu jajašca sljedeće generacije [30] što se prenosi pod utjecajem epigenetskih promjena koje se mogu dogoditi u odrasloj dobi, pubertetu ili na zametnim stanicama. Stoga su epigenetske promjene jedan od potencijalnih objašnjenja prijenosa utjecaja QUE-a na F1 i F2 generaciju. Studije u kojima su promatrali kako promjene u prehrani (bogata ili siromašna prehrana šećerom i proteinima) utječu na fenotip potomaka pokazuju da kada se uzmu u obzir samo dvije generacije (F0 i F1), na fenotipove potomaka je primarno utjecala njihova vlastita prehrana, a u manjoj mjeri prehrana roditelja. Međutim, kada se uzmu u obzir tri generacije (F0, F1 i F2), na fenotipove potomaka je prvenstveno utjecala prehrana F0 generacije i njihova vlastita prehrana. Kada je F0 generacija slabo hranjena, a F1 generacija bogato, F1 generacija je polagala značajno veća jajašca kojima je razvoj trajao duže [31]. U drugim istraživanjima pokazano je da očeva pothranjenost može promijeniti epigenom sperme, što može utjecati na razvoj fetusa i povećati rizik od metaboličkih bolesti kod odraslih jedinki [32].

Posljednjih godina sve je više radova koji ispituju utjecaj prehrambenih antioksidansa kod smanjenja oksidativnog stresa. U studiji na *D. melanogaster* pokazano je da je predtretman antioksidansom (lipoičnom kiselinom) smanjio oksidativni stres izazvan parakvatom (herbicid) [20]. Izlaganje mužjaka parakvatom bez predtretmana antioksidansom negativno je utjecalo na broj potomstva. Naši rezultati nisu u korelaciji s ovim rezultatom te je u našem slučaju izlaganje vMETH-om pozitivno

utjecalo na broj potomstva. Jedno od mogućih objašnjenja za takav rezultat je snažna antioksidativna obrana aktivirana izlaganjem mužjaka jednoj dozi vMETH-a. Naime, u istraživanju gdje je mjerena koncentracija vodikovog peroksida u glavama mušica, prije izlaganja vMETH-u, te nakon 1. i 2. doze, pokazano je da se koncentracija vodikovog peroksida smanjuje nakon 1. doze, a povećava nakon 2. doze [33]. Takvi rezultati upućuju na pojačanu antioksidativnu obranu koja je potencijalno eliminirala oksidacijski stres uzrokovan vMETH-om. Ako se to objašnjenje primjeni na naše rezultate to bi značilo da je smanjenje vodikovog peroksida, a time potencijalno i ROS-a pozitivno utjecalo na povećanje broja potomstva.

Potencijalni učinak 3.2 mM koncentracije QUE-a na povećan broj potomaka netretirane skupine se može objasniti i na temelju vitalnosti spermija pri konzumaciji prehrane obogaćene antioksidansima. Prethodno spomenuta studija u kojoj su mužjaci *D. melanogaster* primili predtretman lipoičnom kiselinom i melatoninom te su zatim bili izloženi parakvatu je također pokazala da suplementacija prehrane antioksidansima povećava privlačnost mužjaka i fertilitet te pojačava obranu spolnih stanica od oksidativnog stresa. Prehrana obogaćena lipoičnom kiselinom je dovela do povećanja broja spermija i povećala razinu antioksidativne zaštite od toksičnih utjecaja parakvata što je rezultiralo većem broju potomaka u odnosu na netretiranu kontrolu [20].

Naši rezultati ukazuju na značaj prehrane obogaćene QUE-om na promjene u redoks statusu uslijed izlaganja vMETH-u. No, zbog nedovoljne optimizacije eksperimenta (mali broj replika i kvaliteta hrane) dobiveni rezultati nisu statistički značajni iako su vidljivi trendovi smanjenja broja potomaka u vMETH grupi i povećanja u KONTROLNOJ grupi. Naime, problem nedovoljno kvalitetne hrane uzrokovan je velikom količinom agara koji stvara prečvrstu mrežu na površini hranjivog medija, stoga mušice nisu bile u mogućnosti doći do svih potrebnih hranjivih tvari zbog čega je značajan broj mušica uginuo. Nedovoljno dobra kvaliteta hrane je najveći

utjecaj imala na djevice koje su ugibale kada su stavljene na parenje s mužjakom. Pomor ženki je uzrokovao produljenje praćenja početka razvojnog ciklusa iz razloga što je u svaku vijalicu stavljan samo jedan par mušica, odnosno jedna ženka (djeвица) i mužjak. Kada bi ženka u razdoblju parenja uginula nije bila u mogućnosti položiti jajašca te se time odgađa početka razvojnog ciklusa. Svaka uginula ženka je zamijenjena novom. No, novoj ženki je opet potrebno vrijeme za parenje (oko 24-48h) i polaganje jajašca. Time je vrijeme početka ciklusa produljeno što je otežalo interpretaciju brzine razvoja mušica i trajanja ciklusa.

Maleni broj replika je također otežao interpretaciju rezultata. Radi niskog preživljenja ženki F0 generacije u pojedinim skupinama bi ostala samo jedna replika (vijalica) na temelju koje ne možemo zaključivati o utjecajima vMETH-a i QUE-a. Na temelju navedenih nedostataka eksperimenta bilo je teško interpretirati dobivene rezultate i potvrditi utjecaj QUE-a na razvojne posljedice vMETH-a. No, bez obzira na propuste rezultati utjecaja QUE-a na broj embrija, čahura i mušica F1 i F2 generacije netretiranih roditelja (F0) upućuju na potencijalan učinak QUE-a na redoks ravnotežu spolnih stanica roditelja F0 generacije i potencijalno F1 generacije.

U budućnosti bi se eksperiment trebao ponoviti s optimiziranom formulacijom hrane, odnosno količinom agara koja se dodaje u hranu. Manja količina agara će na površini hranjivog medija omogućiti lakšu dostupnost hranjivih tvari mušicama. Time bi se omogućilo veće preživljenje ženki i praćenje brzine razvojnog ciklusa. Zatim je potrebno povećati broj replika za svaku skupinu kako bi rezultati bili statistički značajni za interpretaciju.

U budućnosti bilo bi zanimljivo pratiti utjecaj dvije doze vMETH-a na broj potomstva i kako predtretman antioksidansom na to utječe. Također bi trebalo ispitati koje se epigenetske promjene događaju uslijed izlaganja vMETH-u i tretmanu QUE.

6. Zaključak

Zlouporaba psihostimulansa, kao što je METH dovodi do razvoja ovisnosti i oksidativnog stresa koji narušava redoks ravnotežu stanice i utječe na epigenetske promjene u mozgu. Tretman QUE-om, molekulom s antioksidativnim svojstvima bi potencijalno mogao smanjiti posljedice administracije psihostimulansa koje su nastale kao posljedica oksidativnog stresa.

Za eksperiment su korišteni mužjaci vinske mušice koji su izloženi jednoj dozi vMETH-a pomoću *FlyBong* metode. Mužjaci su nakon izlaganja vMETH-u pareni sa ženkama koje nisu bile izložene vMETH-u na hrani obogaćenoj različitim koncentracijama QUE-a. Tijekom razvojnog ciklusa praćen je utjecaj QUE-a i vMETH-a na broj potomstva tri generacije.

Rezultati su pokazali da vMETH dovodi do značajnog povećanja broja embrija i pokazuje trend povećanog broja čahura i mušica F1 generacije, dok 3.2 mM koncentracija QUE smanjuje broj potomaka F1 generacije u skupini vMETH, a povećava broja potomaka F1 generacije kod netretirane skupine. Utjecaj vMETH-a se nije prenio na F2 generaciju, dok je utjecaj QUE-a vidljiv u F2 generaciji. Takvi rezultati upućuju na potencijalan transgeneracijski utjecaj antioksidansa QUE-a na oksidativne promjene izazvane vMETH-om.

Naši rezultati ukazuju na značaj prehrane obogaćene QUE-om na promjene u redoks statusu uslijed izlaganja vMETH-u. U budućnosti bi studije trebale biti usmjerene na otkrivanju epigenetskih promjena koje se događaju na spolnim stanicama mužjaka uslijed izlaganja psihostimulansima.

7. Literatura

- [1] M. A. Fernández-Moreno, C. L. Farr, L. S. Kaguni, and R. Garesse, "Drosophila melanogaster as a model system to study mitochondrial biology," *Methods Mol. Biol.*, vol. 372, pp. 33–49, 2007, doi: 10.1007/978-1-59745-365-3_3/COVER.
- [2] "Metamorphosis and development of the adult fly." <https://www.sdbonline.org/sites/fly/aimain/1adult.htm#dafka> (accessed Sep. 10, 2022).
- [3] S. Pitnick, T. A. Markow, and G. S. Spicer, "Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in Drosophila.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. 23, pp. 10614–10618, Nov. 1995, doi: 10.1073/PNAS.92.23.10614.
- [4] P. Klepsatel, M. Gálíková, N. De Maio, S. Ricci, C. Schlötterer, and T. Flatt, "Reproductive and post-reproductive life history of wild-caught Drosophila melanogaster under laboratory conditions," *J. Evol. Biol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1508–1520, Jul. 2013, doi: 10.1111/JEB.12155.
- [5] T. Flatt, "Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in Drosophila melanogaster," *Genetics*, vol. 214, no. 1, p. 3, 2020, doi: 10.1534/GENETICS.119.300160.
- [6] Z. W. Ye, J. Zhang, D. M. Townsend, and K. D. Tew, "Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1850, no. 8, pp. 1607–1621, May 2015, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2014.11.010.
- [7] T. J. Philyaw, A. Rothenfluh, and I. Titos, "The Use of Drosophila to Understand Psychostimulant Responses," *Biomedicines*, vol. 10, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/BIOMEDICINES10010119.
- [8] P. Kovacic, "Unifying mechanism for addiction and toxicity of abused drugs with application to dopamine and glutamate mediators:

- electron transfer and reactive oxygen species," *Med. Hypotheses*, vol. 65, no. 1, pp. 90–96, 2005, doi: 10.1016/J.MEHY.2005.01.031.
- [9] J. Meiser, D. Weindl, and K. Hiller, "Complexity of dopamine metabolism," *Cell Commun. Signal.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–18, May 2013, doi: 10.1186/1478-811X-11-34/FIGURES/5.
- [10] K. McDonnell-Dowling and J. Kelly, "The Role of Oxidative Stress in Methamphetamine-induced Toxicity and Sources of Variation in the Design of Animal Studies," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 15, no. 2, pp. 300–314, Jan. 2017, doi: 10.2174/1570159X14666160428110329.
- [11] A. T. Diplock *et al.*, "Functional food science and defence against reactive oxidative species," *Br. J. Nutr.*, vol. 80 Suppl 1, no. S1, pp. S77–S112, Aug. 1998, doi: 10.1079/BJN19980106.
- [12] C. Peng *et al.*, "Biology of ageing and role of dietary antioxidants," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/831841.
- [13] A. W. Boots, G. R. M. M. Haenen, and A. Bast, "Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 585, no. 2–3, pp. 325–337, May 2008, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2008.03.008.
- [14] F. A. A. Van Acker, O. Schouten, G. R. M. M. Haenen, W. J. F. Van Der Vijgh, and A. Bast, "Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant," *FEBS Lett.*, vol. 473, no. 2, pp. 145–148, May 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01517-9.
- [15] M. A. Hofmann *et al.*, "Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB," *Diabetologia*, vol. 42, no. 2, pp. 222–232, 1999, doi: 10.1007/S001250051142.

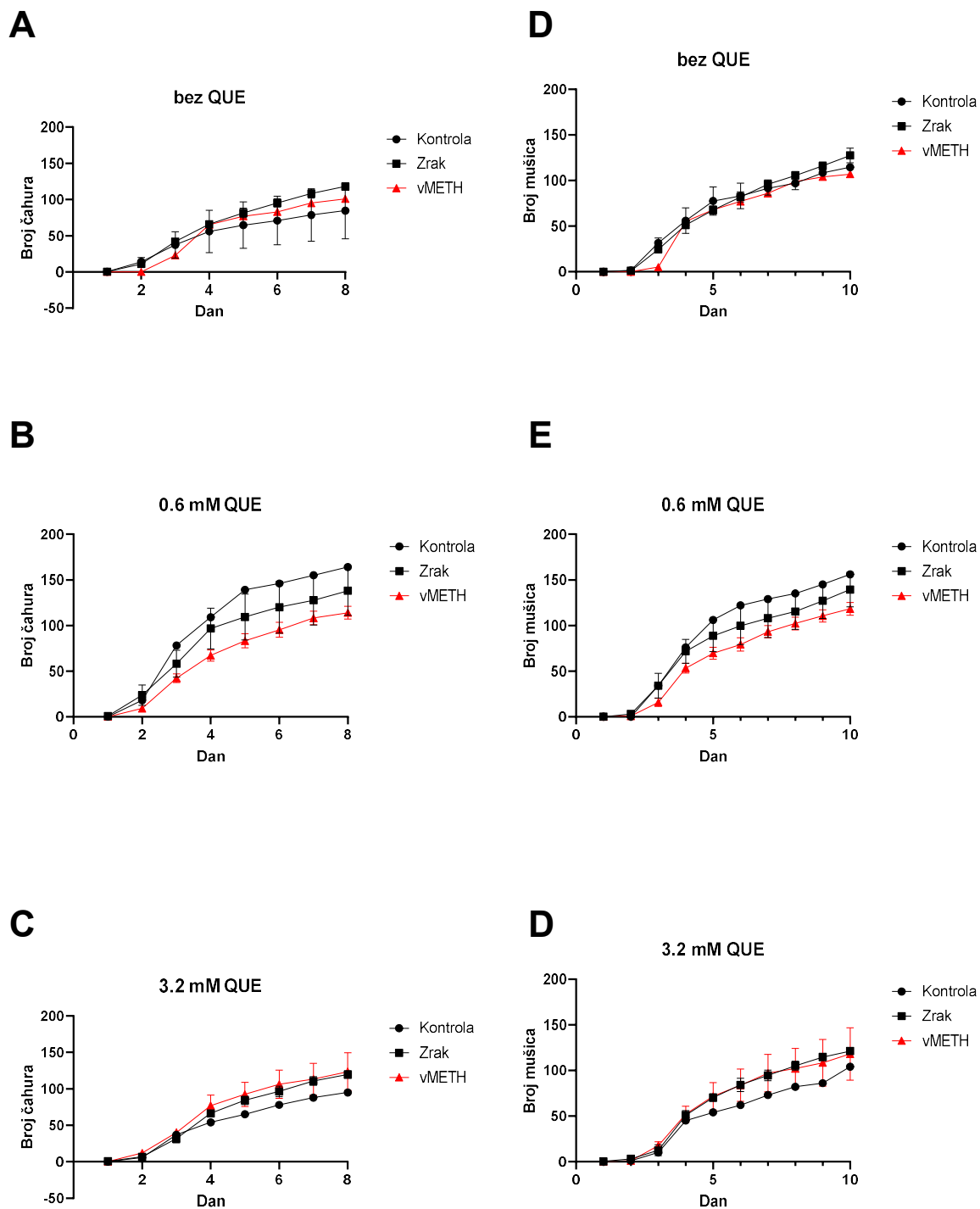
- [16] R. Numa, R. Kohen, T. Poltyrev, and R. Yaka, "Tempol diminishes cocaine-induced oxidative damage and attenuates the development and expression of behavioral sensitization," *Neuroscience*, vol. 155, no. 3, pp. 649–658, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.05.058.
- [17] Y. Yi, W. Xu, Y. Fan, and H. X. Wang, "Drosophila as an emerging model organism for studies of food-derived antioxidants," *Food Res. Int.*, vol. 143, p. 110307, May 2021, doi: 10.1016/J.FOODRES.2021.110307.
- [18] C. Peng, H. Y. E. Chan, Y. Huang, H. Yu, and Z. Y. Chen, "Apple polyphenols extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 5, pp. 2097–2106, Mar. 2011, doi: 10.1021/JF1046267.
- [19] C. Peng *et al.*, "Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*," *Exp. Gerontol.*, vol. 47, no. 2, pp. 170–178, 2012, doi: 10.1016/j.exger.2011.12.001.
- [20] W. Lang, D. Gertner, and P. Radhakrishnan, "Dietary antioxidants reduce damage and rescue sperm viability and fertility following oxidative stress in *Drosophila melanogaster*," *Entomol. Exp. Appl.*, vol. 169, no. 5, pp. 491–498, May 2021, doi: 10.1111/EEA.13034.
- [21] A. V. Anand David, R. Arulmoli, and S. Parasuraman, "Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 10, no. 20, pp. 84–89, Jul. 2016, doi: 10.4103/0973-7847.194044.
- [22] C. G. M. Heijnen, G. R. M. M. Haenen, R. M. Oostveen, E. M. Stalpers, and A. Bast, "Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited," *Free Radic. Res.*, vol. 36, no. 5, pp. 575–581, May 2002, doi: 10.1080/10715760290025951.

- [23] A. N. Begum and J. Terao, "Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 13, no. 5, pp. 265–272, 2002, doi: 10.1016/S0955-2863(01)00219-4.
- [24] P. Lakhanpal and D. K. Rai, "Quercetin: A Versatile Flavonoid," *Internet J. Med. Updat. - EJOURNAL*, vol. 2, no. 2, Nov. 2007, doi: 10.4314/ijmu.v2i2.39851.
- [25] A. R. Cyr and F. E. Domann, "The Redox Basis of Epigenetic Modifications: From Mechanisms to Functional Consequences," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 2, p. 551, Jul. 2011, doi: 10.1089/ARS.2010.3492.
- [26] V. Sundar, T. Ramasamy, M. Doke, and T. Samikkannu, "Psychostimulants influence oxidative stress and redox signatures: the role of DNA methylation," *Redox Rep.*, vol. 27, no. 1, pp. 53–59, 2022, doi: 10.1080/13510002.2022.2043224.
- [27] A. Filošević, "BEHAVIORAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF PSYCHOSTIMULANT-INDUCED NEURONAL PLASTICITY IN DROSOPHILA MELANOGASTER," Accessed: Sep. 10, 2022. [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:851086>.
- [28] A. Maslač, "Utjecaj volatiliziranog metamfetamina na razvojni ciklus Drosophila melanogaster Maslač, Ante," Accessed: Sep. 10, 2022. [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:438337>.
- [29] F. He, I. A. Lidow, and M. S. Lidow, "Consequences of paternal cocaine exposure in mice," *Neurotoxicol. Teratol.*, vol. 28, no. 2, pp. 198–209, Mar. 2006, doi: 10.1016/J.NTT.2005.12.003.
- [30] T. M. Valtonen, K. Kangassalo, M. Pölkki, and M. J. Rantala, "Transgenerational Effects of Parental Larval Diet on Offspring Development Time, Adult Body Size and Pathogen Resistance in

- Drosophila melanogaster*," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e31611, Feb. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0031611.
- [31] J. B. Deas, C. G. Extavour, and L. Blondel, "Ancestral and offspring nutrition interact to affect life-history traits in *Drosophila melanogaster*," doi: 10.1098/rspb.2018.2778.
- [32] G. de F. L. Pascoal, M. V. Geraldi, M. R. Maróstica, and T. P. Ong, "Effect of Paternal Diet on Spermatogenesis and Offspring Health: Focus on Epigenetics and Interventions with Food Bioactive Compounds," *Nutrients*, vol. 14, no. 10, May 2022, doi: 10.3390/NU14102150.
- [33] L. Fućak, "The effect of circadian genes and methamphetamine on oxidation state in *Drosophila melanogaster*," 2021, Accessed: Sep. 10, 2022. [Online]. Available: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:673854>.

Prilog završnog rada:

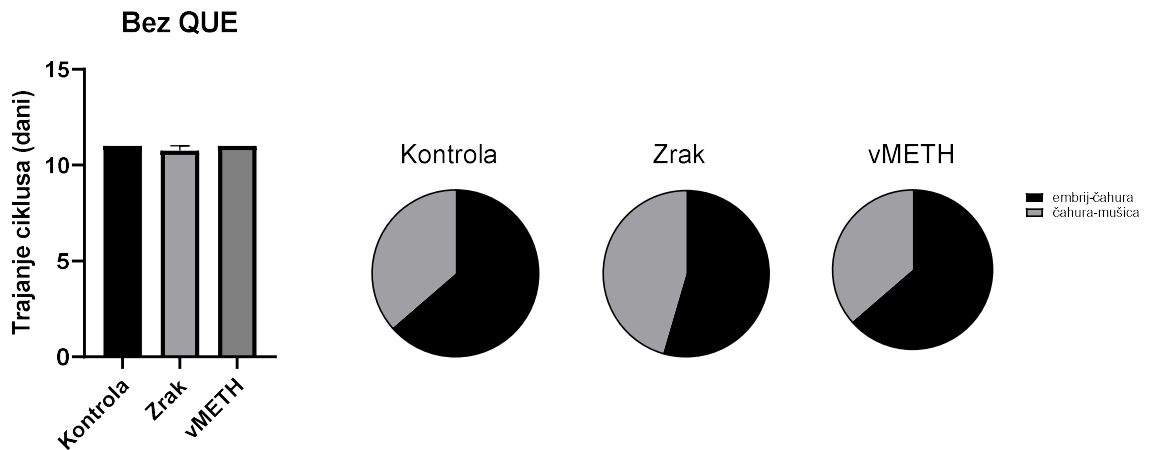
4.3. Utjecaj METH-a i QUE-a na razvoj čahura i mušica F3 generacije



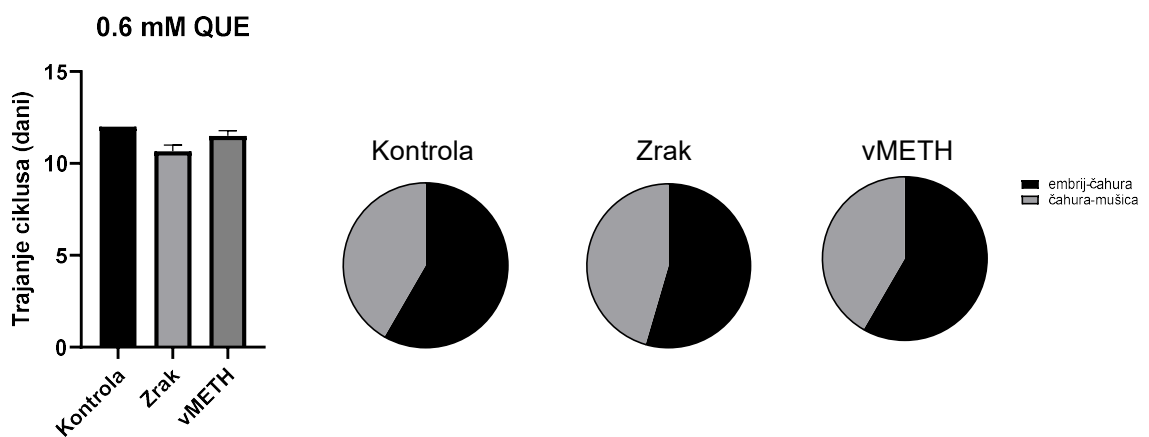
Slika 12. METH i QUE nemaju utjecaja na broj čahura i mušica F3 generacije. Kumulativni prikaz broja čahura i mušica 3. generacije. 3 mužjaka i 3 ženke 2. generacije iz svake skupine su

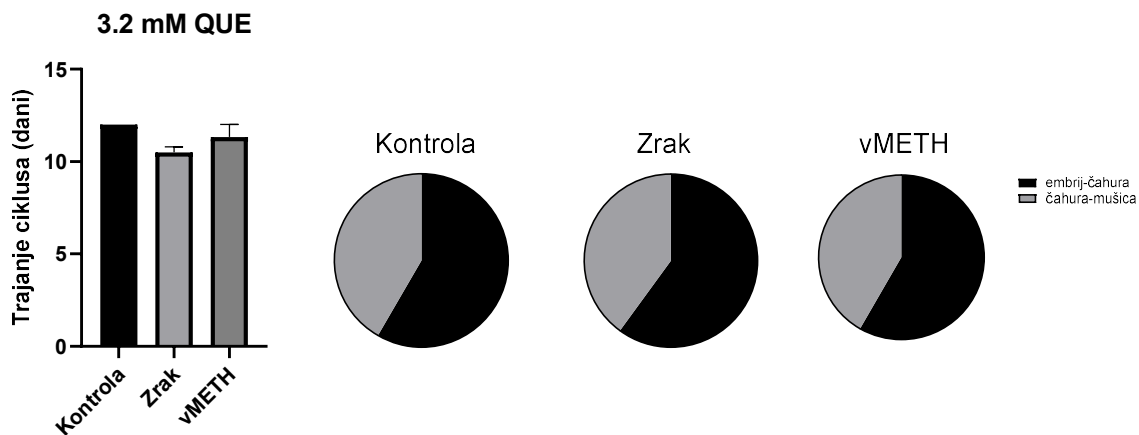
stavljani na parenje na hranu bez dodatka QUE. Pojavom 1. čahure i 1. mušice započeto je njihovo prebrojavanje. Čahure su prebrojavane svaki dan tijekom 8 dana, a mušice tijekom 10 dana. Na grafovima je prikazan kumulativni broj čahura (**A**, **B** i **C**) i mušica (**D**, **E** i **F**) s obzirom na skupinu iz koje su potekle (skupine s obzirom na koncentraciju QUE u hrani).

A



B



C

Slika 13. Utjecaj METH-a i QUE na duljinu razvojnog ciklusa F3 generacije mušica. A) Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, **bez tretmana QUE**, po skupinama; KONTROLA (netretirane mušice), ZRAK (kontrola za eksperimentalnu manipulaciju) i vMETH (mužjaci izloženi vMETH-u) s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za opisane skupine, crno= od embrija do čahure, sivo= od čahure do mušice **B)** Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, s tretmanom **0.6 mM QUE**, s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za navedene skupine. **C)** Histogramski prikaz duljine razvojnog ciklusa mušica, s tretmanom **3.2 mM QUE**, s prikazima trajanja pojedinih stadija u obliku kružnih dijagrama za navedene skupine.

8. Životopis

Osobne informacije

Ime i prezime: Marta Medija
Datum rođenja: 28.06.2000.
e-mail: marta.medija8@gmail.com

Obrazovanje

2019. – danas Preddiplomski studij „Biotehnologija i istraživanje lijekova“
Sveučilište u Rijeci
2015. – 2019. Salezijanska klasična gimnazija,
Rijeka

Osobne vještine i kompetencije

- Izražene komunikacijske i prezentacijske vještine (posterI)
- Iskustvo u radu s ljudima
- Organizacijske vještine stečene organizacijom maturalne zabave

Jezične vještine

- MATERINSKI JEZIK: hrvatski
- Engleski: Slušanje C1 Čitanje C1 Govorna produkcija C1 Govorna interakcija C1 Pisanje C1

Digitalne vještine

- Vješto korištenje MS Office paketa
- Pretraživanje baza znanstvenih radova
- Rad u programima Avogadro, PyMOL, Chimera, VMD

Vozačka dozvola

- B

Radno iskustvo

- Stručna praksa u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Rijeka, na odsjeku za kontrolu hrane, predmeta opće uporabe, unapređenja prehrane i mikrobiologiju
- Ostali studentski poslovi | (administrativni poslovi u pisarnici grada Rijeke)

Volontiranje

- Volontiranje u sklopu projekata Udruge studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (NatuRIS, projekt student mentor, TETRAGON)
- Volontiranje u laboratoriju za genetiku ponašanja (kolovoz 2022. – danas)