

Povezanost redoks parametara kod selektiranih sojeva *Drosophila melanogaster* s visokom i niskom preferencijom za metamfetamin

Starčević, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:193:390057>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**

Repository / Repozitorij:



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



Sveučilište u Rijeci
Odjel za biotehnologiju
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Ivona Starčević

Povezanost redoks parametara kod selektiranih sojeva *Drosophila melanogaster* s visokom i niskom preferencijom za metamfetamin

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Sveučilište u Rijeci
Odjel za biotehnologiju
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Ivona Starčević

Povezanost redoks parametara kod selektiranih sojeva *Drosophila melanogaster* s visokom i niskom preferencijom za metamfetamin

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

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

Komentor: dr. sc. Ana Filošević Vujnović

University of Rijeka
Department of biotechnology
University graduate programme
„Drug research and development“

Ivona Starčević

Connection of redox parameters in selected strains *Drosophila melanogaster* with high and low preference for methamphetamine

Graduate thesis

Rijeka, 2023

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

Co-mentor: dr. sc. Ana Filošević Vujnović

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

Diplomski rad obranjen je dana 28.6.2023. pred povjerenstvom:

1. izv. prof. dr. sc. Jelena Ban
2. doc. dr. sc. Stribor Marković
3. izv. prof. dr. sc. Rozi Andrečić Waldowski

Diplomski rad sadrži 37 stranica, 8 slika i 26 literaturna navoda.

Zahvala

Dragoj mentorici i komentorici, hvala Vam za svaki savjet, ideju, podršku i na svemu što ste me naučile u vremenu provedenom s Vama.

Dragim roditeljima, bratu, baki i ostatku obitelji, hvala za безусловnu ljubav, strpljenje, utjehu, oslonac i motivaciju tijekom čitavog studija.

Dragom dečku i svim prijateljima, hvala za slušanje i razumijevanje, hvala što ste bili uz mene prilikom svakog pada i tjerali me da idem naprijed.

Sažetak

Metamfetamin (METH) je psihostimulans koji se široko zlouporabljuje diljem svijeta. Sve je veća prevalencija ovisnosti koja može potencijalno biti povezana kod potomaka čiji su roditelji bili ovisni što potomke čini rizičnom skupinom. METH u organizmu djeluje na morfološke i funkcionalne promjene neuralnih mreža – neuralnu plastičnost. Naš model za istraživanje neuralne plastičnosti je samoadministracija METH-a koju koristimo za provedbu umjetne selekcije kako bi istražili neurobiološku osnovu razlike u visokoj (HP) i niskoj (LP) preferenciji.

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je utvrditi hoće li preferencijalna samoadministracija METH-a pokazati promjene u redoks parametrima kod F1 generacije potomaka 22. i 28. generacije HP i LP soja, te hoće li ti redoks parametri biti stabilni kod F2 i F3 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP sojeva nakon prestanka selekcije.

Dobiveni rezultati prikazuju da mjerenjem koncentracije vodikovog peroksida, naprednog produkta glikacije i specifične enzimске aktivnosti katalaze razine su bile niže u homogenatima cijelog tijela kod F1 potomaka selektiranih sojeva 22. i 28. generacije HP i LP soja u odnosu na kontrolnu skupinu. Mjerenjem specifične enzimске aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) nisu opažene razlike između F1 potomaka eksperimentalnih skupina, razlike nije bilo niti u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod F2 i F3 potomaka 22. generacije HP i LP soja nema razlike u mjerenim redoks parametrima, osim u SOD specifičnoj enzimskoj aktivnosti, dok kod F2 i F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja se svi parametri mijenjaju osim SOD specifične enzimске aktivnosti.

U ovom eksperimentalnom radu je prikazano da konzumacija METH-a roditeljske generacije djeluje na promjenu mjerenih redoks parametara kod potomaka. Nestabilnost u 28. generaciji HP i LP soja ukazuje na potencijalne

epigenetske promjene. Kako one nisu uočene u 22. generaciji pretpostavka je da je preferencija 22. generacije posljedica obogaćenja genskih varijanti koje su rezultirale HP i LP fenotipom. Kako bi se ova pretpostavka istražila potrebno je provesti buduća istraživanja.

Ključne riječi: *Drosophila melanogaster*, redoks parametri, reaktivne kisikove vrste, metamfetamin, preferencija

Abstract

Metamphetamine (METH) is a psychostimulant that is widely abused around the world. There is an increasing prevalence of addiction that can potentially be associated with offspring whose parents were addicted, making the offspring a risk group. METH in the body affects the morphological and functional changes of neural networks – neural plasticity. Our model for studying neural plasticity is METH self-administration, which we use to implement artificial selection to investigate the neurobiological basis of the difference in high (HP) and low (LP) preference.

The aim of this experimental work was to determine whether preferential METH self-administration will show changes in the redox parameters of F1 filial generation of the 22nd and 28th generations of HP and LP strains, and whether these redox parameters will be stable in the F2 and F3 filial generation of the 22nd and 28th generations of HP and LP strains after the end of selection.

The obtained results show that by measuring the concentration of hydrogen peroxide, advanced glycation product and catalase specific enzyme activity, the levels were lower in the whole body homogenates of the F1 filial generation of the selected strains of the 22nd and the 28th generations of the HP and LP strains compared to the control group. By measuring the superoxide dismutase (SOD) specific enzyme activity, no differences were observed between the F1 filial generation of the experimental groups, nor was there a difference compared to the control group. In the F2 and F3 filial generations of the 22nd generation HP and LP strains, there is no difference in the measured redox parameters, except for SOD specific enzyme activity, while in the F2 and F3 filial generations of the 28th generation HP and LP strains, all parameters change except SOD specific enzyme activity.

In this experimental work, it was shown that METH consumption of the parental generation affects the change of measured redox parameters in the filial generations. Instability in the 28th generation HP and LP strains indicates potential epigenetic changes. Since they were not observed in the 22nd generation, the assumption is that the preference of the 22nd generation is due to the enrichment of gene variants that resulted in the HP and LP phenotype. In order to investigate this assumption, it is necessary to conduct future research.

Key words: *Drosophila melanogaster*, redox parameters, reactive oxygen species, metamphetamine, preference

Sadržaj

1. Uvod	1
1. 1. Reaktivne kisikove vrste i utjecaj na redoks status	1
1. 2. Biokemijski parametri koji definiraju redoks status	2
1. 3. Djelovanje metamfetamina i utjecaj na redoks status	3
1. 4. <i>Drosophila melanogaster</i> , model za istraživanje ovisnosti	5
1. 5. Umjetna selekcija <i>D. melanogaster</i> s visokom i niskom preferencijom za METH	7
2. Cilj rada	10
3. Materijali i metode	11
3. 1. Soj mušica	11
3. 2. Odabir mušica za biokemijske testove	11
3. 3. Priprema uzoraka	12
3. 4. Mjerenje koncentracije H ₂ O ₂	13
3. 5. Mjerenje fAGEs koncentracije	14
3. 6. Mjerenje CAT specifične enzimске aktivnosti	14
3. 7. Mjerenje SOD specifične enzimске aktivnosti	15
3. 8. Obrada podataka i statistička analiza	17
4. Rezultati	18
4. 1. Promjena redoks parametara ovisi o dužini selekcije, ali ne ovisi o preferenciji	18
4. 2. Stabilnost redoks parametara kod F2 i F3 potomaka nakon prestanka samoadministracije	20
5. Rasprava	25
6. Zaključak	30

7. Literatura	32
8. Životopis	36

1. Uvod

1. 1. Reaktivne kisikove vrste i utjecaj na redoks status

Kisik je nužan za normalnu funkciju eukariota. Njegova uloga u preživljavanju je povezana s njegovim visokim redoks potencijalom. Ima mogućnost lakog prihvaćanja elektrona od reduciranih supstrata. Različita tkiva imaju različite potrebe za kisikom ovisno o njihovim metaboličkim potrebama. Osim njegove korisnosti u organizmu, kisik može biti i toksičan. Toksičnost i kemijska aktivnost kisika ovisi o njegovoj elektronskoj konfiguraciji. Djelomično reducirani oblik kisika ima visoku razinu aktivnosti zbog slobodnog radikala koji je iznimno nestabilan jer mora ili prihvatiti, ili donirati elektrone. Postoje različiti oblici djelomično reduciranih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), uključujući superoksid ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($\cdot OH$) (1,2).

ROS su zajedno s reaktivnim dušikovim vrstama (RNS) proizvodi aerobnog metabolizma, a nastaju tijekom normalne fiziologije stanice te su važni u modulaciji staničnih fiziološki procesa (stanično preživljavanje, proliferacija, diferencijacija, apoptoza). Oksidativni stres je stanje u kojem je značajno narušena ravnoteža između proizvodnje ROS-a i njihove redukcije koju obavljaju endogeni antioksidativni sustavi. Prilikom takvog lokalnog ili sustavnog oksidativnog stresa, stanica povećava proizvodnju ROS i RNS zbog čega endogeni obrambeni mehanizmi antioksidansa postaju preopterećeni. Takav citotoksični proces ima potencijal oštećivanja proteina, DNA, lipida, te aktivaciju signalnih putova koji uzrokuju apoptozu stanice. Kako ne bi došlo do neželjenih posljedica važna je ravnoteža između oksidansa i antioksidansa koja se definira kao redoks status. Redoks status stanice je od iznimne važnosti za zdravo preživljavanje i funkciju stanice. Visoko je podijeljen unutar stanica i odražava različite stanične aktivnosti (1,2).

ROS tijekom normalne fiziologije se može proizvesti na više mjesta u stanici sisavaca. Najveću količinu ROS-a proizvode mitohondriji. Osim mitohondrija, ROS ima i druge izvore poput monoaminooksidaze (MAO) i NO sintaze (NOS) koji proizvode tolike količine ROS-a da sudjeluju u mnogo patofizioloških staničnih procesa (3).

Redoks homeostaza je posebno važna u mozgu jer je on metabolički aktivan organ koji pokazuje visoku potrošnju kisika i snažnu proizvodnju ROS-a. Mozak ima visoku koncentraciju polinezasićenih lipida sklonih oksidaciji, te ima niže razine antioksidativnih enzima. U fiziološkim koncentracijama ROS su uključeni u funkcionalne promjene neophodne za sinaptičku plastičnost i za normalnu kognitivnu funkciju. Pokazalo se da je ROS neophodan za oblik sinaptičke plastičnosti koji se naziva dugotrajno potenciranje (LTP, engl. long-term potentiation), učenje i pamćenje, te za prijenos signala u biokemijskim signalnim kaskadama za koje se vjeruje da su u osnovi LTP-a i formiranja pamćenja (2,4).

1. 2. Biokemijski parametri koji definiraju redoks status

H_2O_2 je primarni ne-radikalni oblik ROS-a u mozgu koji se lako pretvara u oblik slobodnog radikala. Potencijalno može generirati hidroksil radikal ($\cdot OH$) ili se može dijeliti na H_2O i O_2 pomoću katalaze (CAT), glutation peroksidaze i drugih peroksidaza. Koncentracija H_2O_2 je važna u organizmu jer ROS mogu kemijski reagirati s biološkim molekulama što dovodi do promjena u staničnoj funkciji, te stanične smrti. Nakupljanje H_2O_2 i prekomjerna proizvodnja ROS-a povećavaju autoksidaciju dopamina u neuronskim stanicama. Dopaminergička autooksidacija ponovno potiče proizvodnju ROS-a što dovodi do nastanka oksidativnog stresa. Korištenje psihostimulansa može potaknuti prekomjernu proizvodnju H_2O_2 što doprinosi razvoju neurodegenerativnih bolesti. Također, H_2O_2 djeluje i na različite signalne puteve u mozgu, utječe

na modifikaciju proteina čime može mijenjati gensku ekspresiju te epigenetsku regulaciju (1,5,6).

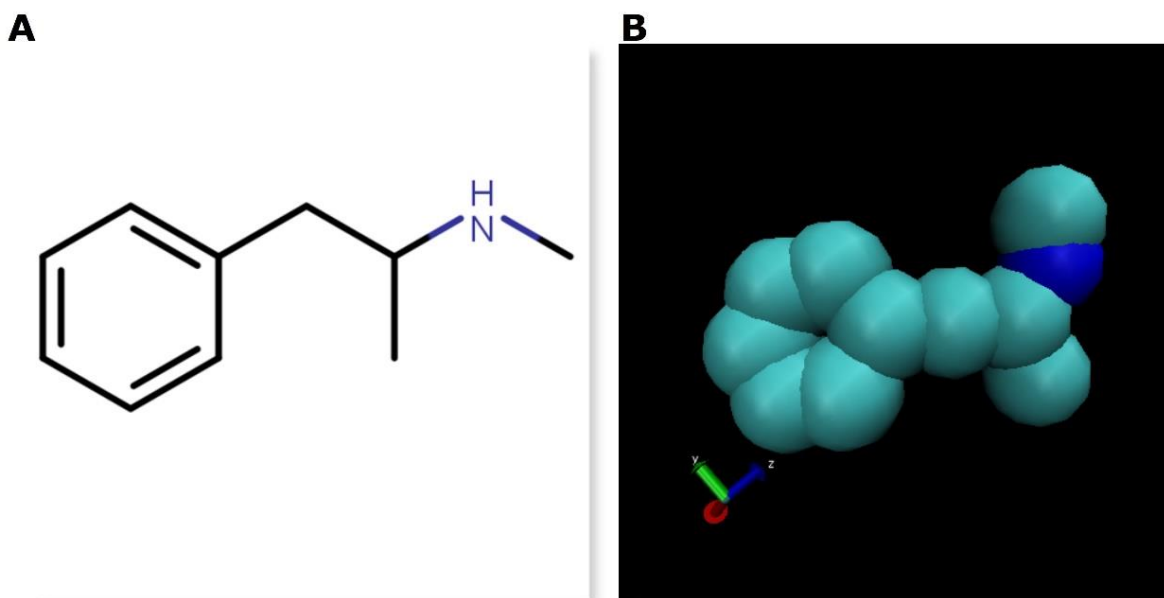
AGEs (engl. Advanced Glycation End products) su konačni produkti složenih višestupanjskih reakcija glikacije koje uključuju ireverzibilno, neenzimsko kovalentno vezanje reduktivnih šećera na bočne lance aminokiselina u proteinima. Slobodna amino skupina definira mjesto glikacije unutar proteinske strukture, a reakcija je nespecifična i neselektivna u odnosu na reduktivni šećer. AGEs mogu biti unutarstanični ili izvanstanični, a uglavnom su povezani s dugovječnim proteinima. Nadalje, povezani su s različitim patofiziološkim stanjima, od starenja i neurodegeneracije sve do oštećenja uzrokovanih antioksidativnom obranom. fAGEs je podgrupa AGEs molekula s auto-fluorescentnim svojstvima koji može biti korišten kao indikator oštećenja oksidativne obrane. Akumulacija fAGEs-a je posljedica oštećenja dopaminergičke signalizacije koja može nastati prilikom konzumacije METH-a (7).

Sustav superoksid dismutaza (SOD)/CAT ima važnu ulogu u detoksifikaciji ROS-a, te ima važnu ulogu u proizvodnji i razgradnji H_2O_2 . SOD, je oksidoreduktaza koja katalizira promjenu $O_2^{\cdot -}$ u H_2O_2 , nakon čega se stvaraju uvjeti za aktivnost CAT koja se nalazi u peroksisomima, a pronađena je i u citoplazmi i mitohondrijima. Uloga CAT je jako važna kada poraste razina H_2O_2 kako bi dovela stanje u organizmu u ravnotežu (5,8,9).

1. 3. Djelovanje metamfetamina i utjecaj na redoks status

Metamfetamin (METH) (Slika 1.) je psihostimulativni derivat amfetamina. Nakon kanabisa METH je najčešće zlouporabljena supstanca. Više od 35 milijuna ljudi širom svijeta koristi METH. Zbog svoje široke rasprostranjenosti predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, posebice zbog

rastuće stope smrtnosti povezane s predoziranjem. Ljudi obično koriste METH kako bi se lakše nosili s umorom, potaknuli stanje zadovoljstva, olakšali socijalnu interakciju, poboljšali libido, povećali produktivnost ili izgubili tjelesnu masu smanjenjem apetita (10,11).



Slika 1. Molekula METH-a. Molekula METH-a u: **A**, 2D prikazu. Molekula je napravljena u MarvinSketch programu. **B**, 3D prikazu. Molekula je napravljena u MarvinSketch programu, te je prikazana u VMD programu.

METH uzrokuje snažnu ovisnost i ima neurotoksična svojstva. Brzo ulazi i djeluje u središnjem živčanom sustavu. Ima dug poluživot, u rasponu od 10 do 12 sati. Prilikom konzumacije METH-a korisnici doživljavaju euforiju s istovremenom motoričkom stimulacijom, uzbuđenjem, povećanom energijom i budnošću. Ovisnost o METH-u dugoročno uzrokuje oštećenje neurona i ima snažne utjecaje na spoznaju, pamćenje i koncentraciju (12).

METH je lipofilna molekula koja može lako proći kroz krvno-moždanu barijeru i ući u mozak. U mozgu primarno djeluje na otpuštanje centralnih i perifernih neurotransmitera, poput dopamina (DA), serotonina (5-HT), norepinefrina i glutamata. Stupa u interakciju s raznim receptorima: dopaminski transporter (DAT), serotoninski transporter (SERT), noradrenalinški transporter (NET), i N-metil-D-aspartat (NMDA) receptori koji su integralni proteini stanične površine. Također, s vezikularnim monoaminskim transporterom-2 (VMAT-2) koji je ugrađen u vezikularne membrane. Djeluje i na smanjenje monoaminskog metabolizma inhibicijom monoamin oksidaze (MAO) (13).

Osim učinka modulacije neurotransmitera u sinapsama, dokazano je da METH regulira sinaptičku strukturu. METH značajno povećava sinaptičku gustoću neurona u ventralnom striatumu, točnije u *nucleus accumbens*-u. Povećava sinaptičku i postsinaptičku gustoću u hipokampusu. Razlika u dozama METH-a može različito regulirati sinaptičku plastičnost (14). Temeljno svojstvo neurona je njihova sposobnost modificiranja snage i učinkovitosti sinaptičkog prijenosa kroz niz različitih mehanizama ovisnih o aktivnosti koji se nazivaju sinaptička plastičnost (15). Međutim, morfološki dokazi sinaptičke plastičnosti i specifični mehanizmi povezani s različitim dozama METH-a na regulaciju sinaptičke strukture ostaju nepoznati (14).

1. 4. *Drosophila melanogaster*, model za istraživanje ovisnosti

Istraživanja utjecaja psihostimulansa su vršena na miševima, štakorima i primatima. Ona daju važne informacije o staničnom, razvojnom, fiziološkom i bihevioralnom učinku psihostimulansa, ali su oni manje prikladni za određivanje odnosa između genetske i fenotipske varijacije u individualnoj osjetljivosti (16).

D. melanogaster je model organizam od iznimne važnosti za istraživanja jer služi za proučavanje genetske i molekularne osnove odgovora ponašanja na administraciju droge. Prednost *Drosophila* je što ima kratki generacijski vijek, odličnu gensku podložnost, te širok raspon genetskih alata koji omogućuju preciznu prostorno-vremensku manipulaciju ekspresije gena, funkcije proteina i stanične aktivnosti. Velik postotak, oko 75%, ljudskih gena koji uzrokuju bolesti su očuvani u mušicama. Takva genetska homologija s ljudima i translacijski potencijal za biomedicinska istraživanja su istaknuli *D. melanogaster* kao model organizam za niz ljudskih bolesti, uključujući ovisnost. Geni su primarna odrednica varijacija u odgovorima ponašanja na ovisnost ili terapijske učinke psihostimulansa, te je pokazano u studijama da geni utječu na početak uzimanja droga i ovisnost. Ovisnosti su među najnasljednijim psihijatrijskim poremećajima. Unatoč brojnim dokazima iz studija, bilo je teško identificirati specifične gene ili genetske modifikacije koje pojedinca čine podložnijim tome da postane kompulzivan korisnik. Psihostimulansi povećavaju dopaminergičku signalizaciju kod mušica kao i kod ljudi, ali malo se zna o genima, molekulama i putevima koji utječu na bihevioralni odgovor na psihostimulanse. *Drosophila* je upravo zbog toga izvrstan model organizma za odgovore na različita pitanja, te pružanje vrijednih translacijskih informacija (17,18).

Proučavana su ponašanja *Drosophila* koja obuhvaćaju različite razine pobuđenja, od spavanja preko vizualne percepcije do psihostimulativnih odgovora. Razumijevanje neuronskih mehanizama koji određuju razinu pobuđenja u pozadini ponašanja ključno je za razumijevanje normalnih i abernatnih stanja. *Drosophila* se pokazala kao izvrstan model organizam za proučavanje fenotipa povezanih s ovisnošću gdje se gledao utjecaj psihostimulansa poput kokaina, amfetamina i metamfetamina. Razvijeni su bihevioralni eseji koji mjere konzumaciju hrane, lokomotornu aktivnost i

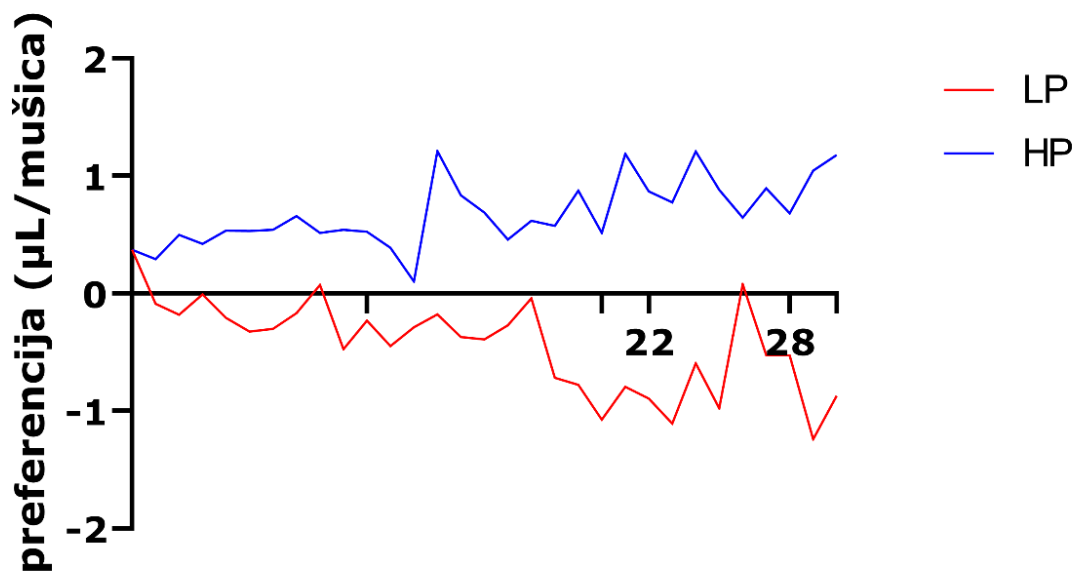
agresiju kod *Drosophila*. Mušice izložene psihostimulansima pokazuju promjene ovisne o dozi koje, kao i kod sisavaca, varira od hiperlokomocije do smrti. Pokazan je utjecaj i na društveno ponašanje, kako kod glodavaca, tako i kod mušica. Takvo ponašanje uključuje udvaranje, gdje izloženost psihostimulansima potiče seksualnu aktivnost (17).

Višestruke bihevioralne posljedice primjene METH-a povezane su s promjenama u izvanstaničnoj koncentraciji neurotransmitera DA, 5-HT i noradrenalina. METH potiče otpuštanje navedenih neurotransmitera iz presinaptičkih neurona (19). U prijašnjim istraživanjima ispitivane su promjene u dopaminergičkoj transmisiji prilikom konzumacije METH-a, te kako te promjene utječu na različite mjere ponašanja poput spavanja i lokomocije, te na složena ponašanja poput vizualne percepcije i udvaranja (20). METH izaziva lokomotornu senzitivaciju koja se ispituje u kontekstu razvoja ovisnosti, ali još sličnije ponašanje koje *Drosophila* ima u odnosu na ljude je samoadministracija koje se može mjeriti *FlyCafe* bihevioralnim esejom. Lokomotorna senzitivacija je ponašanje izazvano ponovljenom administracijom psihostimulansa, a posljedica je neuralne plastičnosti u mozgu. Ona dovodi do dugotrajnih promjena u neuromodulatornim mehanizmima koje traju dulje od vremena same manifestacije lokomotorne senzibilizacije, što sugerira da je lokomotorna senzibilizacija validan laboratorijski endofenotip (21).

1. 5. Umjetna selekcija *D. melanogaster* s visokom i niskom preferencijom za METH

U *FlyCafe* bihevioralnom esejmu mušice samovoljno biraju i administriraju tekuću hranu na bazi šećera sa ili bez dodatka METH-a, nakon čega se odredi njihova preferencija za METH. Pokazano je da mušice preferencijalno biraju hranu s METH-om (21). Preferencija mušica za METH određuje se prema razini

konzumacije hrane po mušici (Slika 2.), no uočene su individualne razlike u preferenciji – temeljem čega se mušice mogu klasificirati u dvije skupine – HP (visoka preferencija) i LP (niska preferencija).



Slika 2. Prosječna preferencija selektiranih mušica pojedine generacije. Preuzeto iz neobjavljenog rada Franke Rigo.

U prethodnim istraživanjima je promatrana samoadministracija kod miševa, štakora i primata čime su identificirani geni povezani sa samoadministracijom. Od interesa je bilo provjeriti što se događa na model organizmu *Drosophila*. Mušice su umjetno selektirane koristeći *FlyCafe* metodu s krajnjim ciljem identifikacije promjena genskih varijanti i genske aktivnosti koje utječu na preferenciju za METH. HP i LP sojevi su selektirani kroz 30 generacija (Slika 2.). Prosječna preferencija se mijenjala kroz generacije u odnosu na početnu generaciju. U svakoj generaciji su uvijek selektirane 3 mušice s najvišom i najnižom preferencijom koje su onda parene s djevicama divljeg tipa. HP i LP sojevi su visoko divergentni što je duža selekcija. U ovom eksperimentalnom radu interesiralo nas je ako uočene

promjene fenotipa koreliraju s promjenama redoks statusa u HP i LP sojevima.

2. Cilj rada

Izlaganje METH-u povećava razinu ROS-a, odnosno povećava razinu oksidativnog stresa što može uzrokovati neuroplastičnost. Redoks parametri: koncentracija H_2O_2 i fAGEs, te CAT i SOD specifična enzimska aktivnost mjereni su u homogenatima cijelog tijela mušica za potomke (F1, F2, F3) 22. i 28. generacije HP i LP soja.

Cilj ovog istraživačkog rada je opisati postoji li povezanost redoks parametara kod F1 generacije potomaka 22. i 28. generacije HP i LP sojeva *Drosophila melanogaster*. Hipoteza je da ako METH dovodi do promjene razine redoks parametara kod mušica, onda će HP soj imati povećane redoks parametre u usporedbi s LP sojem.

Drugi cilj ovog istraživačkog rada je provjera stabilnosti redoks parametara između F2 i F3 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP sojeva nakon prestanka selekcije. Hipoteza je da ako je selekcija mušica dovela do stabilnih promjena u redoks regulaciji onda neće biti promjena između F2 i F3 potomaka.

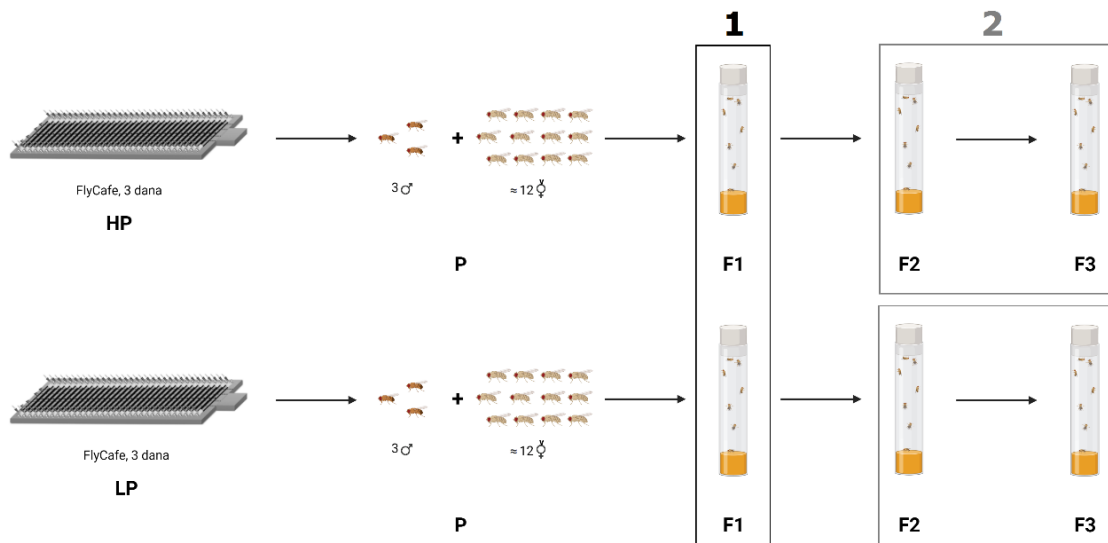
3. Materijali i metode

3. 1. Soj mušica

U eksperimentima su korišteni mužjaci 22. i 28. generacije HP i LP sojeva *Drosophila melanogaster*, te kontrolni mužjaci divljeg tipa *Drosophila melanogaster*, *Canton S* soja (početna generacija). Mušice su uzgajane u kultivacijskim vialicama na standardnom hranjivom mediju baziranom na kukuruznom brašnu i agru. Uzgajane su u inkubatoru na temperaturi od 25°C i 70% vlažnosti, te ciklusu svjetlost/tama (12:12).

3. 2. Odabir mušica za biokemijske testove

U eksperimentu su korišteni HP i LP sojevi mušica dobiveni umjetnom selekcijom korištenjem *FlyCafe*-a (Slika 3.). *FlyCafe* bihevioralni esej mjeri preferencijalnu konzumaciju gdje mušica može birati između dva izbora hrane. Hrana koja sadrži i ne sadrži METH. Konzumacija hrane se prati tri dana. Na osnovu rezultata preferencijalne konzumacije se odabiru 3 mužjaka s najvišom i 3 mužjaka s najnižom preferencijom za METH. Mužjaci se križaju s otprilike 12 djevoja divljeg tipa *Canton S* soja mušica. Kod F1 potomaka je napravljena usporedba redoks parametara između HP i LP soja nakon 22 i 28 generacija selekcije. Kod F2 i F3 potomaka je napravljena usporedba stabilnosti redoks parametara 22. i 28. generacije HP i LP sojeva nakon prestanka selekcije. Kontrolne mušice su uzgajane u kultivacijskim vialicama, na istoj vrsti hranjivog medija, u istim uvjetima kao i HP, te LP sojevi.



Slika 3. Odabir mušica za provedbu eksperimenta. Selekcija mužjaka iz *FlyCafe* monitora koji su pareni s djevicama. Dobivanje potomaka 22. i 28. generacije HP i LP sojeva za provedbu eksperimenta. P-roditeljska generacija (engl. parental generation); F-potomci (engl. filial generation). 1-prvi cilj, usporedba redoks parametara između HP i LP sojeva; 2-drugi cilj, usporedba stabilnosti redoks parametara nakon prestanka selekcije.

3. 3. Priprema uzoraka

Prilikom provođenja eksperimenta, mušice su anestetizirane pomoću ugljikovog dioksida, sakupljene i zaleđene na temperaturi od -20°C , 30 minuta. U prethodno izvagane Eppendorf tube (2 mL) je odvojeno po pet mužjaka u triplikatima. Eppendorf tube su ponovo izvagane kako bi se prilikom homogenizacije pomoću električnog blendera mogao dodati točan volumen ekstrakcijskog pufera. Korišten je PBS * 1 (Phosphate Buffered Saline) s Triton X-100 0,1% za staničnu permeabilizaciju. PBS * 1 (500 mL) je pripremljen koristeći 4,00 g 137 mM NaCl, 0,10 g 2,7 mM KCl, 0,72 g 10 mM Na_2HPO_4 , te 0,12 g 1,8 mM KH_2PO_4 . Volumen ekstrakcijskog pufera dodan je prema formuli:

$$\frac{300 \mu L}{5 mg} = \frac{x \mu L}{m mg}$$

(m označava masu mušica, a x označava volumen potrebnog ekstrakcijskog pufera).

Pripremljeni homogenati cijelog tijela su centrifugirani 40 minuta, na +4°C i 14 000 rpm. Odvojeni su supernatanti za mjerenje razine vodikovog peroksida (H₂O₂), fAGE (fluorescent Advanced Glycation End product) i specifične enzimske aktivnosti CAT i SOD.

3. 4. Mjerenje koncentracije H₂O₂

Za kvantifikaciju razine H₂O₂ korištena je DHE (dihidroetidij) otopina. DHE se oksidira drugim oksidansima kao što je H₂O₂ kako bi generirao nespecifični crveno fluorescentni etidij (E⁺). E⁺ se može neselektivno odrediti tehnikama baziranim na fluorescenciji (22). Za pripremu 10 mL 10 μM DHE otopine, 100 μL 1 mM DHE u DMSO (dimetil sulfoksid otopina) i 10 mL PBS * 1 su otpipetirani u 15 mL Falcon tubu omotanu aluminijskom folijom kako bi se spriječila fotooksidacija 10 μM DHE otopine. 200 μL DHE otopine je u mraku pipetirano u BD Falcon 96 Flat Bottom Black Polystyrene pločicu u triplikatu nakon čega je dodano 5 μL svakog proteinskog ekstrakta u jažice s DHE otopinom. Posljednji triplikat na pločici je sadržavao samo DHE otopinu kako bi se eliminirala autooksidacija. Pločica je prekrivena aluminijskom folijom i inkubirala se 30 minuta, na 37°C. Pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan Infinite 200 PRO je izmjeren intenzitet fluorescencije uzoraka pri valnoj duljini ekscitacije 480 nm i emisije 625 nm. Izmjerene vrijednosti su korištene prilikom izračuna koncentracije H₂O₂ pomoću kalibracijske krivulje. Kalibracijska krivulja je određena korištenjem DHE otopine, poznatih koncentracija H₂O₂ i korekcije RFU (relative fluorescence unit).

3. 5. Mjerenje fAGEs koncentracije

Za mjerenje fAGEs koncentracije je potrebno pripremiti 0,2 M Na₂HPO₄ pufer (pH 7,4). 1,42 g Na₂HPO₄ soli je otopljeno u 50 mL dH₂O, te je pomoću pH-metra namješten pH pufera na 7,4. 196 µL 0,2 M Na₂HPO₄ pufera (pH 7,4) i 4 µL svakog proteinskog ekstrakta je pipetirano u jažice BD Falcon 96 Flat Bottom Black Polystyrene pločicu u triplikatu. Posljednji triplikat je sadržavao 0,2 M Na₂HPO₄ pufer (pH 7,4) kako bi se uklonio utjecaj otapala. Intenzitet fluorescencije mjeren je pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan Infinite 200 PRO pri valnoj duljini ekscitacije 360 nm i emisije 440 nm. Kalibracijska krivulja napravljena je pomoću sintetiziranog fAGEs-BSA i kontrolnog BSA koji su nakon hidrotermalne sinteze razrijeđeni u koncentracijskom rasponu od 0-100 µg/mL pomoću 0,2 M Na₂HPO₄ pufera (pH 7,4). Fluorescencija je zabilježena pri valnoj duljini ekscitacije 360 nm i emisije 440 nm. Na temelju dobivenog relativnog intenziteta fluorescencije i promjene koncentracije fAGEs-BSA, konstruirana je kalibracijska krivulja korištena za kvantifikaciju fAGEs-a (7).

3. 6. Mjerenje CAT specifične enzimske aktivnosti

Za mjerenje enzimske aktivnosti 1 M H₂O₂ je pripremljen u Eppendorf tubi (2 mL) pipetiranjem 204 µL 9,79 M H₂O₂ i dodan je s PBS * 1 do 2 mL (1796 µL). Enzimska aktivnost odredila se pomoću Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis spektrofotometra, apsorpcijom svjetla na valnoj duljini $\lambda_{\max}=240$ nm (23). Za mjerenje se koristila kvarcna kiveta volumena 3 mL jer se mjeri apsorbanca u UV dijelu spektra za koje nisu pogodne plastične kivete. U kivetu se otpipetira 2,955 mL PBS * 1 pufera i 45 µL 1 M H₂O₂ nakon čega se izmjeri apsorbanca. Linearnost je određivana samo u području manjem od ABS 1, kako bi sa sigurnošću znali da uzorak u kiveti nije onečišćen ili da kiveta nije onečišćena. Nakon prvog mjerenja u kivetu se pipetira 10 µL proteinskog

ekstrakta, uzorak u kiveti se promiješa, te se nakon 5 minuta mjeri apsorbanca uzorka. Mjerenja su izvršena tri puta sa svakim uzorkom kako bi se smanjila mogućnost pogreške. CAT enzimsku aktivnost (mol supstrata kataliziran u jedinici vremena) određena je prema formuli:

$$\frac{\frac{\Delta A}{\Delta t} * V_{UK}}{V_E * \epsilon * d}$$

(ΔA označava razliku apsorbanca u $t=0$ min i $t=5$ min, Δt označava trajanje mjerenja, V_{UK} označava ukupni volumen u kiveti (3,01 mL), V_E označava volumen proteinskog ekstrakta (0,01 mL), ϵ označava molarni ekstincijski koeficijent H_2O_2 koji je određen eksperimentalno ($0,03528 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i d označava duljinu optičkog puta (1 cm)).

Za izračun specifične enzimске aktivnosti je potrebna masena koncentracija proteina (γ) u proteinskom ekstraktu. Kvantifikacija proteina proteinskih ekstrakta je određena pomoću BioDrop uređaja. Kod kvantifikacije proteina pipetira se 3 μL dH_2O kako bi uređaj imao referentnu vrijednost. Mjesto uzorkovanja se lagano obriše te se potom mjeri γ proteinskog ekstrakta. Pomoću postavki uređaja je moguće namjestiti da vrijednost γ bude izražena u mg/mL što kasnije olakšava izračun specifične enzimске aktivnosti koja se računa prema formuli:

$$\frac{\text{enzimska aktivnost } (\mu\text{mol}/\text{minmg})}{\gamma \text{ (mg/mL)}}$$

3. 7. Mjerenje SOD specifične enzimске aktivnosti

U Eppendorf tubi (2 mL) je pripremljena ishodna otopina 0,5557 M tetraetiletilendiamina (TEMED) pipetiranjem 83 μL TEMED i 917 μL PBS * 1, te ishodna otopina 17,1 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) otapanjem 5 mg kompleksona III (dinatrijeva sol EDTA, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \times 2\text{H}_2\text{O}$) u 1

mL PBS * 1. Za pripremu 10 mL SOD pufera (PBS * 1 pH 10 0,8 mM TEMED 0,08 mM EDTA) potrebno je pomiješati 14,44 μ L 0,5557 M TEMED, 47,7 μ L 17,1 mM EDTA i 10 mL PBS * 1. Ovako pripremljen pufer ima pH vrijednost \sim 7,4 zbog čega se pomoću 1M NaOH podešava pH vrijednost pufera na 10. Mjerenje se vrši u Thermo Fisher Scientific-Nunclon 48 Flat Bottom Transparent Polystyrene pločici pomoću Tecan Infinite 200 PRO čitača mikrotitarskih pločica. U jažice se pipetira 982 μ L SOD pufera u triplikatu, dok se u jažice gdje će biti standard pipetira 992 μ L SOD pufera u triplikatu kako bi ukupan volumen u svim jažicama bio isti (1 mL). Prethodno je pripremljena ishodna otopina 16,54 mM kvercetina (QUE) (0,5 mL) otapanjem 2,5 mg QUE u 500 μ L PBS * 1. Od ishodne otopine se priprema 1,65 mM QUE (1 mL) miješanjem 100 μ L 16,54 mM QUE i 900 μ L PBS * 1. Pomoću 1,65 mM QUE se određuje enzimski aktivnost SOD. U jažice se otpipetira 8 μ L 1,65 mM QUE i mjeri se apsorbancu na valnoj duljini $\lambda_{\max} = 406$ nm, te se doda 10 μ L proteinskog ekstrakta. Mjerenje se vrši 10 minuta kako bi se mogla odrediti enzimski aktivnost SOD. QUE u lužnatim uvjetima u prisustvu TEMED-a oksidira što dovodi do pada apsorbance na valnoj duljini 406 nm. SOD inhibira oksidaciju QUE u prisutnosti TEMED-a (24). Postotak inhibicije oksidacije QUE uz SOD je određen prema formuli:

$$\frac{\Delta A_{406} \text{ QUE} - \Delta A_{406} \text{ UZORAK}}{\Delta A_{406} \text{ QUE}} * 100\%$$

(ΔA_{406} QUE označava apsorbancu QUE standarda na valnoj duljini 406 nm od trenutka $t=0$ min do trenutka $t=10$ min, ΔA_{406} označava apsorbancu pojedinog uzorka na valnoj duljini 406 nm od trenutka $t=0$ min do trenutka $t=10$ min)

50% inhibicije je jednako 1 Unit of enzyme, a ono se određuje prema formuli:

$$\frac{1}{50} * \% \text{ inhibicije oksidacije QUE uz SOD}$$

Pomoću prethodno poznatih γ i proteinskih ekstrakta moguće je odrediti specifičnu enzimsku aktivnost SOD prema formuli:

$$\frac{1U \text{ SOD}}{\gamma} * F_R$$

(1U SOD označava 50% inhibicije oksidacije QUE uz SOD, γ označava masenu koncentraciju proteina proteinskog ekstrakta i F_R označava faktor razrjeđenja koji je u ovom slučaju jednak 100 obzirom da se računa prema formuli: V_{UK}/V_E , gdje je V_{UK} jednak 1 mL, a V_E je jednak 0,01 mL).

3. 8. Obrada podataka i statistička analiza

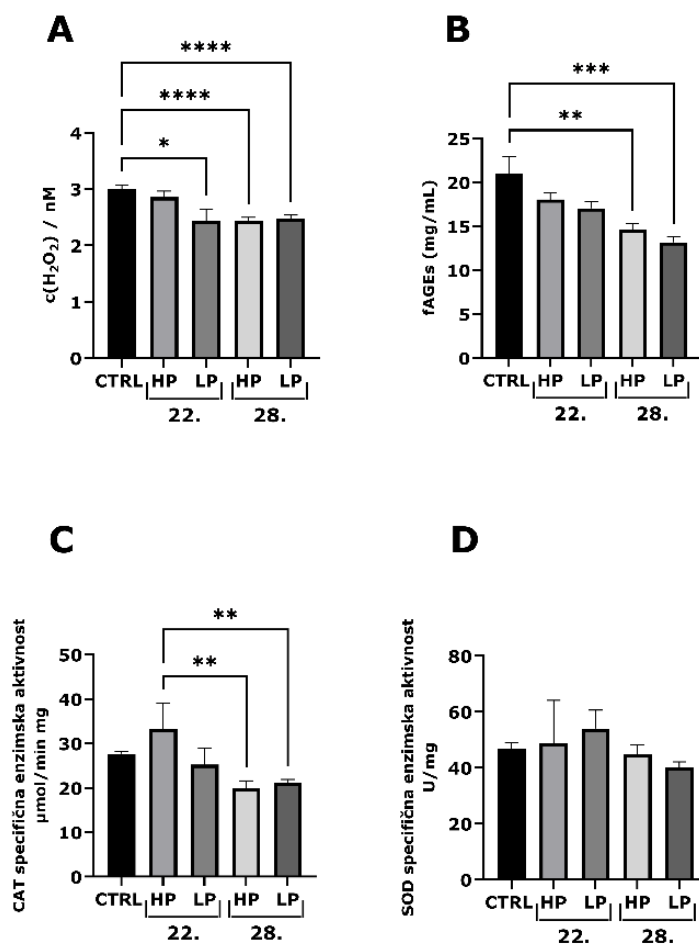
Obrada podataka napravljena je u MS Excel programu. Podaci su obrađeni pomoću kalibracijskih krivulja (koncentracija H_2O_2 , fAGEs) i formula (CAT i SOD specifična enzimska aktivnost) koje su prethodno navedene u tekstu. Nakon toga su podaci analizirani u programu GraphPad Prism 9.5.1. Statistička obrada podataka za povezanost redoks parametara kod F1 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP soja je napravljena pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) za usporedbu dvije ili više grupa i Tukey testom za višestruku usporedbu. Statistička obrada podataka za stabilnost redoks parametara kod F2 i F3 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP soja je napravljena pomoću dvosmjerne ANOVA-e (mješoviti model) i Tukey testom za višestruku usporedbu. Obradeni rezultati su prikazani u obliku histograma i linijskih grafova.

4. Rezultati

4. 1. Promjena redoks parametara ovisi o dužini selekcije, ali ne ovisi o preferenciji

Eksperiment je proveden kako bi se utvrdilo ako postoje razlike u redoks parametrima između HP i LP soja 22. i 28. generacije mušica, mjereni su parametri oksidativnog statusa (koncentracija H₂O₂, fAGEs koncentracija, CAT i SOD specifična enzimska aktivnost) u homogenatima cijelog tijela odraslih mužjaka. Hipoteza je da će mušice HP soja imati povišene redoks parametre u odnosu na mušice LP soja. Kako bi se utvrdilo dolazi li do kumulativnih promjena redoks parametara mjerenja su provedena na 22. i 28. generaciji umjetne selekcije za HP i LP fenotip.

HP i LP soj se ne razlikuju u niti jednom mjenom redoks parametru (Slika 4.). Kod F1 potomaka 28. generacije HP ($p < 1 \cdot 10^{-4}$) i LP ($p < 1 \cdot 10^{-4}$) soj (Slika 4. A) imaju značajno smanjenje koncentracije H₂O₂ u odnosu na kontrolnu skupinu (CTRL). Kod F1 potomaka 22. generacije dolazi do značajnog smanjenja koncentracije H₂O₂ samo kod LP ($p < 5 \cdot 10^{-2}$) soja (Slika 4. A) u odnosu na CTRL.



Slika 4. Redoks parametri ovise o generaciji, a ne o preferenciji. Histogramski prikaz usporedbe biokemijskih parametara u homogenatima mužjaka CTRL skupine, 22. i 28. generacije HP i LP sojeva: **A**, koncentracija H₂O₂. **B**, fAGEs koncentracija. **C**, CAT specifična enzimska aktivnost. **D**, SOD specifična enzimska aktivnost. Mjerenja su vršena u triplikatima (n=9). Jednosmjerna ANOVA s Tukey testom višestrukih usporedbi: * p<5*10⁻², ** p<1*10⁻², *** p<1*10⁻³, **** p<1*10⁻⁴.

fAGEs je povezan s koncentracijom H₂O₂ jer može biti korišten kao indikator oštećenja oksidativne obrane. Kod povećanog ROS-a dolazi do akumulacije fAGEs, no nije potvrđeno je li fAGEs uzrok ili posljedica. Kod F1 potomaka 28. generacije koncentracija fAGEs je smanjena u odnosu na CTRL

i to za HP ($p < 1 \cdot 10^{-2}$), i kod LP ($p < 1 \cdot 10^{-3}$) soj, a kod F1 potomaka 22. generacije nema značajnog smanjenja fAGEs koncentracije (Slika 4. B). HP i LP sojevi 22. i 28. generacije se međusobno značajno ne razlikuju u koncentraciji fAGEs.

CAT je jedan od antioksidativnih enzima koji se nalazi u peroksisomima, mitohondiju i citoplazmi, a uključen je u razgradnju H_2O_2 na H_2O i O_2 koristeći željezo ili mangan kao kofaktor. Osim CAT, ovakav oblik razgradnje vrši i tiolni antioksidativni mehanizam glutation. Obzirom na ranije uočeno smanjenje vodikovog peroksida kod F1 potomaka HP i LP soja 28. generacije, slično smanjenje specifične enzimске aktivnosti CAT opaženo je za 28. generaciju HP ($p < 1 \cdot 10^{-2}$) i LP ($p < 1 \cdot 10^{-2}$) soja u odnosu na 22. generaciju HP soja, međutim ne i u odnosu na CTRL (Slika 4. C).

Superoksid dismutaza (SOD) katalizira promjenu iznimno reaktivnog superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$) u manje reaktivan H_2O_2 i O_2 (5,8). Ne postoji statistički značajna razlika SOD specifične enzimске aktivnosti kod F1 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP soja u odnosu na CTRL (Slika 4. D).

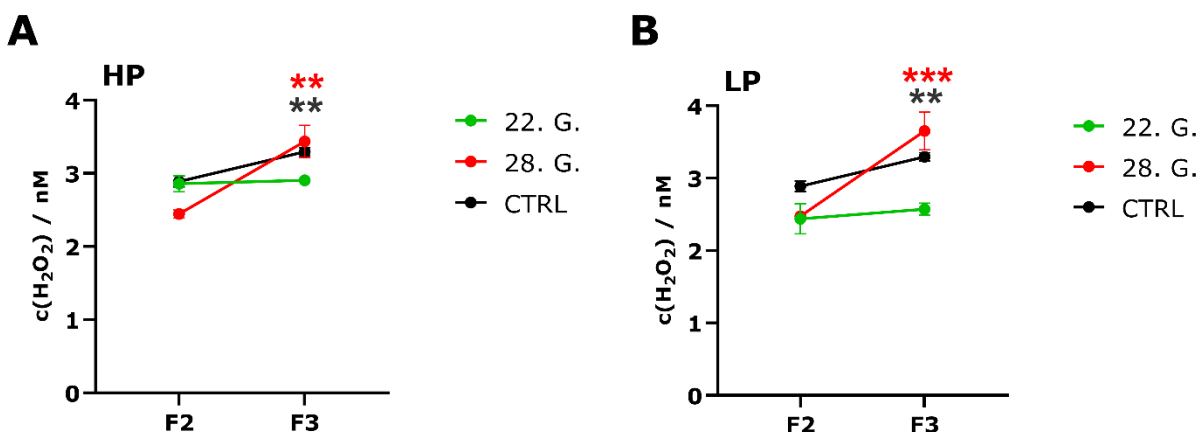
4. 2. Stabilnost redoks parametara kod F2 i F3 potomaka nakon prestanka samoadministracije

Redoks parametri su mjereni kod F2 i F3 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP soja nakon selekcije obzirom na preferencijalnu konzumaciju METH-a kako bi se utvrdilo jesu li promjene uočene na F1 potomcima temporalno stabilne, odnosno jesu li one trajne (genetske) ili su privremene (epigenetske) (Slika 4.). Redoks parametri su mjereni u homogenatima cijelog tijela odraslih mužjaka.

Slično kao i u prethodno prikazanim rezultatima kod F1 potomaka, ne postoji statistički značajna razlika između HP i LP soja, međutim kod oba soja

je došlo do promjene redoks parametara kod F3 potomaka u odnosu na F2 potomke. Razlika je bila prisutna u 28. generaciji, ali ne u 22. generaciji.

Kod F3 potomaka 28. generacije HP ($p < 1 \cdot 10^{-2}$) (Slika 5. A) i LP ($p < 1 \cdot 10^{-3}$) (Slika 5. B) soja dolazi do povećanja koncentracije H_2O_2 u odnosu na F2 potomke. Kod potomaka 22. generacije HP i LP nema statistički značajne razliku u koncentraciji H_2O_2 mjerene u supernatantima homogenata cijelih tijela mušica F2 i F3 potomaka (Slika 5.).

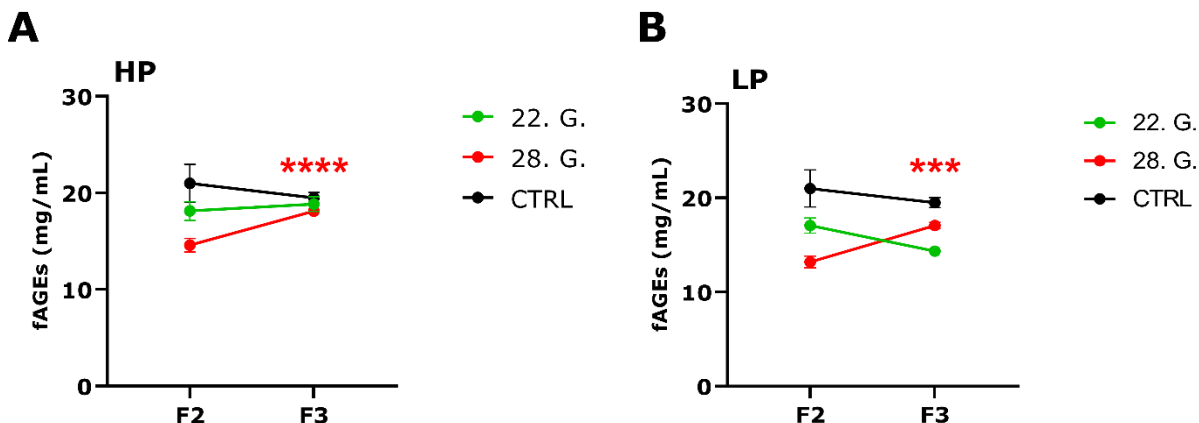


Slika 5. Povećanje koncentracije H_2O_2 kod F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja.

Koncentracija H_2O_2 određena je intenzitetom fluorescencije DHE otopine u homogenatima F2 i F3 potomaka mužjaka CTRL skupine, te 22. i 28. generacije HP i LP sojeva. Intenzitet fluorescencije očitao je pri valnoj duljini ekscitacije 480 nm i emisije 625 nm. Stabilnost koncentracije H_2O_2 kod potomaka: **A**, HP soja. **B**, LP soja. Mjerenja su vršena u triplikatima ($n=9$). Dvosmjerna ANOVA s Tukey testom višestrukih usporedbi: ** $p < 1 \cdot 10^{-2}$, *** $p < 1 \cdot 10^{-3}$.

U skladu s povećanjem koncentracije H_2O_2 , do sličnih je promjena došlo i kod mjerenja fAGEs koncentracije. F3 potomci 28. generacije HP ($p < 1 \cdot 10^{-4}$) (Slika 6. A) i LP ($p < 1 \cdot 10^{-3}$) (Slika 6. B) soja imaju statistički značajno povećanu koncentraciju fAGEs u odnosu na F2 potomke. Kod potomaka 22.

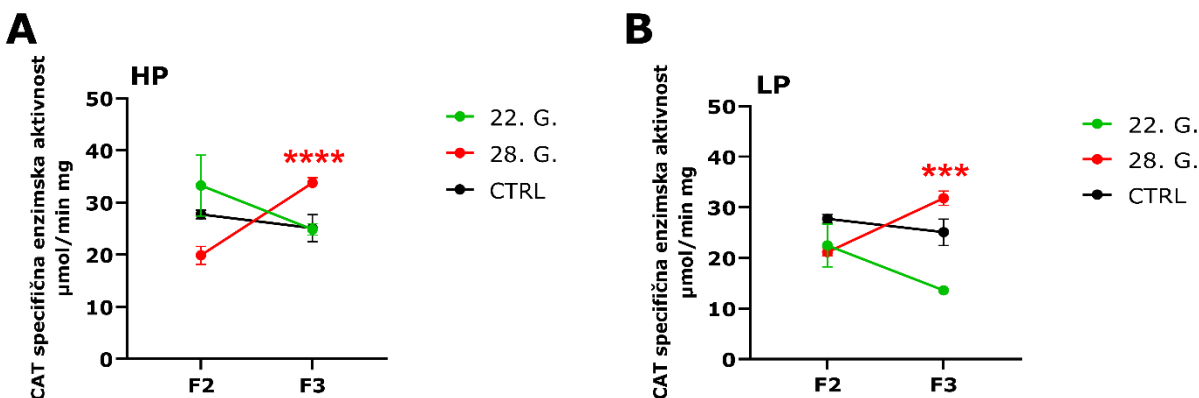
generacije nema razlike fAGEs koncentracije HP i LP soja između F2 i F3 potomaka (Slika 6).



Slika 6. Povećanje fAGEs koncentracije kod F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja.

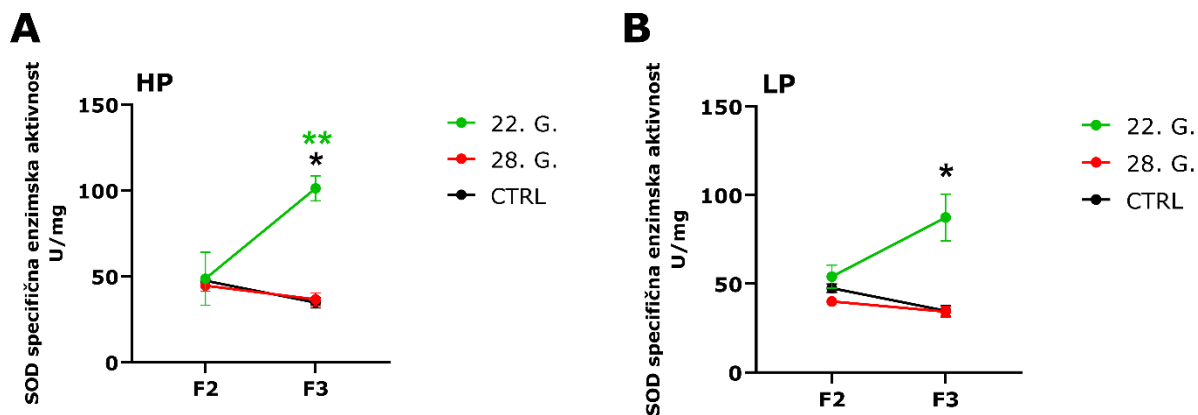
fAGEs koncentracija određena je u homogenatima F2 i F3 potomaka mužjaka CTRL skupine, te 22. i 28. generacije HP i LP soja. Intenzitet fluorescencije očitao je pri valnoj duljini ekscitacije 360 nm i emisije pri 440 nm. Stabilnost fAGEs koncentracije kod potomaka: **A**, HP soja. **B**, LP soja. Mjerenja su vršena u triplicatima (n=9). Dvosmjerna ANOVA s Tukey testom višestrukih usporedbi: *** $p < 1 \cdot 10^{-3}$, **** $p < 1 \cdot 10^{-4}$.

Obzirom na opaženo povećanje H_2O_2 pokazano je povećanje CAT specifične enzimске aktivnosti koja kompenzira povećanu produkciju H_2O_2 u homogenatima cijelih tijela. Kod F3 potomaka 28. generacije HP ($p < 1 \cdot 10^{-4}$) (Slika 7. A) i LP ($p < 1 \cdot 10^{-3}$) soja (Slika 7. B) CAT specifična enzimska aktivnost se statistički značajno povećava u odnosu na F2 potomke. Kod potomaka 22. generacije HP i LP soja gdje nije postojala razlika u koncentraciji H_2O_2 , nema statistički značajne razlike niti u CAT specifičnoj enzimskoj aktivnosti (Slika 7.)



Slika 7. Povećanje CAT specifične enzimske aktivnosti kod F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja. CAT specifična enzimska aktivnost u homogenatima F2 i F3 potomaka CTRL skupine, te 22. i 28. generacije HP i LP soja određivana je apsorbacijom svjetla na valnoj duljini 240 nm. Brzina raspada H_2O_2 određivana je pomoću pada koncentracije H_2O_2 u PBS * 1 puferu u vremenskom intervalu od 5 minuta. CAT specifična enzimska aktivnost kod potomaka: **A**, HP soja. **B**, LP soja. Mjerenja su vršena u triplikatima (n=9). Dvosmjerna ANOVA s Tukey testom višestrukih usporedbi: *** $p < 1 \cdot 10^{-3}$, **** $p < 1 \cdot 10^{-4}$.

SOD specifična enzimska aktivnost je jedina mjera koja je stabilna u potomcima 28. generacije, a razlikuje se u potomcima 22. generacije. Kod F3 potomaka 22. generacije HP soja ($p < 1 \cdot 10^{-2}$) (Slika 8. A) pojavljuje se statistički značajno povećana SOD specifične enzimske aktivnost u odnosu na F2 potomke. Kod potomaka 28. generacije HP i LP soja nema statistički značajne razlike u SOD specifičnoj enzimskoj aktivnosti (Slika 8.).



Slika 8. Povećanje SOD specifične enzimске aktivnosti kod F3 potomaka 22. generacije HP soja. SOD specifična enzimaska aktivnost u homogenatima F2 i F3 potomaka CTRL skupine, te 22. i 28. generacije HP i LP soja određivana je apsorpcijom svjetlosti na valnoj duljini 406 nm. Određena je kao postotak inhibicije oksidacije QUE u vremenskom intervalu od 10 min. SOD specifična enzimaska aktivnost kod potomaka: **A**, HP soja. **B**, LP soja. Mjerenja su vršena u triplikovima (n=9). Dvosmjerna ANOVA s Tukey testom višestrukih usporedbi: * $p < 5 \cdot 10^{-2}$, ** $p < 1 \cdot 10^{-2}$.

5. Rasprava

Povećani dokazi o važnosti redoks regulacije i ulozi koju redoks intermedijeri imaju u regulaciji neuralne plastičnosti povezane s psihostimulansima i ovisnosti potaknuli su nas da ispitamo prethodno mjerene redoks parametre u model organizmu *D. melanogaster*. Obzirom da je *Drosophila* uvelike unaprijedila znanja o genetskim mehanizmima koji su osnova fenotipa povezanih s ovisnošću (25), u ovom eksperimentalnom radu testirano je hoće li doći do razlike u redoks parametrima kod HP i LP soja mušica zbog njihove visoko divergentne preferencijalne konzumacije METH-a. Redoks parametri mjereni kod tri generacije potomaka (F1, F2, F3) nisu pokazali statistički značajnu razliku između HP i LP soja.

U ovom eksperimentalnom radu pokazala sam da postoje statistički značajne razlike koncentracije H₂O₂ kod F1 potomaka 28. generacije HP i LP soja, te 22. generacije samo LP soja. Obzirom da METH dovodi do oksidativnog stresa, očekivala sam povećanu aktivaciju antioksidativne obrane i popratnog nakupljanja H₂O₂ u HP u odnosu na LP soj u obje generacije, međutim suprotno očekivanju uočeno je smanjenje koncentracije H₂O₂ kod HP i LP soja 28. generacije što može biti posljedica toga da su redoks parametri mjereni u cijelim tijelima odraslih mužjaka i ti mužjaci nisu konzumirali METH. Povećanje koncentracije H₂O₂ univerzalni je odgovor na administraciju METH-a, stoga dobiveni rezultat potencijalno objašnjavam pojačanom antioksidativnom obranom koja u konačnici rezultira smanjenjem ROS-a.

Povećanje ROS-a dovodi do povećanja fAGEs koncentracije. Koncentracija fAGEs-a povezana je s neurodegenerativnim bolestima i starenjem obzirom da dolazi do štetnih učinaka na funkciju proteina (25). Kod F1 potomaka 28. generacije HP i LP soja dolazi do statistički značajnog smanjenja fAGEs koncentracije što kolerira sa smanjenjem vodikovog peroksida u tim sojevima. Međutim, kod F1 potomaka 22. generacije HP i LP

soja nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu, kao ni između HP i LP soja za što trenutno nemamo objašnjenje. Jedna od pretpostavki je da je povezano sa selektiranom generacijom (Slika 2.), s obzirom da je veća razlika HP i LP kod 28. generacije, nego kod 22. generacije.

CAT specifična enzimaska aktivnost mjerena je zbog toga što CAT katalizira promjenu H_2O_2 u H_2O i O_2 . Stoga bi promjena koncentracije H_2O_2 trebala biti posljedica promjene CAT specifične enzimске aktivnosti. Pretpostavka je djelomično potvrđena jer je CAT specifična enzimaska aktivnost kod F1 potomaka 28. generacije HP i LP soja smanjena, međutim jedino u odnosu na F1 potomke 22. generacije HP soja, a ne u odnosu na kontrolu. Tome je razlog što je CAT specifična enzimaska aktivnost u HP soju 22. generacije povećana, no ne i statistički u odnosu na kontrolnu skupinu. U prethodno provedenom istraživanju pokazano je da je CAT specifična enzimaska aktivnost u *ddc* neuronima važna za razvoj lokomotorne senzitivacije na kokain (25). Međutim, u mojem eksperimentu mjerena je CAT specifična enzimaska aktivnost u homogenatima cijelih mušica zbog čega nije moguće izvesti zaključke o važnosti anatomsko specifične CAT aktivnosti.

SOD specifična enzimaska aktivnost je važna jer katalizira promjenu $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 . SOD specifična enzimaska aktivnosti nije pokazala statistički značajnu promjenu niti kod F1 potomaka 22., niti 28. generacije HP i LP soja što je neočekivano obzirom na povezanost ostalih mjenjenih redoks parametara. U provedenom eksperimentu sam mjerila ukupnu SOD specifičnu enzimsku aktivnost, no postoje tri vrste SOD-a. Pokazano je da iako sve tri vrste SOD-a kataliziraju istu reakciju, oni su produkti različitih gena i različito su subcelularno lokalizirani. SOD1 je glavni unutarstanični SOD, uglavnom je lokaliziran u citoplazmi s manjim dijelom u intermembranskom prostoru mitohondrija, osim navedenog, pronađen je i u jezgri, lizosomima i peroksisomima. SOD2 je mitohondrijski enzim koji je lokaliziran u matriksu

mitohondrija. SOD2 se sintetizira u citoplazmi te se usmjerava u mitohondrij pomoću signalnog peptida. SOD3 je sekretorni izvanstanični SOD koji se nalazi u vaskularnom izvanstaničnom prostoru. Primarno mjesto SOD3 u tkivima je u izvanstaničnom matriksu i na površini stanica s manjim udjelom u plazmi i izvanstaničnim tekućinama (8). Jedna od mogućnosti zbog čega nije došlo do statistički značajne promjene je da je jedan od SOD-ova povećan, a drugi smanjen što rezultira nepostojanjem razlike. Druga mogućnost je smanjena koncentracija H₂O₂ zbog smanjene produkcije ROS-a. Potencijalni enzimski izvor ROS-a uključuje komponente mitohondrijskog transportnog lanca elektrona, ksantin oksidaze, citokrom p450 mooksigenaze, lipoksigenaze, dušikov oksid sinaze (NOS) i NADPH oksidaze (8). Postoji mogućnost i da je prilikom proizvodnje ROS-a došlo do nekakve promjene zbog čega je smanjena SOD specifična enzimska aktivnost.

Nakon prestanka selekcije, mjerila sam stabilnost redoks parametara kod F2 i F3 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP sojeva. Očekivala sam da prestankom selekcije dolazi do stabilnosti mjerenih parametara kod F2 i F3 potomaka što bi upućivalo na fenotipsku stabilnost. To je međutim pokazano samo kod potomaka 22. generacije HP i LP soja, osim za SOD specifičnu enzimsku aktivnost. Potomci 28. generacije HP i LP soja nisu stabilni jer postoji statistički značajna razlika kod F3 potomaka u odnosu na F2 potomke HP i LP soja. Jedna od pretpostavki za takav rezultat je da su F1 potomci bili izložene utjecaju METH-a jer je njihova roditeljska generacija konzumirala METH u *FlyCafe*-u, što se očitovalo u razini mjerenih redoks parametara kod F2 potomaka. Kako F2 potomci nisu bili izloženi METH-u, u njihovih potomaka (F3) promijenjen je metabolizam, a time i redoks status.

Kod F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja dolazi do porasta koncentracije H₂O₂ u odnosu na F2 potomke. U skladu sa statistički značajnim povećanjem koncentracije H₂O₂ kod F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja,

statistički se značajno povećava i fAGEs koncentracija jer dolazi do povećanih oksidativnih oštećenja. Povećana koncentracija H_2O_2 povećano aktivira CAT zbog čega je statistički značajno povećana CAT specifična enzimska aktivnost.

Ovakva nestabilnost F2 i F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja upućuje na epigenetske promjene. Epigenetika je u središnjem živčanom sustavu trenutno prihvaćena kao skup mitotičkih promjena u transkripciji gena i/ili fenotipskih promjena koje se događaju u nedostatku modifikacija same sekvence DNA. Unutar središnjeg živčanog sustava epigenetsko preoblikovanje može imati presudan utjecaj na funkciju neurona. Posljednjih godina pokazalo se da METH izaziva epigenetske modifikacije, koje su u osnovi trajnih promjena u ekspresiji gena i dugotrajnih reakcija ponašanja na ovaj psihostimulans (12). Interesantno, i trenutno neobjašnjivo je da u 22. generaciji potomaka nisam primijetila ovakvu nestabilnost, što bi značilo da epigenetski mehanizmi nisu aktivni ili da se ne očituju na mjerene redoks parametre.

Nisam očekivala da će doći do statistički značajne promjene prilikom mjerenja koncentracije H_2O_2 kod F3 potomaka CTRL u odnosu na F2 potomke. Obzirom da je CTRL prilikom mjerenja drugih biokemijskih parametara bila stabilna, promjena je moguća posljedica eksperimentalne pogreške. Koncentracija H_2O_2 se mjeri korištenjem DHE otopine prilikom čega može doći do fotooksidacije prilikom izloženosti svjetlu (26) što pretpostavljam da se dogodilo.

Umjetnom selekcijom HP i LP soja mušica kroz 30 generacija smo zapravo selektirali njihovo ponašanje, tj. preferencijalnu samoadministraciju METH-a. Selekcijom takvog ponašanja ideja je da zapravo dođemo do selekcije pojedinih gena odgovornih za takvu vrstu ponašanja. Umjetnom selekcijom se obogaćuju alele koje vode ka određenom ponašanju HP i LP soja mušica. Jedna od mogućnosti je da se pojavljuje polimorfizam jednog

nukleotida (SNP, engl. single nucleotide polymorphism) koji omogućava da mušice HP soja odgovaraju s visokom preferencijom za METH, a LP soja s niskom preferencijom za METH. Ako određeni SNP čini da mušica više ili manje konzumira METH onda se to prenosi generacijama, te će nakon nekoliko generacije sve mušice imati taj SNP. Geni utječu na ponašanje, te bi se u budućim istraživanjima trebalo ići k selekciji tih specifičnih gena. Druga mogućnost je da METH modificira DNA, odnosno postoji mogućnost da je došlo do pojave mutacije zbog čega dolazi do smanjene ili povećane samoadministracije METH-a. Obzirom na rezultate koji pokazuju da nema razlike između HP i LP sojeva u mjerenim redoks parametrima to bi značilo da oni nisu pod utjecajem genske regulacije koja definira visoku i nisku preferenciju za METH.

Buduća istraživanja i nova saznanja u ovom području znanosti vezanom za interakcije METH-a i molekularnih mehanizama mogla bi imati korist u poboljšanju liječenja ovisnosti koje su čitavo vrijeme u porastu i stvaraju značajne probleme. U prethodnim istraživanjima je pokazano da ROS djeluje na neuroplastičnost zbog čega sam očekivala da će doći do promjene u fenotipu HP i LP sojeva koje će biti vidljive mjerenim redoks parametrima. Ono što sam dobila je da je kod oba soja smanjena razina mjerenih redoks parametara. Obzirom da nije pokazana dobra povezanost mjerenih redoks parametara s HP i LP selekcijom, niti se pojavljuje stabilnost potomaka, možda ovi redoks parametri nisu dobar marker promjene.

6. Zaključak

Konzumacija METH-a dovodi do razvoja ovisnosti što u današnjem svijetu predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Razvoj ovisnosti povezan je sa staničnim oksidativnim stresom prilikom čega se može narušiti redoks ravnoteža stanice, no ROS ima i značajnu ulogu u normalnim staničnim funkcijama kao što je neuralna plastičnost koja predstavlja neurobiološku osnovu ovisnosti.

Mužjaci *D. melanogaster* koji su preferencijalno samoadministrirali METH su selektirani *FlyCafe* bihevioralnim esejom kroz 30 generacija. U eksperimentu su korišteni mužjaci potomci (F1, F2, F3) 22. i 28. generacije HP i LP soja. U supernatantima homogenata tijela potomaka selektiranih mužjaka su mjereni redoks parametri: koncentracija H_2O_2 , fAGEs koncentracija, te CAT i SOD specifična enzimska aktivnost. Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je utvrditi hoće li preferencijalna samoadministracija METH-a pokazati promjene u redoks parametrima kod F1 potomaka, te hoće li ti redoks parametri biti stabilni kod potomaka (F2, F3) 22. i 28. generacije HP i LP sojeva nakon prestanka selekcije.

Rezultati su pokazali da dolazi do smanjenja redoks parametara kod F1 potomaka 22. i 28. generacije HP i LP sojeva, no da je promjena izraženija u 28. generaciji HP i LP soja. Pokazana je stabilnost redoks parametara kod F2 i F3 potomaka 22. generacije HP i LP soja, dok kod F2 i F3 potomaka 28. generacije HP i LP soja ne dolazi do pojave stabilnosti što dovodi do zaključka da promjena i stabilnost redoks parametara ne ovise o preferenciji, već o generaciji. Takve razlike upućuju da se nešto mijenja u metabolizmu mušica, no to nije povezano s fenotipom preferencijalne konzumacije.

Dobiveni rezultati ukazuju na određene promjene u redoks parametrima selektiranih HP i LP sojeva, no ne može se sa sigurnošću reći dolazi li do pojave SNP-ova, mutacija ili epigenetskih modifikacija. Buduća istraživanja bi se

trebala usmjeriti da se promotre ovakve vrste promjena u mozgu koje će onda biti specifičnije i pomoću kojih će se moći lakše odrediti je li mjereni redoks parametri uistinu nisu dobar marker promjene.

7. Literatura

1. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2012.
2. McDonnell-Dowling K, Kelly JP. The Role of Oxidative Stress in Methamphetamine-induced Toxicity and Sources of Variation in the Design of Animal Studies. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 24. siječanj 2017. [citirano 11. svibanj 2023.];15(2):300. Dostupno na: [/pmc/articles/PMC5412700/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35412700/)
3. Massaad CA, Klann E. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. Sv. 14, *Antioxid. Redox Signal*.
4. Kishida KT, Klann E. Sources and Targets of Reactive Oxygen Species in Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid Redox Signal*. 21. studeni 2006.;0(0):061121054212009.
5. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Sv. 24, *Experimental Neurobiology*. Korean Society for Neurodegenerative Disease; 2015. str. 325–40.
6. Sundar V, Ramasamy T, Doke M, Samikkannu T. Psychostimulants influence oxidative stress and redox signatures: the role of DNA methylation. Sv. 27, *Redox Report*. Taylor and Francis Ltd.; 2022. str. 53–9.
7. Vujnović AF, Jović K, Pištan E, Waldowski RA. Influence of dopamine on fluorescent advanced glycation end products formation using *drosophila melanogaster*. *Biomolecules*. 01. ožujak 2021.;11(3):1–13.

8. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. Sv. 15, Antioxidants and Redox Signaling. 2011. str. 1583–606.
9. Ghelichkhani S, Saffari-Chaleshtori J, Ghaffari F, Nili-Ahmadabadi A. The Cytotoxic Effect of Thymoquinone Enhance on HepG2 Cell Line due to Induction of Fenton Reaction by Hydrogen Peroxide: An In Vitro and In Silico Study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention [Internet]. 01. svibanj 2023.;24(5):1809–15. Dostupno na: https://journal.waocp.org/article_90641.html
10. Al-Hakeim HK, Altufaili MF, Almulla AF, Moustafa SR, Maes M. Increased Lipid Peroxidation and Lowered Antioxidant Defenses Predict Methamphetamine Induced Psychosis. Cells. 01. studeni 2022.;11(22).
11. Edinoff AN, Kaufman SE, Green KM, Provenzano DA, Lawson J, Cornett EM, i ostali. Methamphetamine Use: A Narrative Review of Adverse Effects and Related Toxicities. Health Psychol Res. 2022.;10(3).
12. Limanaqi F, Gambardella S, Biagioni F, Busceti CL, Fornai F. Epigenetic effects induced by methamphetamine and methamphetamine-dependent oxidative stress. Sv. 2018, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2018.
13. Shrestha P, Katila N, Lee S, Seo JH, Jeong JH, Yook S. Methamphetamine induced neurotoxic diseases, molecular mechanism, and current treatment strategies. Sv. 154, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson s.r.l.; 2022.
14. Ding J, Huang J, Tang X, Shen L, Hu S, He J, i ostali. Low and high dose methamphetamine differentially regulate synaptic structural

- plasticity in cortex and hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 02. studeni 2022.;16.
15. Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. The impact of studying brain plasticity. Sv. 13, *Frontiers in Cellular Neuroscience.* Frontiers Media S.A.; 2019.
 16. Highfill CA, Baker BM, Stevens SD, Anholt RRH, Mackay TFC. Genetics of cocaine and methamphetamine consumption and preference in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 01. svibanj 2019.;15(5).
 17. Philyaw TJ, Rothenfluh A, Titos I. The Use of *Drosophila* to Understand Psychostimulant Responses. Sv. 10, *Biomedicines.* MDPI; 2022.
 18. Petrović M, Meštrović A, Waldowski RA, Vujnović AF. A network-based analysis detects cocaine-induced changes in social interactions in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 01. ožujak 2023.;18(3 March).
 19. Andretic R, Van Swinderen B, Greenspan RJ. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Current Biology.* 12. srpanj 2005.;15(13):1165–75.
 20. Andretic R, Van Swinderen B, Greenspan RJ. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Current Biology.* 12. srpanj 2005.;15(13):1165–75.
 21. Rigo F, Filošević A, Petrović M, Jović K, Andretić Waldowski R. Locomotor sensitization modulates voluntary self-administration of methamphetamine in *Drosophila melanogaster*. *Addiction Biology.* 01. svibanj 2021.;26(3).

22. Zhang Y, Dai M, Yuan Z. Methods for the detection of reactive oxygen species. Sv. 10, Analytical Methods. Royal Society of Chemistry; 2018. str. 4625–38.
23. Trawczyńska I. New method of determining kinetic parameters for decomposition of hydrogen peroxide by catalase. Catalysts. 01. ožujak 2020.;10(3).
24. Potapovitch AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase [Internet]. Dostupno na: <https://www.researchgate.net/publication/20595597>
25. Filošević Vujnović A, Rubinić M, Starčević I, Andretić Waldowski R. Influence of Redox and Dopamine Regulation in Cocaine-Induced Phenotypes Using Drosophila. Antioxidants. 01. travanj 2023.;12(4).
26. Zielonka J, Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. Sv. 48, Free Radical Biology and Medicine. 2010. str. 983–1001.

Ivona Starčević

 **Kućna** : Tihomira Čuline 5, 34310, Pleternica, Hrvatska

 **E-adresa**: starcevicivona@gmail.com  **Telefonski broj**: (+385) 997210008

Spol: Žensko **Datum rođenja**: 12/09/1999 **Državljanstvo**: hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[18/07/2018 – 07/09/2021]

Sveučilišna prvostupnica Biotehnologije i istraživanja lijekova (univ. bacc. biotechn. et pharm. inv.)

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju <https://biotech.uniri.hr/hr/>

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

Konačna ocjena: 4,166; 84,397%; Druga gornja klasa; CUM LAUDE

[10/07/2014 – 25/05/2018]

Prirodoslovno-matematička gimnazija

Gimnazija Požega <https://www.gimpoz.hr/hr/>

Adresa: Dr. Franje Tuđmana 4/A, 34000, Požega, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

[01/02/2023 – 16/02/2023]

Demonstratorica na kolegiju Biokemija

Odjel za biotehnologiju

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

Demonstratorica studentima druge godine sveučilišnog diplomskog studija "Biotehnologija i istraživanje lijekova" na kolegiju Biokemija tijekom izvođenja laboratorijskih vježbi. Također, pomagala sam u pripremi vježbi.

[10/05/2022 – 05/07/2022]

Laboratorij za genetiku ponašanja

Odjel za biotehnologiju

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

Laboratorijska praksa u Laboratoriju za genetiku ponašanja.

[05/07/2021 – 16/07/2021]

Odjel za hematološko biokemijsku dijagnostiku

Opća županijska bolnica Požega

Adresa: Osječka ulica 107, 34000, Požega, Hrvatska

Stručna laboratorijska praksa na Odjelu za hematološko biokemijsku dijagnostiku u Općoj županijskoj bolnici Požega.

POČASTI I NAGRADE

[15/11/2018]

Stipendija Grada Pleternice Ustanova koja je dodijelila priznanje/nagradu: Grad Pleternica

Stipendist Grada Pleternice tijekom 3 godine sveučilišnog preddiplomskog studija "Biotehnologija i istraživanje lijekova", te tijekom 2 godine sveučilišnog diplomskog studija "Istraživanje i razvoj lijekova".

CERTIFIKATI

[24/05/2023 – 25/06/2023]

Drug Commercialization

Završila sam Coursera tečaj o komercijalizaciji lijekova u organizaciji Sveučilišta Kalifornije u San Diegu, Skaggs škola farmacije i farmaceutskih znanosti (engl. The University of California San Diego, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences).

PUBLIKACIJE

[Influence of Redox and Dopamine Regulation in Cocaine-Induced Phenotypes Using *Drosophila*](#)

Koautorstvo znanstvenog rada Influence of Redox Parameters and Dopamine Regulation in Cocaine-Induced Phenotypes Using *Drosophila* objavljenog u travnju 2023. godine, u časopisu Antioxidants.

KONFERENCIJE I SEMINARI

[27/05/2023 – 28/05/2023] **SiSB '23 Symposium of Biology Students** Zagreb

Pasivni sudionik na simpoziju SiSB '23 Simpozij studenata bioloških usmjerenja u organizaciji Udruge studenata biologije (BIUS).

[30/06/2022 – 03/07/2022] **Inflammation and Proteinopathy in ALS/FTD Spectrum Disorder** Rijeka

Pasivni sudionik na simpoziju u organizaciji Međunarodnog centra za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju i ALS zajednice iz Kanade na temu Inflamacija i proteinopatija u ALS/FTD spektru poremećaja.

VOLONTIRANJE

[20/10/2018 – 28/06/2023] **Udruga studenata biotehnologije (USBRI)** Rijeka

Aktivni volonter Udruge studenata biotehnologije (USBRI) tijekom preddiplomskog i diplomskog studija u različitim projektima: Kuglice dobrih želja, Putujući znanstvenici, NatuRIs, student mentor (2019./2020., 2022./2023.), Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju (2022., 2023.).

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C1 ČITANJE C1 PISANJE B2

GOVORNA PRODUKCIJA B2 GOVORNA INTERAKCIJA B2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

Vješto korištenje MS Office paketa | Pretraživanje baza znanstvenih radova | poznavanje programa PyMOL, Avogadro, ChemAxon Marvin, VMD, GAMESS, MacMOLPit

KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

Komunikacijske i međuljudske vještine

Iznimno sam komunikativna, pristupačna, dobro organizirana te sposobna raditi u timu. Posjedujem iskustvo u radu s ljudima. Snalažljiva sam zbog čega mi prilagođavanje promjenama ne predstavlja problem.