

# Utjecaj vodenog ekstrakta *Crocus sativus* na bihevioralne fenotipove i redoks parametre *D. melanogaster* induciran e metamfetaminom

---

Cindrić, Natali

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:193:164124>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**

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

Biotehnologija u medicini

Natali Cindrić

**Utjecaj vodenog ekstrakta *Crocus sativus* na bihevioralne  
fenotipove i redoks parametre *D.melanogaster*  
inducirane metamfetaminom**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Natali Cindrić

**Utjecaj vodenog ekstrakta *Crocus sativus* na bihevioralne  
fenotipove i redoks parametre *D.melanogaster*  
inducirane metamfetaminom**

Diplomski rad

Rijeka, 2023.godina

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

Diplomski rad branjen je dana 26. listopada 2023. godine pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac - predsjednica povjerenstva
2. izv. prof. dr. sc. Duško Čakara - član povjerenstva
3. izv. prof. dr. sc. Rozi Andrečić Waldowski - član povjerenstva, mentor

Rad ima 41 stranicu, 14 slika i 28 literaturnih navoda.

## **Sažetak:**

Ovisnost o metamfetaminu (METH) okarakterizirana je brojnim promjenama na razini neurona kao što je nastanak i nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i fluorescentnih završnih produkata naprednih glikacijskih reakcija (fAGEs). *Drosophila melanogaster* se već desetljećima koristi u istraživanju ovisnosti radi sličnosti sa sisavcima u bihevioralnom, monoaminiskom i molekularnom odgovoru na psihostimulanse.

U ovome radu istražen je utjecaj vodenog ekstrakta *Crocus sativus* (šafрана) koji je mužjacima administriran kroz hranu u razdoblju od sedam dana prije prisilnog ili svojevoljnog izlaganja METH-u u bihevioralnim testovima lokomotorne senzitivacije i preferencijalne konzumacije, nakon kojih su provedeni biokemijski eseji kvantificiranja koncentracije vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i fAGEs-a u ekstraktima glave i tijela.

Potvrdili smo potencijal *C.sativus* da ublažava određene efekte koji nastaju kao posljedica konzumacije psihostimulansa. *C.sativus* djelovao je anksiolitički tako što je utjecao na smanjenje lokomotorne aktivnosti nakon drugog izlaganja *D.melanogaster* volatiliziranom metamfetaminu (vMETH). Mjerenjem koncentracije  $H_2O_2$ , nakon izlaganja vinskih mušica vMETH-u, primijećeno je antioksidativno djelovanje *C.sativus* čiji je predtretman spriječio njegovo nakupljanje u tijelima do kojega je došlo u kontrolnoj skupini vinskih mušica.

Mogućnosti vodenog ekstrakta *C.sativus* su brojne te se njegova svojstva trebaju dalje istražiti kako bi se u potpunosti iskoristio njegov potencijal. Govoreći o njegovom utjecaju na *D.melanogaster* induciranu metamfetaminom, naredna istraživanja trebaju se usmjeriti na različite starosne skupine vinskih mušica, ali i na prilagođavanje optimalne koncentracije ekstrakta *C.sativus* koja će imati najveći utjecaj na posljedice psihostimulansa.

**Ključne riječi:** metamfetamin, *Drosophila melanogaster*, *Crocus sativus*, reaktivne kisikove vrste (ROS), AGEs

## **Summary:**

Addiction to methamphetamines (METH) is characterized by numerous changes at the level of neurons such as the generation and accumulation of reactive oxygen species (ROS) and fluorescent end products of advanced glycation reactions (AGEs). *Drosophila melanogaster* has been used for decades in addiction research due to its similarity with mammals in the behavioral, monoaminic and molecular response to psychostimulants.

In this paper, we investigated the influence of the aqueous extract of *Crocus sativus* (saffron), which was administered to males through food during the seven day period before forced or voluntary exposure to METH in behavioral tests of locomotor sensitization and preferential consumption. After that, biochemical assays were performed to quantify the concentration of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and fAGEs in head and body extracts.

We have confirmed the potential of *C.sativus* to alleviate certain effects that occur as a result of the consumption of psychostimulants. *C.sativus* had an anxiolytic effect by reducing locomotor activity after a second exposure of *D.melanogaster* to volatilized methamphetamine (vMETH). By measuring the concentrations of  $H_2O_2$  after exposure of flies to vMETH, the antioxidant effect of *C.sativus* was observed, whose pretreatment prevented its accumulation in the bodies, which occurred in the control group of flies.

The possibilities of the water extract *C.sativus* are numerous and its properties need further research in order to fully exploit its potential. Speaking about its influence on *D.melanogaster* induced by methamphetamine, further research should focus on different age groups of flies, but also on adjusting the optimal concentrations of *C.sativus* extract that will have the greatest impact on the effects of psihostimulants.

**Key words:** metamphetamine, *Drosophila melanogaster*, *Crocus sativus*, reactive oxygen species (ROS), AGEs

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Metamfetamin (METH).....	1
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> kao model organizam za proučavanje ovisnosti .....	2
1.2.1. Bihevioralni odgovor na psihostimulanse .....	3
1.3. <i>Crocus sativus</i> .....	4
2. CILJ RADA .....	8
3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Uzgoj <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
3.2. Bihevioralni eseji .....	10
3.2.1. FlyBong .....	10
3.2.2. FlyCAFE .....	13
3.3. Biokemijski eseji.....	16
3.3.1. Mjerenje fAGEs-a .....	17
3.3.2. Mjerenje ROS-a .....	18
3.4. Statistička obrada rezultata.....	19
4. REZULTATI .....	20
4.1. Bihevioralni eseji .....	20
4.1.1. FlyBong .....	20
4.1.2. FlyCAFE .....	21
4.2. Biokemijski eseji.....	23
4.2.1. fAGEs .....	23
4.2.2. Vodikov peroksid.....	25
5. RASPRAVA .....	28
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. LITERATURA.....	35
8. ŽIVOTOPIS .....	40

## 1. UVOD

### 1.1. Metamfetamin (METH)

Psihostimulansi, među njima i metamfetamin (METH), djeluju neurotoksično na središnji živčani sustav (SŽS) te razvijaju ovisnost. Dugotrajna konzumacija METH-a ostavlja ozbiljne fizičke i psihičke posljedice kao što su povećani rizik za srčana oboljenja i infekcije HIV-om i hepatitisom. Zbog neurotoksičnog djelovanja, konzumenti češće obolijevaju od neurodegenerativnih bolesti, depresije, šizofrenije i psihoze. Neurotoksični efekti METH-a uključuju oštećenje u putu dopamina (DA) i serotonina, neuralnu apoptozu te aktivaciju glije i mikroglije koje uzrokuju neuroinflamaciju unutar mozga [1].

Povećanje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) jedan je od znakova starenja. Osim kod starenja, povećane koncentracije ROS-a uočene su i kod neurodegenerativnih bolesti. Također, tijekom ovisnosti o psihostimulansima dolazi do povećanja ROS-a što uzrokuje oštećenja proteina, lipida i DNA te u konačnici dolazi do neurotoksičnosti [2]. Izlaganje METH-u dovodi do povećanja razine DA u sinaptičkoj pukotini koji se zatim metabolizira auto-oksidacijom što dovodi do stvaranja ROS-a i dopaminskih kinona što dovodi do mitohondrijske disfunkcije [3].

Pokazalo se da je važan faktor stanične toksičnosti oksidativni stres. METH uzrokuje povećanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) kao što su hidroksilni radikali ( $\text{OH}^-$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i superoksidni anion ( $\text{O}_2^-$ ) tako što dovodi do povećane oksidacije DA. Zbog svoje lipidne topljivosti, prolazi kroz krvno moždanu barijeru te ulazi u dopaminergične terminale preko transportera dopamina (DAT) i pasivnom difuzijom s obzirom da je strukturom vrlo sličan dopaminu. Narušavanjem funkcije vezikularnog transportera monoamina 2 (VMAT2) dolazi do povećanja koncentracije DA u citosolu i sinaptičkoj pukotini. Nastali višak DA auto-oksidira na kinone i semi-kinone te nastaju velike količine  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^-$ .



Vodikov peroksid nastaje i kao nusprotukt metaboliziranja manje količine DA preko monoamin oksidaze (MAO) ili katehol-O-metiltransferaze (COMT). Vremenom, nakupine ROS-a uzrokuju niz reakcija kao što su peroksidacija lipida i aktivacija proteaza što dovodi do pokretanja puteva stanične smrti [1].

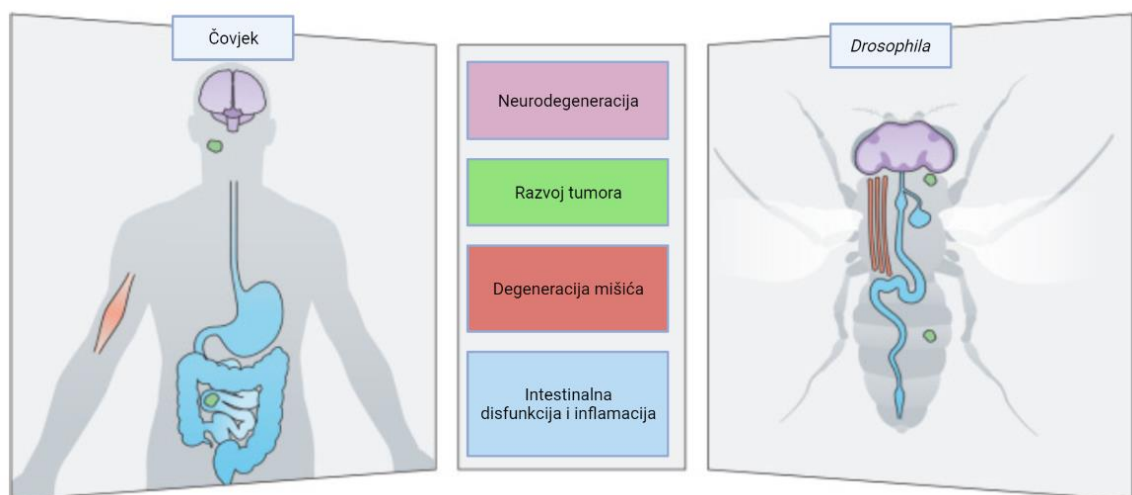
Advanced Glycation End (AGEs) produkti su glikacijskih reakcija i jedni od pokazatelja starenja, neurodegenerativnih bolesti te problema u antioksidativnom sustavu kao odgovor na oksidativni stres. Pokazalo se da prehrana može utjecati na količinu AGEs-a, a posebno prehrana bogata antioksidantima koja dokazano smanjuje njihovu koncentraciju. fAGE je podgrupa AGEs-a a svojstvima auto-fluorescencije te je zbog toga jednostavna za identifikaciju i kvantifikaciju u *D.melanogaster* koja je bila naš model organizam u eksperimentima [4].

Prema nekim saznanjima, do nakupljanja fAGEs-a dolazi zbog oštećenja u dopaminergičnoj signalizaciji koja je karakteristična i za brojna stanja kao što su neurodegeneracija i ovisnost [4]. DA regulira neuralnu plastičnost nakon administracije psihostimulansa što dovodi do promjena u ponašanju te do karakterističnog ovisničkog ponašanja [4]. U našim eksperimentima koncentracija fAGEs-a mjerena je nakon izlaganja METH-u.

## 1.2. *Drosophila melanogaster* kao model organizam za proučavanje ovisnosti

Životinjski modeli omogućavaju istraživanje različitih aspekata ovisnosti o drogama, od jednostavnog, akutnog odgovora na droge, do složenijih ponašanja kao što su potraga za drogom, samoadministracija i recidiv. U odnosu na istraživanja na glodavcima, istraživanja na *D.melanogaster* (vinska mušica) su jeftinija, potrebno je manje vremena za njihov uzgoj te je njihovo održavanje i provedba pokusa jednostavnija.

Iako sisavci imaju dva do tri puta više gena od mušica, čak 75% gena povezanih s bolestima u ljudima ima svoje srodne gene u *D.melanogaster*. Taj podatak joj omogućava da bude dobar model organizam za proučavanje funkcije velikog broja gena koji su uključeni u bolesti sisavaca [5]. Pokazalo se da su vinske mušice dobar model za proučavanje razvoja tumora, molekularnih mehanizama neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Huntingtonova i Parkinsonova bolest te za druge bolesti degeneracije mišića i intestinalne disfunkcije [6] (Slika 1). Zbog toga što sadrži transportere dopamina koji mogu vezati METH i kokain, *D.melanogaster* je dobar model organizam za proučavanje ovisnosti. [7]



**Slika 1. Modeliranje bolesti u vinskih mušicama.** U *D.melanogaster* je moguće proučavati razne ljudske bolesti i poremećaje kao što su neurodegeneracija, razvoj tumora, degeneracija mišića te intestinalna disfunkcija i inflamacija. [6]

### 1.2.1. Bihevioralni odgovor na psihostimulanse

Kao i kod glodavaca, u vinskih mušicama je primijećeno ponašanje koje se povezuje s konzumacijom psihostimulansa ovisno o koncentraciji. To ponašanje uključuje povećanu seksualnu aktivnost, hiperlokomociju,

nekontroliranu motoričku aktivnost i smrt. Esejima je moguće izmjeriti osjetljivost i senzitivaciju na psihostimulanse. Senzitivacija uključuje razvoj povećane osjetljivosti na efekte psihostimulansa nakon ponovljenog izlaganja, a uključuje neuroadaptaciju koja povećava podražaje u sustavu za nagrađivanje u mozgu [8]. Lokomotorna senzitivacija podrazumijeva povećanje lokomotornog odgovora nakon ponovljenog izlaganja psihostimulansima, dok je bihevioralna senzitivacija povećanje stereotipnog, motoričkog ponašanja. Jačina senzitivacije može ovisiti o starosti vinskih mušica, spolu, broju te vremenskom intervalu između administracija [9]. Samo-administracija i preferencijalna konzumacija psihostimulansa još je jedna od karakteristika *D.melanogaster*. "Capillary Feeder Assay" (CAFE) je najčešća metoda za mjerenje samo-administracije gdje vinske mušice imaju izbor između dvije vrste hrane, šećerna hrana ili ista ta hrana u kojoj se nalazi psihostimulans. Tom metodom moguće je izračunati individualnu preferenciju vinske mušice, kao i njihovu ukupnu preferenciju jedne vrste hrane u odnosu na drugu. Brojna istraživanja pokazala su preferenciju vinskih mušica u konzumaciji etanola umjesto šećerne hrane, a slično je i s METH-om kojeg vinske mušice preferencijalno konzumiraju u koncentraciji od 15 mg/mL [10].

## 1.2. *Crocus sativus*

*Crocus sativus* L. (šafan) je biljka iz porodice perunika (*Iridaceae*) kojih ima više od 85 vrsta. *C.sativus* je tradicionalna mediteranska biljka, a uzgaja se u različitim područjima kao što su Iran, Indija, Maroko, Španjolska, Grčka, Italija i druge države. Cvijet se sastoji od šest ljubičastih latica, tri zlatno-žuta prašnika i jednog crvenog tučka koji na vrhu ima tri razgranate stigme (filamenta) koji sušenjem daju začim (Slika 2). Začin *C.sativus* najskuplji je začim na svijetu s obzirom na to da je za proizvodnju njegovog jednog kilograma potrebno oko 230 000 cvjetova [11]. Tradicionalni je začim koji se koristi za kuhanje, bojanje i u

medicinske svrhe. *C.sativus* poboljšava cirkulaciju krvi te pomaže kod depresije i ima smirujuće efekte [12]. Prema modernim studijama, aktivne tvari *C.sativus* kao što su krocin, krocin i šafranal pokazuju svojstva antioksidacije, protuupalna svojstva, poboljšavaju funkciju mitohondrija te imaju potencijal i za korištenje u antidepresivima [12]. Svaka od navedenih aktivnih tvari dokazano djeluje na smanjenje oksidativnog stresa i neuroinflamacije [11].



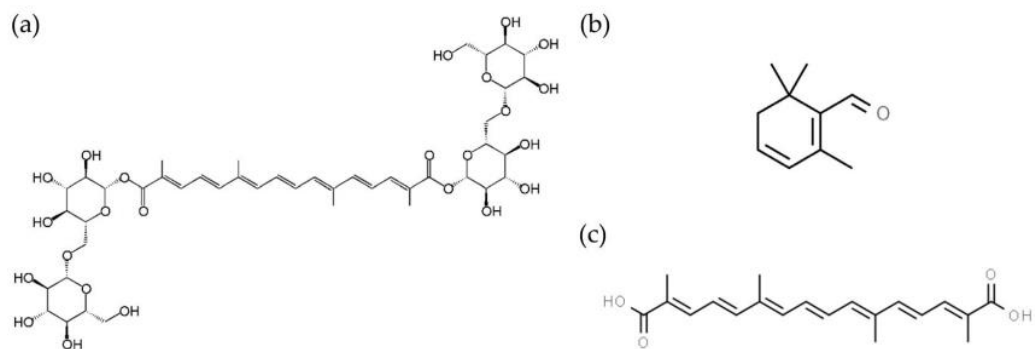
**Slika 2. Cvijet *C.sativus* i osušene stigme iz kojih se proizvodi začin. [13]**

Krocin je glikozilni ester krocetina koji nastaje esterifikacijom krocetina pomoću raznih glikozida (Slika 3A) te je odgovoran za karakterističnu crvenu boju začina. Često je predmet istraživanja zbog antioksidativnih svojstava koja štite stanice od oksidativnog stresa. Iako je karotenoid, za razliku od većine spojeva iz grupe karotenoida, krocin je topljiv u vodi. Većina njegovih svojstava gubi se nakon izlaganja svjetlosti, toplini i kisiku. Nakon oralne administracije, apsorpcija se odvija hidrolizacijom u intestinalnim epitelnim stanicama gdje nastaje deglikolizirani *trans*-krocetin koji se absorbira pasivnom difuzijom kroz intestinalnu barijeru [11].

Krocetin je hidrofobni karotenoid (Slika 3B) koji nije topljiv u vodi niti u većini organskih otapala, osim u piridinu i dimetilsulfoksidu. Isto kao

i krocin, ima malenu stabilnost, ali, za razliku od njega, ima brzu apsorpciju [11].

Šafranal je monoterpeniski aldehid (Slika 3C) koji je zaslužan za karakterističnu aromu *C.sativus*. Njegova bioaktivnost je manje poznata te se farmakološka svojstva *C.sativus* većinom pripisuju karotenoidima, krocinu i krocetinu [11].



**Slika 3. Strukturne formule aktivnih tvari *C.sativus*. A) Krocin, B) Krocetin, C) Šafranal [11]**

Utjecaj vodenog ekstrakta *C.sativus* prethodno je ispitivan i na fizičkim i psihičkim simptomima koji se javljaju tijekom odvikavanja od psihostimulansa. Istraživanje na miševima pokazalo je kako vodeni ekstrakt *C.sativus* smanjuje njihovu anksioznost te ponašanja slična depresiji uzrokovana odvikavanjem od etanola u sličnoj mjeri kao i administracija antidepresiva diazepama [14]. U istom istraživanju miševima je ubrizgan pentilentetrazol koji izaziva napadaje i konvulzije nakon konzumacije etanola te se pokazalo da vodeni ekstrakt *C.sativus* povećava granicu za napadaje te tako djeluje antiepileptički [14]. Slično tome, drugo istraživanje pokazalo je da vodeni ekstrakt smanjuje anksioznost i depresiju uzrokovanu odvikavanjem od morfija u štakora. S obzirom da je *C.sativus* doveo do povećanih razina serotonina, pretpostavlja se da je povećanje serotonina zaslužno za njegove anksiolitičke i antidepresivne učinke [15].

in vitro istraživanja pokazala su da vodeni ekstrakt *C.sativus* smanjuje intracelularnu koncentraciju ROS-a izazvanog stresom [13]. Osim toga, pokazalo se i da smanjuje DNA oštećenja uzrokovana ROS-om [13]. Druge studije su pokazale utjecaj vodenog ekstrakta na koncentraciju AGEs-a kod štakora s dijabetesom koji inače imaju povećane razine AGEs-a [16]. Slično, druga istraživanja na štakorima sa dijabetesom pokazala su značajno smanjenje AGEs-a nakon tretiranja sa krocinom, jednom od aktivnih tvari *C.sativusa* [17]. Krocin je smanjio i razine ROS-a u stanicama tretiranim akrilamidom koji uzrokuje neurotoksičnost [18]. Osim krocina, i krocetin je pokazao utjecaj na smanjeno stvaranje AGEs-a [19].

## 2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja je izmjeriti postoje li pozitivni učinci vodenog ekstrakta *C.sativus* i njegovih aktivnih tvari na bihevioralne i biokemijske posljedice konzumacije psihostimulansa u *D.melanogaster*. S obzirom na to da 75% gena povezanih s bolesti u ljudima ima srodne gene u *D.melanogaster* te postoje sličnosti u njihovom bihevioralnom odgovoru na psihostimulanse, otkrića u ovom istraživanju mogla bi se primijeniti na liječenje ovisnosti u ljudima.

Glavni cilj realizirat će se kroz prvi potcilj, promatranje utjecaja predtretmana *C.sativus* na bihevioralni odgovor *D.melanogaster*. Bihevioralni fenotipovi nakon izlaganja psihostimulansima istražiti će se preko FlyBong i FlyCAFE eseja. Vinske mušice će METH primiti putem aerosola u FlyBong eseju u kojem se METH volatilizira te upuhuje u cjevčice s vinskim mušicama i oralnim putem u FlyCAFE eseju gdje će moći birati između konzumacije tekuće šećerne hrane i tekuće šećerne hrane s METH-om. Bihevioralni odgovor uspoređivat će se između vinskih mušica koje su imale predtretman sa *C.sativus* i onih koje nisu.

Drugi potcilj istraživat će se nakon konzumacije METH-a putem FlyBong ili FlyCAFE eseja, gdje će se vinskim mušicama mjeriti koncentracije vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i fAGEs-a u glavama i tijelima. Uspoređujući dobivene koncentracije u vinskih mušica koje su bile na predtremanu sa *C.sativus* sa onima koje nisu, dobit će se rezultati koji upućuju na utjecaj vodenog ekstrakta *C.sativus* na biokemijske posljedice koje nastaju uslijed konzumacije psihostimulansa.

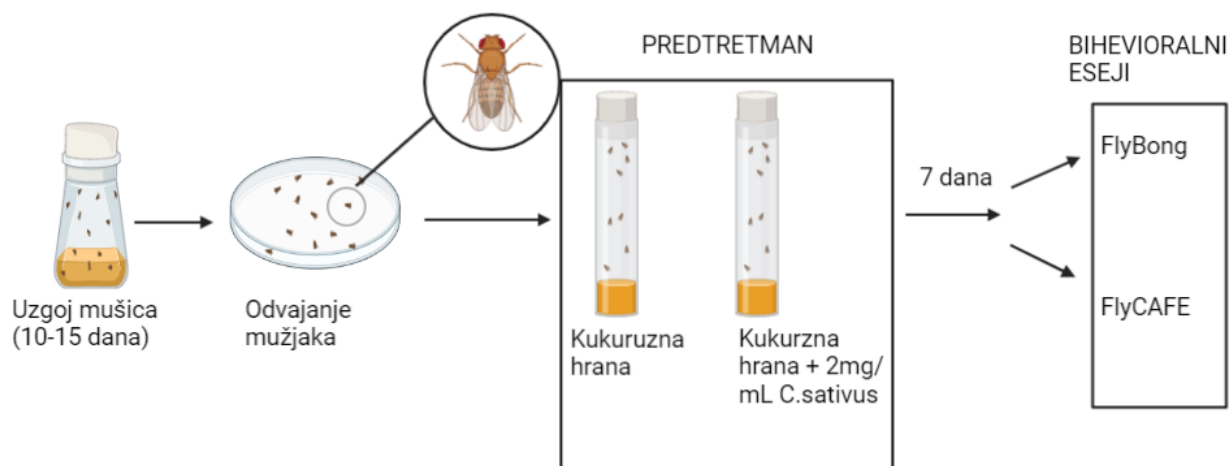
### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzgoj *D.melanogaster*

U eksperimentima su korišteni mužjaci divljeg tipa (*wt*) *D.melanogaster CantonS*. Vinske mušice su uzgajane u plastičnim bocama s kukuruznom hranom. Za pripremu jedne litre hrane potrebno je prokuhati 1 L vodovodne vode sa 79,3 g šećera, 8,5 g agara tipa II, 72 g kukuruznog brašna i 50 g suhog kvasca. Tijekom kuhanja potrebno je dodati 200 mL vode zbog isparavanja. Kako ne bi došlo do razvoja plijesni dodaje se 8 mL propionske kiseline i 15 mL 10 %-tne otopine nipagina u 95%-tnom etanolu. Boce s vinskim mušicama su smještene u inkubatoru pri konstantnoj temperaturi od 22°C i 60-75%-tnoj vlažnosti zraka uz izmjenu svijetla i tame u razdobljima od 12 sati.

U eksperimentima su korišteni mužjaci starosti 5-7 dana odvojeni korištenjem mikroskopa i anestezije ugljičnim dioksidom. Kontrolna skupina smještena je u tubice s kukuruznom hranom, a testna skupina u tubicu u kojoj se nalazila kukuruzna hrana s dodatkom vodenoga ekstrakta *Crocus sativus* u koncentraciji od 2 mg/mL. Nakon 4 dana obje skupine su prebačene na svježju hranu, a ukupno trajanje tretmana je sedam dana. (Slika 4).





**Slika 4. Shematski prikaz predtretmana vinskih mušica do bihevioralnih eksperimenata.**

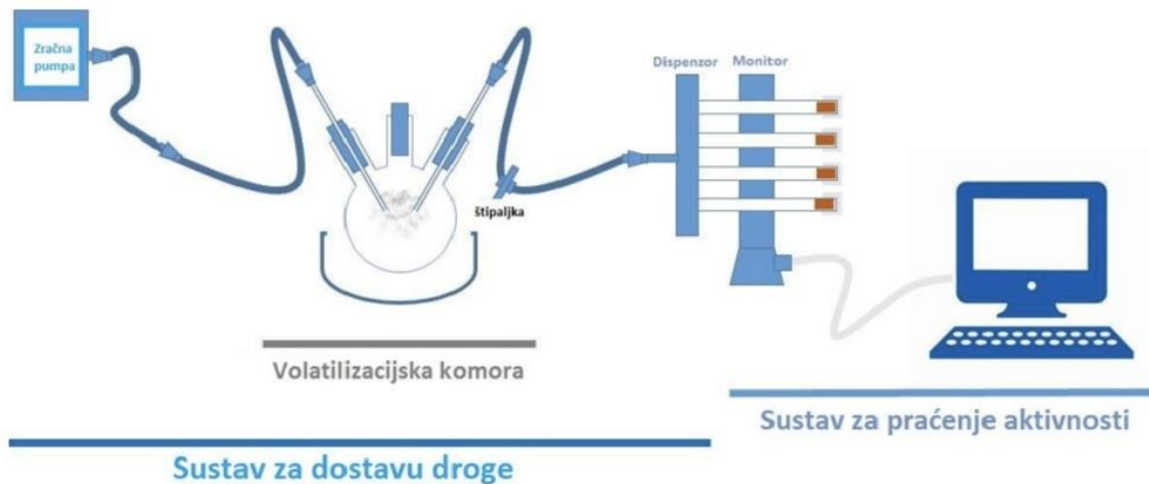
### 3.2. Bihevioralni eseji

Nakon predtretmana vinskih mušica, korišteni su bihevioralni eseji povezani s mjerenjem ponašanja izazvanih prisilnom administracijom psihostimulansa FlyBong metodom i preferencijalnom samo-administracijom FlyCAFE metodom. FlyBong platforma se sastoji od dijela koji služi za dostavu droge i dijela koji mjeri lokomotornu aktivnost. Ovom metodom se mjeri lokomotorna aktivnost inducirana akutnim i/ili ponovljenim administriranjem psihostimulansa. FlyCAFE metoda je razvijena kao kombinacija standardnog "two-choice" CAFE eseja i DAMS s 4 infracrvene zrake. CAFE esej (eng. Capillary Feeder Assay) je metoda koja je prvotno razvijena za kvantifikaciju konzumirane hrane u grupi vinskih mušica, no kasnijim modifikacijama omogućena je kvantifikacija preferencijalne konzumacije jednog izvora hrane u odnosu na drugi [10].

#### 3.2.1. FlyBong

Za dostavu droge koristi se volatilizacijska komora (trogrla tikvica u grijaćoj kapi) koja je s jedne strane spojena na zračnu pumpu, a s druge

strane na dispensor i monitor pomoću gumenih cjevčica (Slika 5). Za mjerenje lokomotorne aktivnosti koristi se DAM sustav (Drosophila Activity Monitoring).



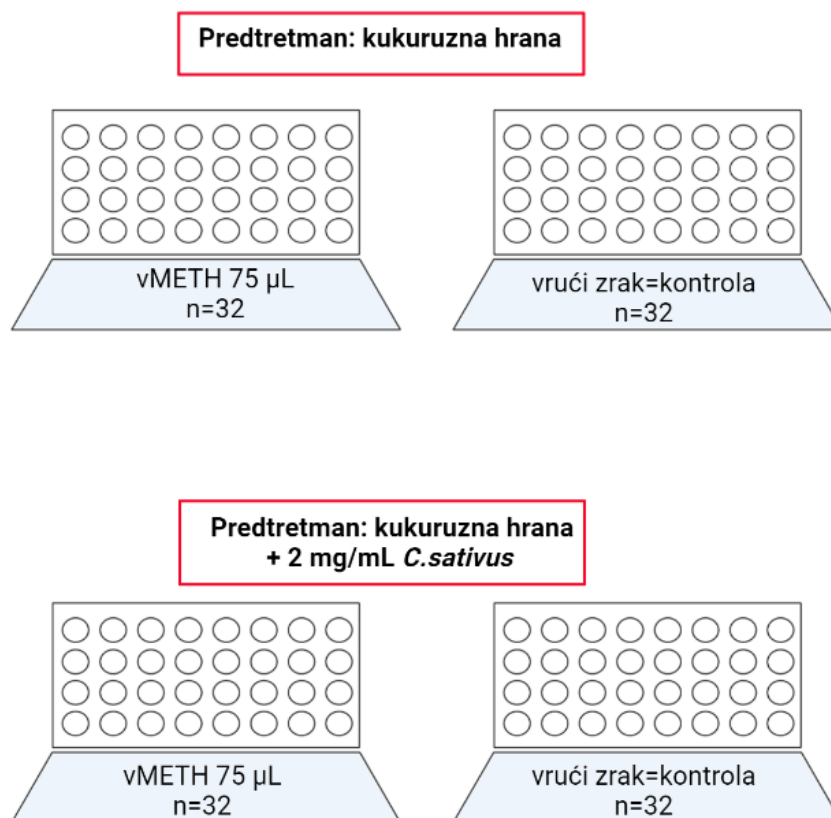
**Slika 5. FlyBong platforma za dostavu volatiliranog psihostimulansa [20]**

Središnji otvor trogrelne tikvice koristi se za pipetiranje 10 mg/mL METH-a u 95% etanolu kojeg se dodavalo u volumenu od 75  $\mu$ L. Otopina se dodaje 4-6 sati prije eksperimenta kako bi etanol ispario te se spriječili njegovi eventualni utjecaji. Zatvorena tikvica zagrijava se 8 minuta do 185°C. Za to vrijeme zatvoren je ventil na gumenoj cjevčici koja povezuje tikvicu i dispensor. Nakon 8 minuta, gasi se grijaća kapa, pali zračna pumpa i otvara ventil pri čemu se aerosol dostavlja u dispensor i na kraju do polikarbonatnih cjevčica s dvije rupice na kraju uz protok od 150L/h u trajanju jedne minute. Administracija volatiliranog METH-a (vMETH) se ponavlja 2 puta u danu (9h i 19h) uz kontrolne eksperimente u kojima se vinske mušice izlaže samo struji vrućeg zraka. Pokusi se izvode u inkubatoru pri temperaturi 24 °C i vlažnosti 75% u uvjetima izmjene svjetla i tame (12h:12h).

U svaki DAMS monitor moguće je smjestiti 32 cjevčice sa po jednom vinskom mušicom. Cjevčice s jedne strane sadrže kukuruznu hranu kako bi se spriječila dehidracija i izgladnjivanje te dvije male rupice koje

omogućavanju strujanje aerosola kroz sustav. Kroz sredinu cjevčice prolazi infracrvena zraka koja bilježi lokomotornu aktivnost kao broj prelazaka sredine tubice u periodu od 1 minute.

U eksperimentu su korištena 4 DAM monitora sa po 32 vinske mušice ( $n=128$ ). U prvom monitoru ( $n=32$ ) bile su vinske mušice koje su 7 dana bile na kukuruznoj hrani i primile su vMETH, dok su u drugom monitoru bile kontrolne vinske mušice koje su primile vrući zrak ( $n=32$ ). U trećem i četvrtom monitoru na isti način bile su vinske mušice koje su 7 dana bile na hrani sa 2 mg/mL vodenog ekstrakta *C.sativus* (vMETH ( $n=32$ ) i vrući zrak-kontrola ( $n=32$ )) (Slika 6). Pokus je ponovljen tri puta.



**Slika 6. Prikaz eksperimenata u kojima je korišten FlyBong esej.**

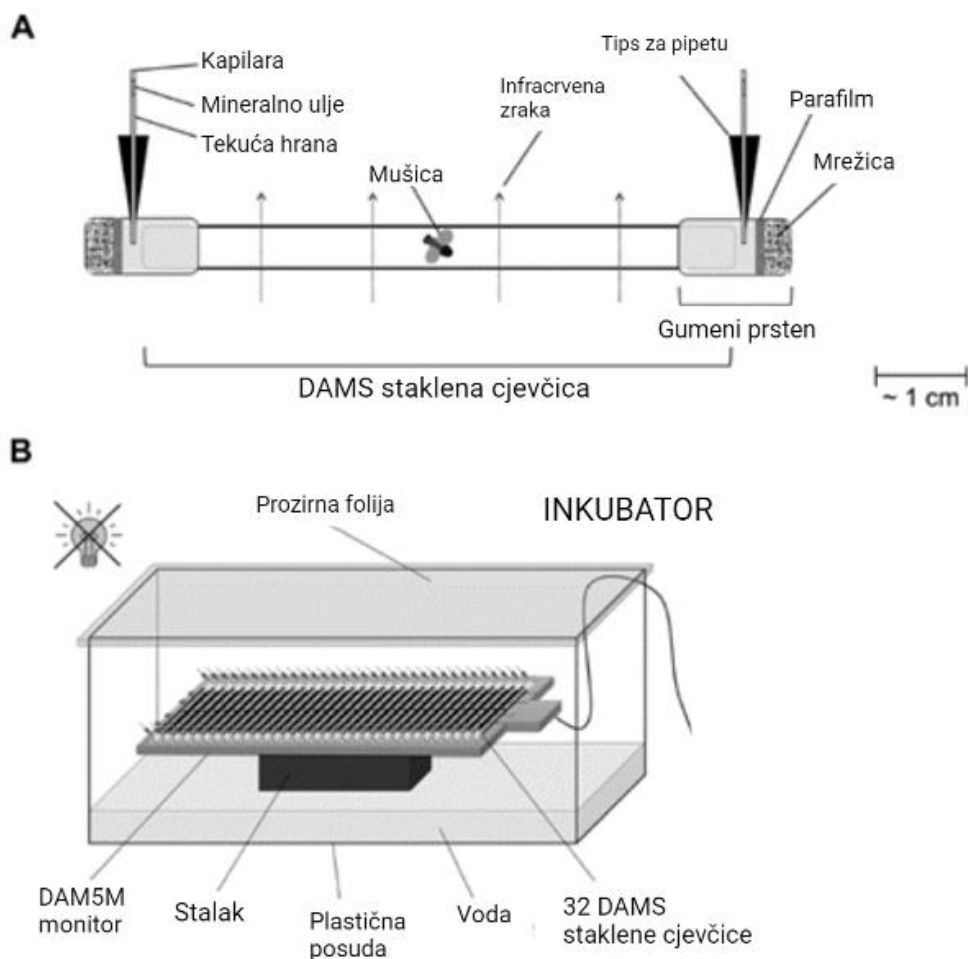
Upotrebom FlyBonga se analiziraju rezultati na populacijskoj i individualnoj razini. Odgovor na prvu dozu vMETH se naziva osjetljivost

(OS), dok se odgovor na ponovljenu dozu naziva lokomotorna senzitivacija (LS).

Pri analizi rezultata u obzir se uzimaju podaci o aktivnosti u razdoblju od 10 minuta prije administracije vMETH te 10 minuta nakon jedne (OS) i dvije (LS) doze. Uspoređujući srednju vrijednost aktivnosti 10 minuta prije administracije te 10 minuta nakon prve doze vMETH, dobivamo rezultate OS vinskih mušica na individualnoj razini ako se gleda srednja vrijednost aktivnosti jedne vinske mušice izražena kako postotak od ukupnog broja vinskih mušica u eksperimentu, te na populacijskoj razini ako se gleda srednja vrijednost aktivnosti sve 32 vinske mušice koja se onda izražava kao broj prelazaka u jednoj minuti.

### 3.2.2. FlyCAFE

U DAMS monitor s četiri infracrvene zrake se smjeste 32 vinske mušice po jedna u staklenu cjevčicu. Sa svake strane staklene cjevčice postavi se gumeni prsten koji je s vanjske strane zatvoren komadićem mrežice. Na vrhu gumenog prstena nalazi se rupica u koju se stavlja plastični nastavak za pipetu od 200  $\mu$ L. Nastavak je modificiran kako bi u njega smjestili staklenu kapilaru volumena 5  $\mu$ L i duljine 3 cm (Slika 7). Sa svake strane se postavi po jedna kapilara napunjena tekućom hranom ili tekućom hranom s dodatkom METH-a dok se monitor postavi na stalak u posudu s vodom koja je pokrivena s prozirnom folijom i postavi u inkubator pri temperaturi 24 °C i vlažnosti 75% u uvjetima konstantne tame.



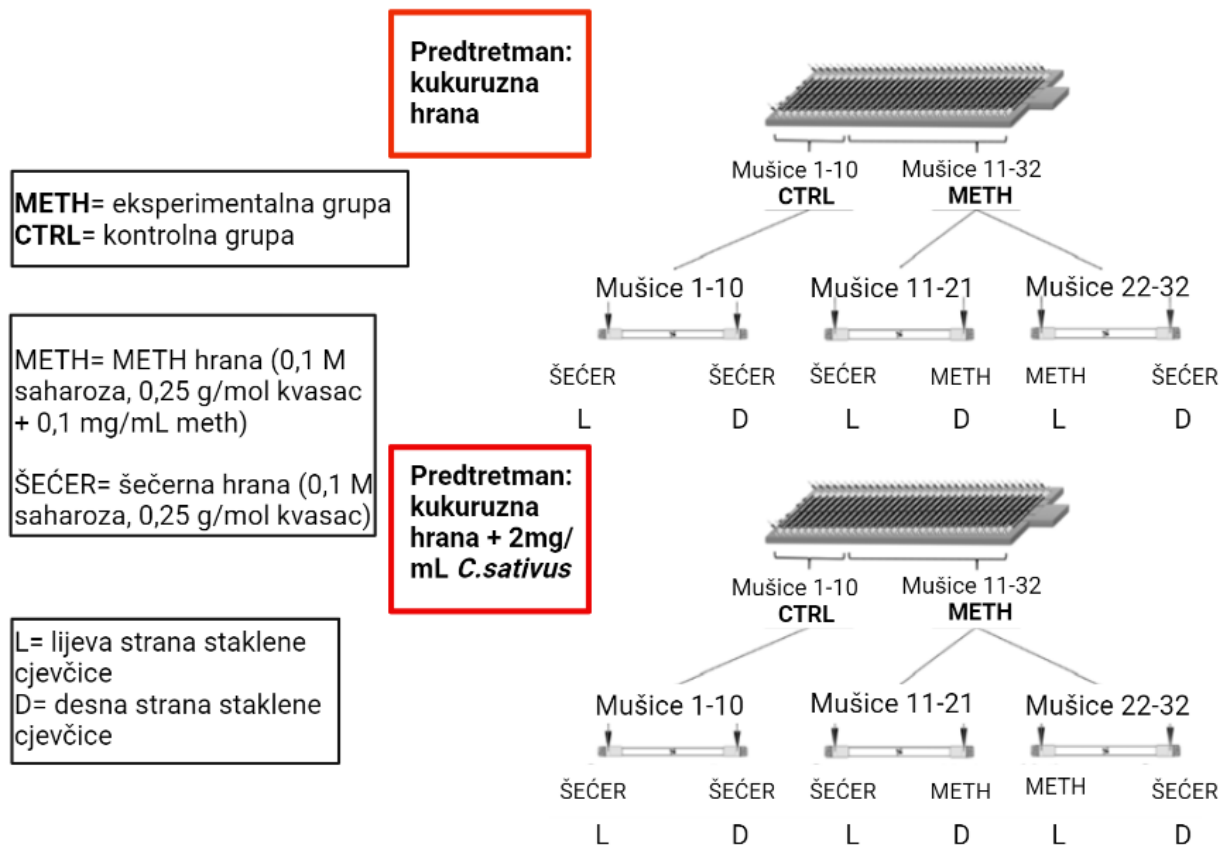
**Slika 7. FlyCAFE: metoda za mjerenje preferencijalne konzumacije hrane kod individualnih vinskih mušica.** **A)** Drosophila Activity Monitoring System (DAMS) staklena cjevčica s modificiranim krajevima za umetanje staklenih kapilara s tekućom hranom. **B)** FlyCAFE sustav sastavljen od DAM5M monitora s 32 staklene cjevčice u kojima su individualne vinske mušice, postavljen na stalak u plastičnoj posudi sa vodom [10].

Kapilare se prvo pune mineralnim uljem koje minimizira isparavanje hrane i tekuće hrane (0,1M saharoza i 0,25 g/mL otopina kvasca). Eksperimentalnim skupinama u hranu se dodaje i METH (0,1 mg/mL). Prije stavljanja kapilare u tips, pomoću ravnala izmjeri se visina stupca hrane u svakoj kapilari. Idući dan mjeri se količina preostale hrane te se

stavlja nova kapilara s hranom. Količina popijene hrane za svaku kapilaru se računa kao razlika početnoga volumena prvoga dana i preostalog volumena drugoga dana. Mjerenje se vrši tri dana za redom u isto vrijeme.

Za kontrolu evaporacije, sa monitorima se stavljaju kapilare bez vinskih mušica koje su napunjene tekućom hranom (tri kapilare) te hranom s dodatkom 0,1 mg/mL METH-a (tri kapilare). Nakon što se izmjeri količina hrane koja je isparila u evaporacijskim kontrolama, ta vrijednost se oduzima od svake izmjerene kapilare s vinskim mušicama kako bi se dobio stvarni volumen hrane koje su vinske mušice konzumirale. Na osnovu podataka o volumenu konzumirane hrane izračuna se 24 satna preferencija prema hrani s METH-om kao razlika volumena konzumirane hrane bez dodatka METH-a i s dodatkom METH-a na individualnom nivou za tri uzastopna dana.

U eksperimentu su bila korištena dva monitora (2x32 vinske mušice). Jedan monitor sadržavao je vinske mušice koje su sedam dana konzumirale običnu hranu, a u drugom monitoru bile su vinske mušice koje su sedam dana konzumirale hranu sa vodenim ekstraktom *C.sativus* (2 mg/mL). Vinske mušice su u monitoru postavljene na način da 10 kontrolnih vinskih mušica dobiva kapilare s običnom hranom na oba kraja staklene cjevčice. 11 vinskih mušica ima običnu hranu na lijevoj strani, a hranu s METH-om na desnoj, dok su strane zamijenjene kod ostalih 11 vinskih mušica kako bi eliminirali preferenciju strane (Slika 8). Za kontrolu evaporacije, korištene su staklene cjevčice s kapilarama pripremljenim na prethodno opisani način, ali one nisu sadržavale vinske mušice.



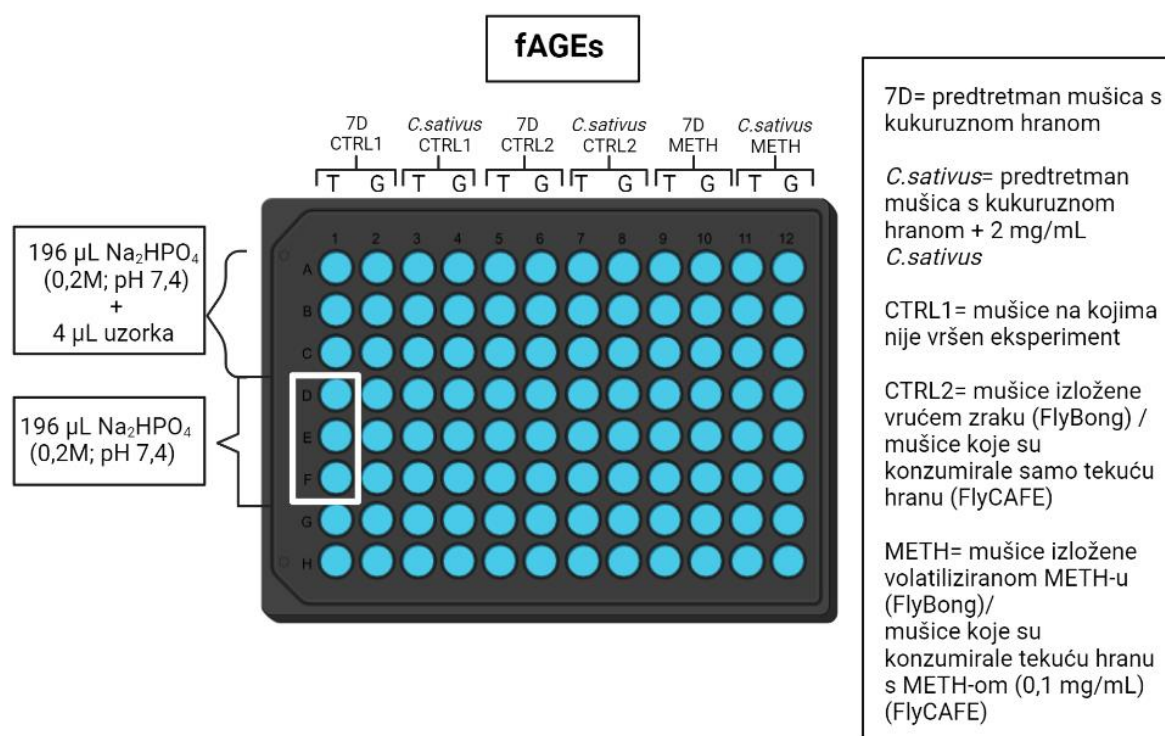
**Slika 8. Prikaz eksperimenata u kojima je korišten FlyCAFE esej. [10]**

### 3.2. Biokemijski eseji

Količina fAGEs-a i ROS-a je mjerena nakon bihevioralnih eksperimenata upotrebom FlyBong i FlyCAFE metode. Nakon imobilizacije ledom pomoću pincete i disekcijskog pribora razdvajaju se glave od ostatka tijela te se stavljaju u označene i prethodno izvagane Eppendorf tubice. Ekstrakcijski pufer koji je korišten je PBS × 1 (za 1 L: 8 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + TritonX 0,1% = PBT. Za 5 mg uzorka tkiva, potrebno je 300 μL pufera. Uzorci se mehanički homogeniziraju s puferom te centrifugiraju 30 minuta pri 4°C i 14.000 rpm.

### 3.3.1. Mjerenje fAGEs-a

4  $\mu\text{L}$  uzorka dodaje se u 196  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,2M; pH 7,4) u triplikatima u crnu mikrotitarsku pločicu s 96 jažica (Slika 9). Fluorescencija se mjeri na uređaju Tecan Infinite 200 PRO koristeći eksitacijsku valnu duljinu od 360 nm i 440 nm emisijske valne duljine. Kvantifikacija je napravljena pomoću fAGEs-BSA kalibracijske krivulje i unaprijed postavljene Excel formule. Mjerenja su rađena na homogenatima glave i tijela (Slika 9).

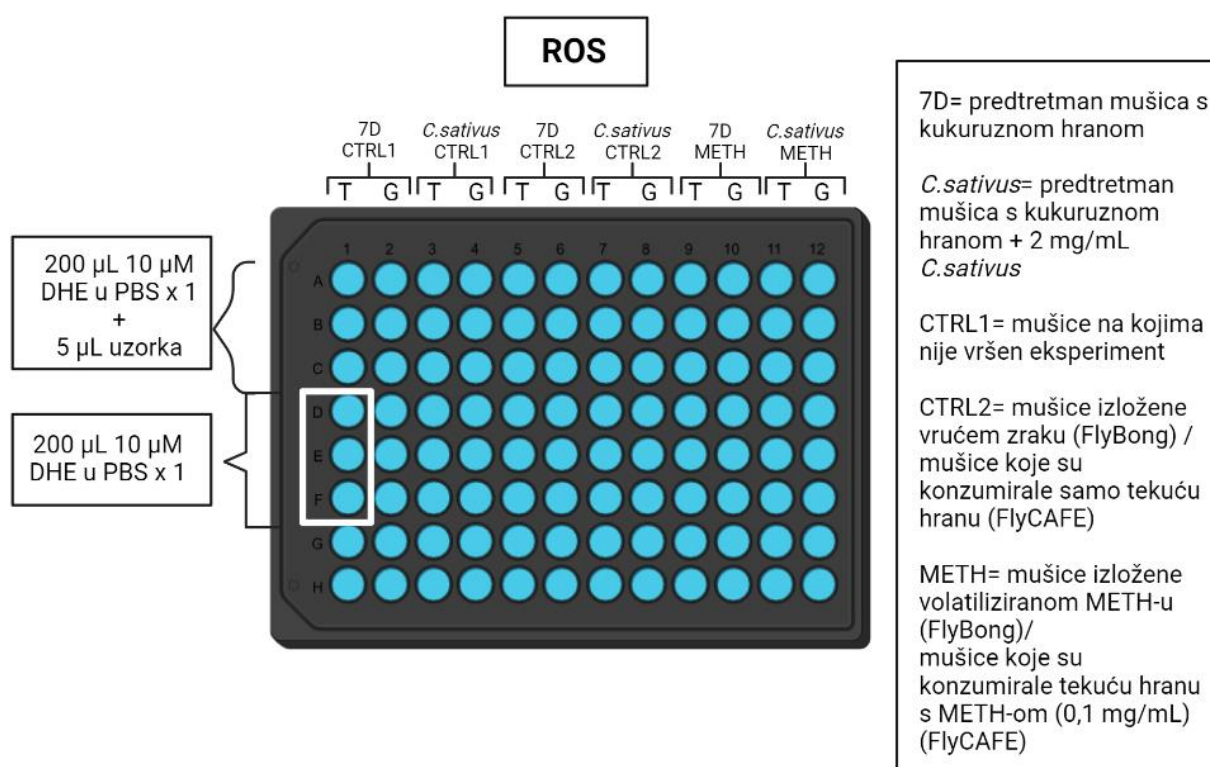


**Slika 9. Mjerenje količine fAGEs-a u uzorcima homogenata tijela (T) i glava (G) vinskih mušica nakon 7 dana tretmana s vodenim ekstraktom *C.sativus* (2 mg/mL). Ista mjerenja su ponovljena nakon FlyBong i FlyCAFE.**



### 3.3.2. Mjerenje ROS-a

U jažice na crnoj mikrotitarskoj pločici pipetira se po 200  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  DHE fluorescentne boje (fotoosjetljiva) u PBS  $\times$  1 te se u to dodaje po 5  $\mu\text{L}$  uzorka u triplikatu (Slika 10). Pločica sa uzorcima inkubira se 30 minuta na 37°C u mraku. Fluorescencija se mjeri na uređaju Tecan Infinite 200 PRO koristeći eksitacijsku valnu duljinu od 480 nm i 625 nm emisijske valne duljine. Kvantifikacija je napravljena pomoću kalibracijske krivulje za DHE sa poznatim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Mjerenja su rađena na homogenatima glave i tijela (Slika 10).



**Slika 10. Mjerenje količine ROS-a u uzorcima homogenata tijela (T) i glava (G) vinskih mušica nakon 7 dana tretmana s vodenim ekstraktom *C.sativus* (2 mg/mL).** Ista mjerenja su ponovljena nakon FlyBonga i FlyCAFE.

### 3.4. Statistička obrada rezultata

Primarna statistička analiza rezultata obrađena je u programu Excel. Grafovi i rezultati statističke značajnosti izrađeni su korištenjem GraphPad Prism softvera, verzije 9.5.1. Podaci su analizirani pomoću t-testa za nezavisne uzorke, two-way ANOVE te pomoću analize miješanih efekata. Provedene su i post-hoc analize Tukey's multiple comparison testa.

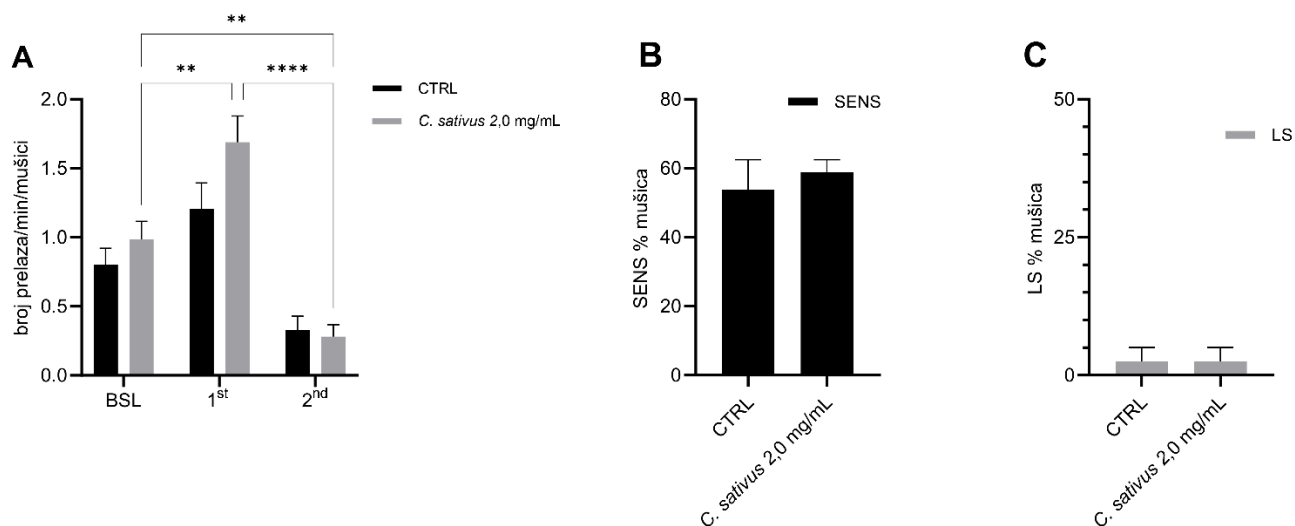
## 4. REZULTATI

### 4.1. Bihevioralni eseji

Znajući da psihostimulansi imaju veliki utjecaj na lokomotornu aktivnost vinskih mušica i da vinske mušice preferencijalno konzumiraju hranu s METH-om umjesto obične hrane, željeli smo ispitati kako će predtretman sa *C.sativus* utjecati na takva njihova ponašanja. Da bismo to ispitali, proveli smo bihevioralne eseje.

#### 4.1.1. FlyBong

Kako bi testirali utjecaj predtretmana sa *C.sativus* na lokomotornu aktivnost vinskih mušica, izložili smo ih vMETH-u putem FlyBong platforme. Odgovor na prvu dozu vMETH se naziva osjetljivost (OS/SENS), dok se odgovor na ponovljenu dozu naziva lokomotorna senzitivacija (LS). Populacijskom analizom utvrđena je statistički povećana lokomotorna aktivnost vinskih mušica koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* nakon izlaganja vMETH-u, kada se uspoređuje BSL (broj prelazaka 10 minuta prije eksperimenta) i razdoblje nakon prvog izlaganja (Slika 11A). Nakon njihovog drugog izlaganja vMETH-u, lokomotorna aktivnost značajno se smanjila u odnosu na prvo izlaganje, ali i u odnosu na BSL (Slika 11A).



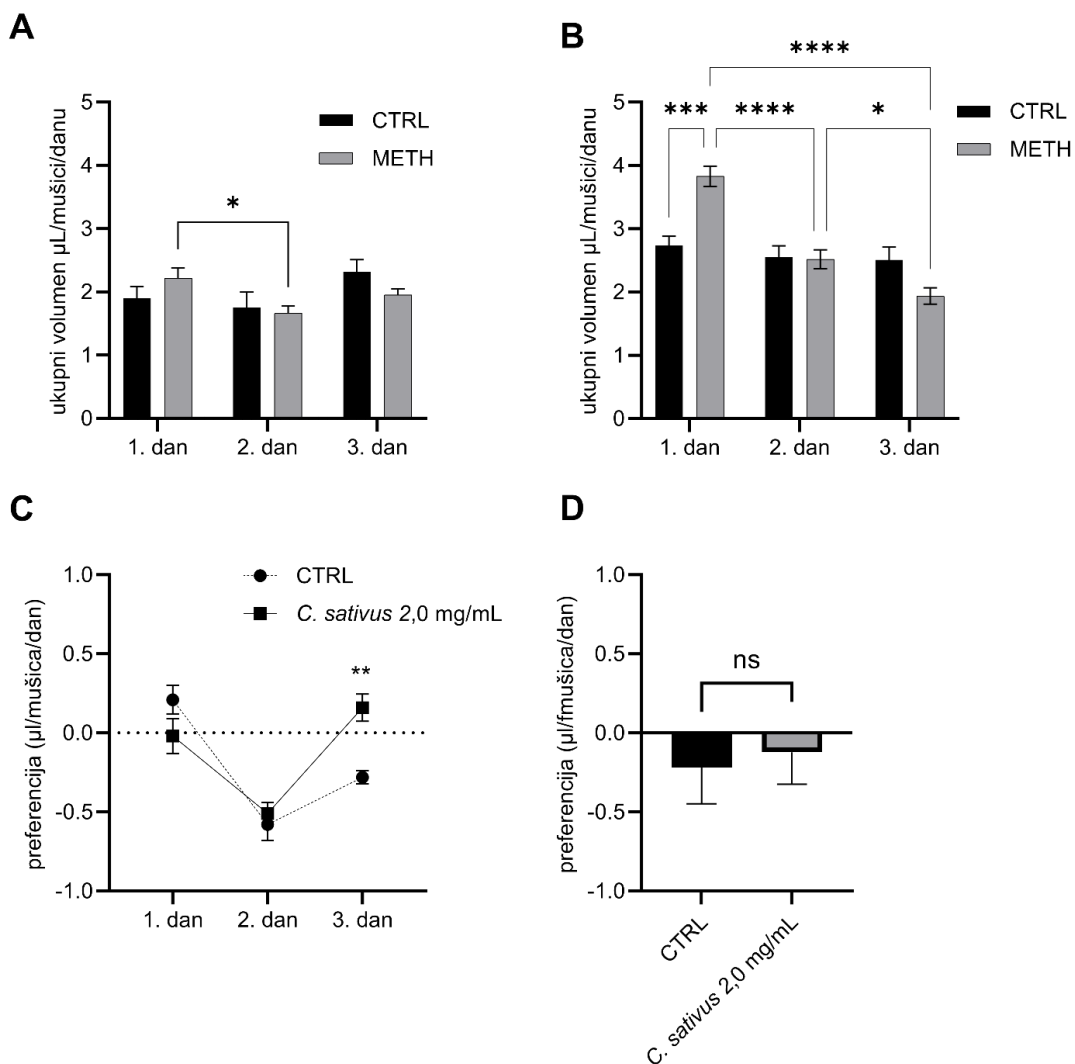
**Slika 11. Izloženost vinskih mušica vMETH-u značajno smanjuje njihovu lokomotornu aktivnost nakon druge doze. A)** Populacijska analiza lokomotorne aktivnosti nakon izlaganja vMETH-u vinskih mušica koje su bile na predtretmanu s kukuruznom hranom (CTRL) i mušica koje su bile na predtretmanu s kukuruznom hranom i *C.sativus* (2 mg/mL). **B)** Individualna analiza osjetljivosti (OS/SENS). **C)** Individualna analiza lokomotorne senzitivacije (LS). Two-way ANOVA, Turkey post-hoc analiza (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Kod individualne analize ne postoji statistički značajna razlika u postotku vinskih mušica koje su razvile osjetljivost (Slika 11B) ili lokomotornu senzitivaciju (Slika 11C) nakon izlaganja vMETH-u između skupina.

#### 4.1.2. FlyCAFE

FlyCAFE esejem željeli smo provjeriti ima li predtretman sa *C.sativus* utjecaj na preferencijalnu konzumaciju hrane s METH-om uspoređujući preferenciju s vinskim mušicama koje nisu bile izložene *C.sativus*. Kod vinskih mušica koje su sedam dana bile na običnoj hrani prije FlyCAFE-a nije primijećena razlika između volumena konzumirane tekuće hrane i tekuće hrane s METH-om (Slika 12A), iako je došlo do statistički značajnog smanjenja volumena konzumirane hrane s METH-om drugi dan u odnosu na prvi. Promatrajući vinske mušice koje su tijekom

predtretmana imale *C.sativus* u svojoj hrani, možemo vidjeti da su prvi dan konzumirale značajno više hrane s METH-om, nego obične hrane (Slika 12B). Drugi dan dolazi do izjednačenja konzumiranih volumena, dok je treći dan volumen konzumirane hrane s METH-om neznačajno manji. Kada gledamo volumen konzumirane hrane s METH-om kroz tri dana, možemo uočiti da se taj volumen značajno smanjivao iz dana u dan (Slika 12B).



**Slika 12. Predtretman vodenim ekstraktom *C.sativus* povećava preferenciju za METH treći dan eksperimenta.** **A)** Volumen konzumirane hrane kontrolnih vinskih mušica kroz tri dana (predtretman s kukuruznom hranom), CTRL=šećerna hrana, METH=šećerna hrana + 0,1 mg/mL METH. **B)** Volumen konzumirane hrane eksperimentalnih vinskih mušica kroz 3 dana (predtretman s kukuruznom hranom + 2

mg/mL *C.sativus*), CTRL=šećerna hrana, METH=šećerna hrana + 0,1 mg/mL METH. **C**) Preferencijalna konzumacija kontrolnih i eksperimentalnih vinskih mušica. **D**) Prosječna preferencijalna konzumacija kontrolnih i eksperimentalnih vinskih mušica kroz 3 dana. Two way ANOVA, Turkey post-hoc analiza, t-test za nezavisne uzorke (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

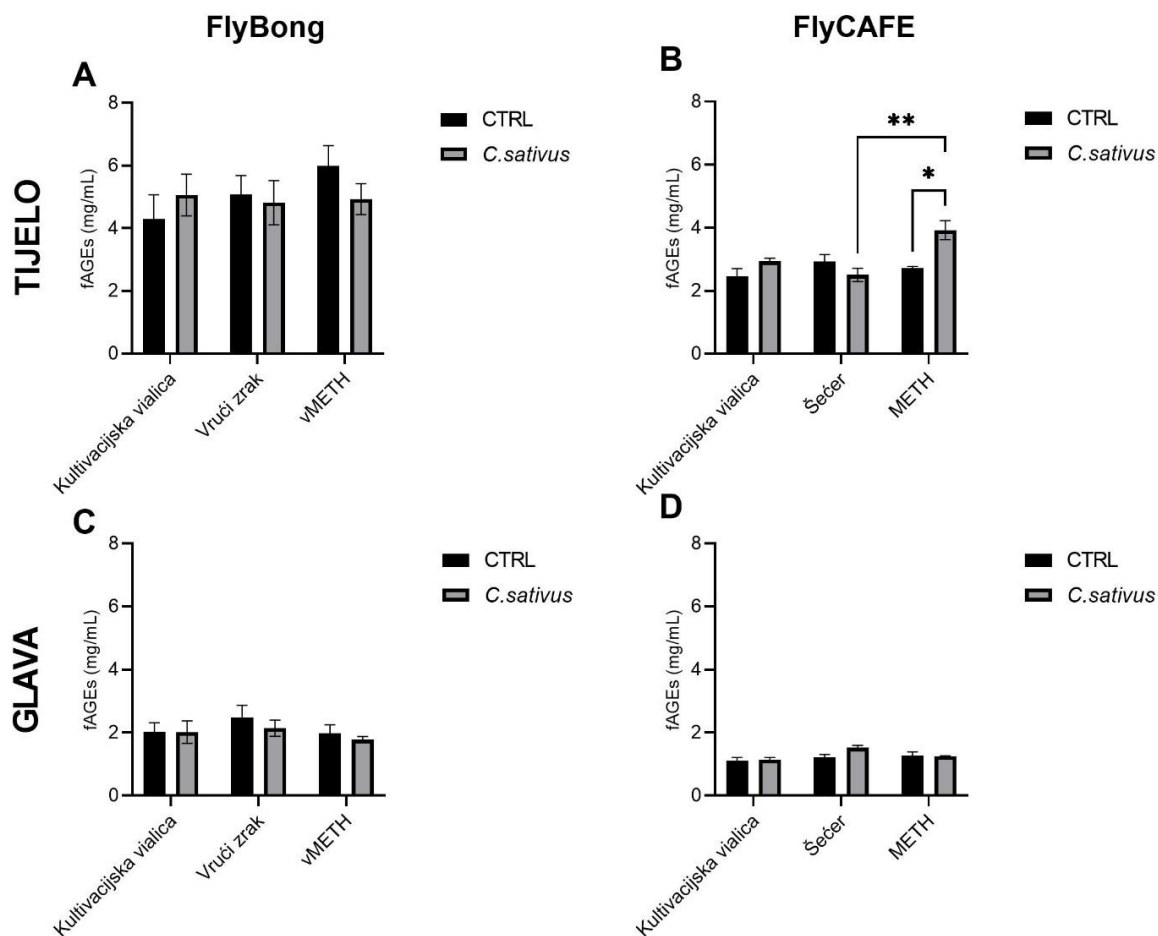
Iako su vinske mušice koje su bile na predtremanu sa *C.sativus* treći dan imale značajno veću preferencijalnu konzumaciju za METH od kontrolnih (Slika 12C), kod ukupne preferencijalne konzumacije kroz sva tri dana, nema značajne razlike između kontrolnih i eksperimentalnih vinskih mušica (Slika 12D).

## 4.2. Biokemijski eseji

Zbog poznatih antioksidativnih svojstava *C.sativus*, željeli smo ispitati utjecaj predtretmana vinskih mušica sa *C.sativus* na koncentraciju fAGEs-a i vodikovog peroksida nakon njihovog prethodnog izlaganja METH-u putem FlyBong i FlyCAFE eseja. Posebno su se promatrale koncentracije u glavama te u tijelima.

### 4.2.1. fAGEs

Izlaganje vinskih mušica METH-u putem FlyBong eseja nije doprinijelo značajnim razlikama u koncentracijama fAGEs-a u tijelima vinskih mušica (Slika 13A), kao niti u glavama (Slika 13C).



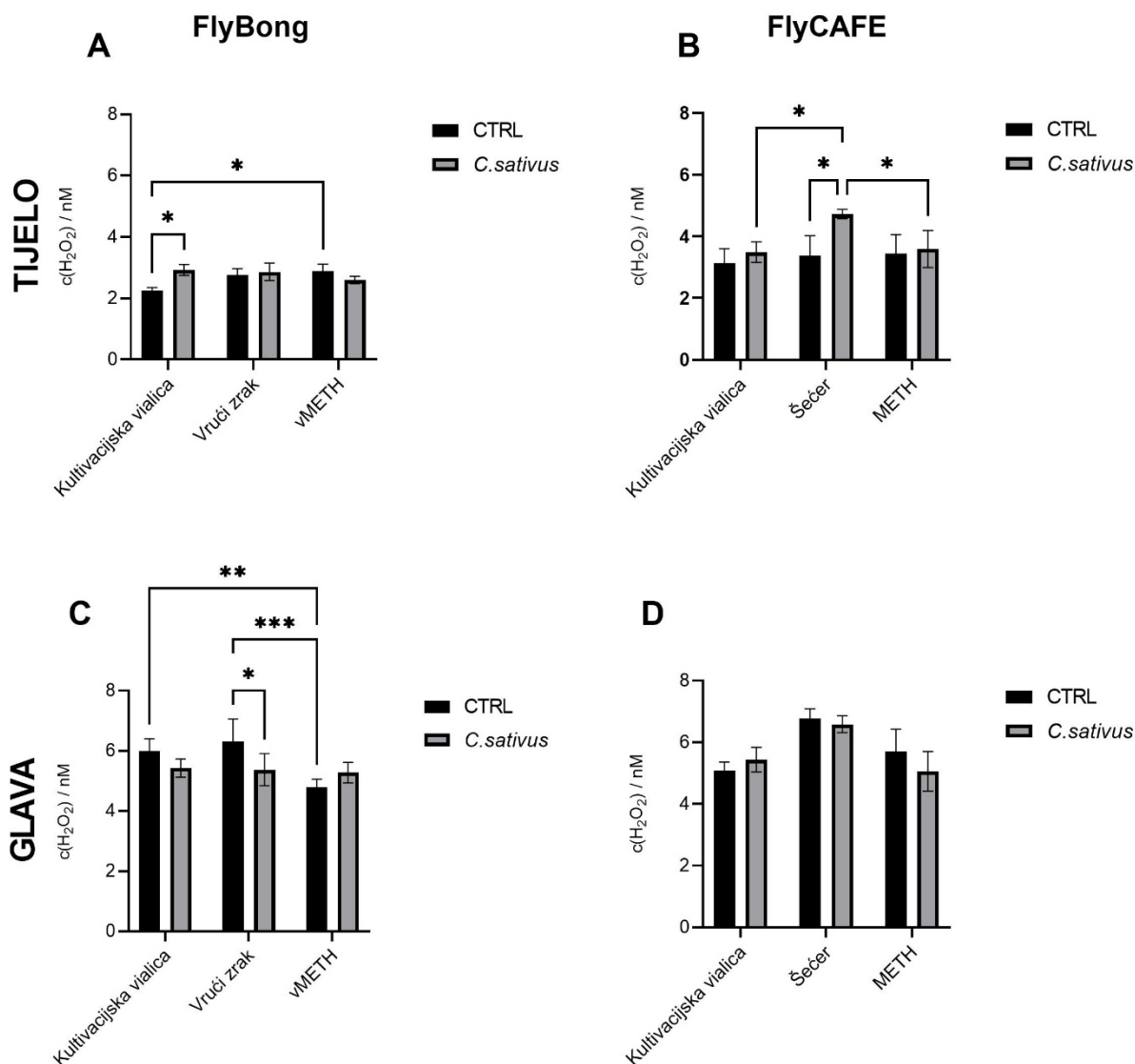
**Slika 13. Predtretman sa *C.sativus* povećava koncentraciju fAGEs-a u tijelima vinskih mušica koje su konzumirale METH putem FlyCAFE eseja. A)** Koncentracija fAGEs-a u tijelima vinskih mušica nakon FlyBong eseja. **B)** Koncentracija fAGEs-a u tijelima vinskih mušica nakon FlyCAFE eseja. **C)** Koncentracija fAGEs-a u glavama vinskih mušica nakon FlyBong eseja. **D)** Koncentracija fAGEs-a u glavama vinskih mušica nakon FlyCAFE eseja. Two-way ANOVA, Turkey post-hoc analiza, analiza miješanih efekata (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

Nakon što su vinske mušice bile izložene METH-u putem FlyCAFE eseja, one koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* imaju značajno veću koncentraciju fAGEs-a u tijelima. Također, došlo je i do povećanja koncentracije fAGEs-a nakon konzumacije METH-a u odnosu na vinske mušice koje su konzumirale samo šećernu hranu (Slika 13B). U glavama vinskih mušica nakon FlyCAFE eseja nije došlo do značajnih razlika u koncentracijama fAGEs-a (Slika 13D).

#### 4.2.2. Vodikov peroksid

Osim što ima antioksidativna svojstva, poznato je i da *C.sativus* ima pozitivan utjecaj na reaktivne kisikove vrste (ROS). Stoga su se ispitivale i koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u glavama i tijelima kontrolnih i eksperimentalnih vinskih mušica nakon FlyBong i FlyCAFE eseja. Kontrolne vinske mušice koje su tijekom eksperimenta ostale u kultivacijskim vialicama imaju manju koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tijelima u odnosu na vinske mušice koje su primile vMETH putem FlyBonga. Osim toga, imaju i značajno manju koncentraciju u tijelu od vinskih mušica koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus*, a također su tijekom eksperimenta ostale u kultivacijskim vialicama (Slika 14A). Kontrolne vinske mušice koje su putem FlyBonga primile vMETH imaju značajno manje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u glavama od onih koje su primile samo vrući zrak i od onih koje su ostale u kultivacijskim vialicama. Uočeno je i da nakon izlaganja vrućem zraku, eksperimentalne vinske mušice imaju manju koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u glavama u odnosu na kontrolne (Slika 14C).





**Slika 14. Predtretman sa *C.sativus* nema konzistentan učinak na promijenu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tijelima ili glavama vinskih mušica. A)** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tijelima vinskih mušica nakon FlyBong eseja. **B)** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tijelima vinskih mušica nakon FlyCAFE eseja. **C)** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u glavama vinskih mušica nakon FlyBong eseja. **D)** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u glavama vinskih mušica nakon FlyCAFE eseja. Two-way ANOVA, Turkey post-hoc analiza ((*\*p*<0,05; *\*\*p*<0,01; *\*\*\*p*<0,001)

Mjerenja nakon FlyCAFE eseja pokazala su da je koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tijelima eksperimentalnih vinskih mušica najveća kod onih koje su se hranile samo šećerom, a značajno manja kod onih koje su bile u kultivacijskim vialicama i onih koje su u hrani imale i METH. Značajno je veća i koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eksperimentalnih vinskih mušica na šećeru,

negoli kontrolnih, također na šećeru (Slika 14B). U glavama primjećujemo trend povećanja koncentracije  $H_2O_2$  u vinskih mušica koje su se hranile šećerom u odnosu na kultivacijske, a koncentracije opadaju konzumacijom METH-a (Slika 14D).

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju proučavao se utjecaj hranjenja mužjaka *D.melanogaster* s vodenim ekstraktom *C.sativus* na ponašanje inducirano METH-om. Ponašanje se induciralo i mjerilo upotrebom FlyBong i FlyCAFE eseja nakon čega su mjerene koncentracije fAGEs-a i ROS-a u njihovim tijelima i glavama kako bi se ispitaio utjecaj na biokemijskoj razini.

FlyBong esej se koristi za induciranje i mjerenje lokomotornog ponašanja nakon administracije 75 µg volatiliranog METH-a (vMETH) koje se za jednu dozu naziva osjetljivost, a za dvije doze lokomotorna senzitivacija. Podaci dobiveni ovom metodom se interpretiraju na populacijskom i individualnom nivou. Uz provedbu eksperimenata vrše se kontrolna mjerenja gdje su vinske mušice izložene struji vrućeg zraka koji je u eseju zagrijan na 180 °C i struji protokom od 2,5 L/min. Vinske mušice koje su primile jednu dozu vMETH-a, a nisu bile na predtretmanu sa *C.sativus*, nisu značajno povećale lokomotornu aktivnost na populacijskom nivou nakon prve doze u odnosu na aktivnost prije izlaganja (Slika 11A) što znači da nije došlo do izazivanja očekivane osjetljivosti na jednu dozu koja je ranije pokazana [10]. Ovo zapažanje se može objasniti i time da je korištena doza od 75 µg vMETH-a u vinskih mušica koje su 10-12 dana stare previsoka ili preniska te bi bilo potrebno testirati vinske mušice s nižim i višim dozama vMETH-a kako bi se utvrdio utjecaj doze. Skupina vinskih mušica koja je bila na predtretmanu sa *C.sativus* značajno je povećala aktivnost nakon prve doze vMETH-a u odnosu na vrijeme prije izlaganja, a zatim se ta aktivnost značajno smanjila nakon drugog izlaganja (Slika 11A). Ovaj podatak ukazuje na mogući potencijal vodenog ekstrakta *C.sativus* da ublažava bihevioralne efekte koji nastaju nakon izlaganja psihostimulansima. Takav rezultat može biti zbog poznatog anksiolitičkog djelovanja *C.sativus* [15], te antioksidativnog djelovanje komponenti ekstrakta [11]. Ranije je pokazano da predtretman s prirodnim antioksidansima utječe na osjetljivost i

lokomotornu senzitivaciju induciranu s kokainom preko utjecaja na koncentraciju vodikovog peroksida i aktivnoga oblika dopamina u lizatima glava mušica [2], što potencijalno može objasniti učinak *C.sativus*. Također, *C.sativus* djeluje pozitivno na moždani neurotrofni čimbenik koji ima neuroprotektivni utjecaj te je povezan s liječenjem depresije kod ljudi [22]. Na individualnoj razini analize podataka dobivenih FlyBongom (Slika 11B,C) nisu primijećene razlike između skupina koje su bile na hrani s ili bez *C.sativus*. Za pretpostaviti je da vinskih mušicama koje su ukupno 10-12 dana stare doza od 75 µg nije adekvatna te bi ih trebalo testirati s većim i manjim dozama, jer je poznato da je SENS dozno ovisni fenotip za vMETH [10].

Pokazano je kako vinske mušice, kada im se ponudi otopina šećera i otopina šećera s METH, preferiraju otopinu s METH [23]. Takvo ponašanje se inače izučava kod miševa i štakora u kontekstu preferencijalne konzumacije psihostimulansa [24]. Kako se za provedbu ovih istraživanja koristi grupa vinskih mušica, razvijen je test FlyCAFE koji omogućuje mjerenje preferencijalne konzumacije kod individualnih jedinki [25]. U prethodnim istraživanjima pokazano kako vinske mušice u FlyCAFE eseju preferencijalno konzumiraju METH umjesto tekuće šećerne hrane [10]. U našem eksperimentu pokazana je povećana preferencija za METH treći dan eksperimenta u vinskih mušica koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* u odnosu na one koje nisu (Slika 12C). Obzirom da se preferencija za METH računa kao razlika volumena konzumirane šećerne otopine s METH i otopine bez METH, pogledali smo volumene konzumirane otopine za obje skupine po danima (Slika 12A,B). Vinske mušice koje su bile 7 dana na predtretmanu samo sa kukuruznom hranom nisu pokazivale razliku u volumenu između hrane bez i s dodatkom METH-a tijekom tri uzastopna dana (Slika 12A). One koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus*, prvi dan su značajno više konzumirale hranu s METH, no ta konzumacija se do trećeg dana značajno smanjila (Slika 12B). Obzirom na spomenute antioksidativne komponente ekstrakta *C.sativus*, opaženo

smanjenje konzumacije METH-a u skupini koja je bila na predtretmanu s *C.sativus* je u određenoj mjeri očekivano. Međutim, nije očekivano da će vinske mušice koje su grupirane sedam dana te onda postavljene u FlyCAFE smanjiti preferenciju za METH. Takav rezultat moguć je zbog veće starosti mušica ili zbog navedene grupacije vinskih mušica u razdoblju od sedam dana.

Nakon provedbe bihevioralnih eseja upotrebom FlyBonga i FlyCAFE mjereni su parametri koncentracije vodikova peroksida i fluorescentnih produkata uznapredovale glikacije (engl. fluorescent Advanced Glycation End products, fAGEs ) u glavama i tijelima vinskih mušica koje su bile u eseju i onih koje nisu. Razlog fokusa na ove parametre je spomenuti antioksidativni utjecaj *C.sativus* te utjecaj METH-a na koncentraciju slobodnoga dopamina i produkciju radikala kisika. Obzirom na ranije spomenutu povezanost koncentracije dopamina i vodikovog peroksida s lokomotornim efektima psihostimulansa, važna je i povezanost količine slobodnog oblika dopamina s formiranjem fluorescentnih produkata uznapredovale glikacije (engl. fluorescent Advanced Glycation End products, fAGEs ) [4]. Mjerenjem koncentracije vodikovog peroksida pokazano je potencijalno antioksidativno djelovanje *C.sativus*, te ujedno utjecaj METH-a na oksidativni status.

U ovom istraživanju predtretman s *C.sativus* nije imao utjecaj na smanjenje koncentracije fAGEs-a u tijelima i glavama vinskih mušica nakon izlaganja vMETH-u (Slika 13A,C). Ipak, primijećen je trend smanjenja koncentracije fAGEs-a u tijelima vinskih mušica koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* nakon izlaganja vMETH-u u odnosu na one bez predtretmana *C.sativus*. Obzirom da je izlaganje vMETH kratko i radi se o malim dozama nije došlo do značajnog povećanja fAGEs-a kako u kontrolnoj tako i eksperimentalnoj skupini bilo da se radi o tijelima ili glavama, dok kod oralne administracije pri većoj dozi inače dolazi do akumulacije fAGEs-a u tijelima zbog oštećenja u dopaminergičnoj signalizaciji koje je karakteristično za izlaganje psihostimulansima [7].

Kod samoadministracije METH-a (FlyCAFE esej), u tijelima vinskih mušica koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* pronađene su veće koncentracije fAGEs-a u odnosu na kontrolne (bez predtretmana sa *C.sativus*) koje su također samoadministrirale METH (Slika 13B,D), što može biti zbog njihove značajno veće konzumacije hrane s METH-om prvi dan FlyCAFE eseja (Slika 12A,B). Do povećanja koncentracije fAGEs-a u tijelima je došlo i u odnosu na vinske mušice koje nisu imale ponuđen METH, već su konzumirale samo tekuću hranu sa šećerom, a također su bile na predtretmanu sa *C.sativus*. U glavama vinskih mušica nakon FlyCAFE eseja nije bilo značajnih razlika u koncentraciji fAGEs-a uspoređujući one koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* i one koje nisu.

U tijelima vinskih mušica koje nisu bile podvrgnute eksperimentima, već su ostale dodatna 3 dana u kultivacijskim vialicama s hranom, pronađena je povećana koncentracija vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) nakon predtretmana sa *C.sativus* u odnosu na vinske mušice koje u kultivacijskim vialicama s hranom nisu imale *C.sativus*. Dok je u kontrolnih vinskih mušica došlo do povećanja  $H_2O_2$  u tijelima nakon izlaganja vMETH-u, uspoređujući koncentracije s onim iz kultivacijskih vialica, predtretman sa *C.sativus* izgledno je spriječio to povećanje te nema značajne razlike u koncentraciji vodikovog peroksida u tijelima nakon izlaganja vinskih mušica vMETH-u (Slika 14). Sličan utjecaj zamijećen je i u istraživanju kojim se pokazalo da predtretman ekstraktom *C.sativus* i krocina sprječava nakupljanje ROS-a u tijelima i glavama vinskih mušica induciranih rotenonom koji djeluje neurotoksično [26]. Kao posljedica izlaganja vinskih mušica vrućem zraku, stresoru, dolazi do nakupljanja ROS-a u mozgu [27], a kod onih koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus*, njegova koncentracija nakon samo vrućeg zraka u glavama je značajno manja nego kod kontrolnih vinskih mušica koje nisu imale *C.sativus* kao predtretman što znači da je *C.sativus* mogao imati pozitivan utjecaj na nastali stres i na manju koncentraciju ROS-a.

Vinske mušice koje su bile na predtretmanu sa *C.sativus* te zatim stavljene u FlyCAFE esej kao kontrole (ponuđena samo šećerna hrana) imale su veću koncentraciju ROS-a u tijelima u odnosu na one u kultivacijskim vialicama koje nisu bile podvrgnute eksperimentu. Mogući razlog takvom rezultatu je stres prouzrokovan izolacijom za vrijeme eksperimenta, a takvo povećanje koncentracije ROS-a kao posljedica socijalne izolacije prethodno je istraživano na miševima, ali u njihovom mozgu [28], dok ovdje govorimo o tijelu te vidimo da posljedice nisu ograničene samo na mozak, već se javljaju u cijelom tijelu. Međutim, samoadministracija METH-a značajno je smanjila povećanu koncentraciju ROS-a u tijelu uzrokovanu izolacijom u vinskim mušicama prethodno tretiranih sa *C.sativus*. Ovdje možemo govoriti o Warburgovom efektu gdje se organizam nakon konzumacije METH-a prebacuje na anaerobni metabolizam glukoze na bazi laktata kod kojeg ne dolazi do nakupljanja ROS-a kao kod aerobnog koji ga proizvodi. Sličan trend možemo vidjeti i u glavama vinskih mušica gdje je koncentracija ROS-a neznajno porasla nakon izolacije u FlyCAFE eseju te se blago smanjila nakon konzumacije METH-a.

Iako nam prethodna istraživanja ukazuju da *C.sativus* smanjuje efekte uzrokovane psihostimulansima, neki rezultati ovog istraživanja nisu u skladu s time. U ovom istraživanju mušice su primile vodeni ekstrakt *C.sativus* oralno, kroz hranu, te prije izlaganja METH-u. S obzirom da krocin, jedan od glavnih aktivnih tvari *C.sativus* zaslužnih za njegova antioksidativna svojstva, ima slabu bioraspodjelivost nakon konzumacije oralnim putem [11], miješanje *C.sativus* s hranom možda nije najbolje rješenje za proučavanje njegovih efekata, već bi se trebao proučiti i njegov utjecaj nakon direktnog injektiranja u tijelo. Osim problema s oralnom administracijom *C.sativus*, trebalo bi pokušati s administracijom *C.sativus* nakon izlaganja psihostimulansima ili za vrijeme trajanja eseja, umjesto predtretmana. U tom slučaju, *C.sativus* bi služio kao sredstvo kojim se ublažavaju posljedice, umjesto preventivnog sredstva koji je u

našem slučaju trebao spriječiti nastanak negativnih efekta. Mogući problem određenim nepoklapanjima rezultata s literaturom je i starost vinskih mušica koje su bile prosječne starosti 9-12 dana, dok su u literaturi stare 3-5 dana. U tom slučaju, vinske mušice bi trebale kraće biti na predtretmanu sa *C.sativus* te bi se mogla povećati njegova koncentracija.



## 6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju pokazali smo utjecaj vodenog ekstrakta *C.sativus* na bihevioralne fenotipove *D.melanogaster* inducirane METH-om te na koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i završnih produkata glikacijskih reakcija (fAGEs).

Vodeni ekstrakt *C.sativus* pokazao je potencijal za anksiolitičko djelovanje tako što je došlo do smanjenja lokomotorne aktivnosti koja se povećala nakon administracije vMETH-a u *D.melanogaster*. Osim što je izgledno smanjio lokomotornu aktivnost, spriječio je i nakupljanje ROS-a koje je nastalo uslijed izlaganja vMETH-u i vrućem zraku u vinskih mušica koje nisu bile na predtretmanu sa *C.sativus*. Time otvaramo mogućnost *C.sativus* da djeluje smirujuće i antioksidativno. *C.sativus* je utjecao i na nastanak Warburgovog efekta gdje je nakon konzumacije METH-a došlo do smanjenja koncentracije ROS-a koji je nastao zbog stresa uzrokovanog socijalnom izolacijom vinskih mušica. Utjecaj predtretmana sa *C.sativus* na smanjenje koncentracije fAGEs-a u ovom istraživanju nije potvrđen.

Otvorili smo mogućnost daljnjeg istraživanja antioksidativnih i anksiolitičkih svojstava *C.sativus* te njegovog utjecaja na efekte koji nastaju kao posljedica konzumacije psihostimulansa kao što su povećanje lokomotorne aktivnosti i povećanje koncentracije ROS-a. Daljnja istraživanja zasigurno su potrebna, a trebala bi ići u smjeru promatranja utjecaja *C.sativus* na različite starosne skupine vinskih mušica te sa različitim koncentracijama *C.sativus* kako bi se odredila ona optimalna koja će imati najveći efekt.

Budućim istraživanjima *C.sativus* bi mogao postati važno sredstvo u liječenju simptoma i posljedica ovisnosti o psihostimulansima, bilo kao aktivna tvar nekog novog lijeka ili kao dodatno sredstvo liječenja uz dosadašnju terapiju lijekovima koji se koriste.

## 7. LITERATURA

- [1] Yang, X., Wang, Y., Li, Q., Zhong, Y., Chen, L., Du, Y., He, J., Liao, L., Xiong, K., Yi, C. X., & Yan, J. (2018). The main molecular mechanisms underlying METH-amphetamine-induced neurotoxicity and implications for pharmacological treatment. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00186>
- [2] Filošević Vujnović A, Rubinić M, Starčević I, Andretić Waldowski R. Influence of Redox and Dopamine Regulation in Cocaine-Induced Phenotypes Using *Drosophila*. *Antioxidants* (Basel). 2023 Apr 14;12(4):933. doi: 10.3390/antiox12040933. PMID: 37107308; PMCID: PMC10136103.
- [3] Filošević, A. (n.d.). Behavioral and genetic characteristics of psychostimulant-induced neuronal plasticity in *Drosophila melanogaster*. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:851086>
- [4] Vujnović, A. F., Jović, K., Pištan, E., & Waldowski, R. A. (2021). Influence of dopamine on fluorescent advanced glycation end products formation using *Drosophila melanogaster*. *Biomolecules*, 11(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biom11030453>
- [5] Kaun, K. R., Devineni, A. v., & Heberlein, U. (2012). *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. In *Human Genetics* (Vol. 131, Issue 6, pp. 959–975). <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1146-6>
- [6] Verheyen EM. The power of *Drosophila* in modeling human disease mechanisms. *Dis Model Mech*. 2022 Mar 1;15(3):dmm049549. doi: 10.1242/dmm.049549. Epub 2022 Mar 29.
- [7] Highfill, C. A., Baker, B. M., Stevens, S. D., Anholt, R. R. H., & Mackay, T. F. C. (2019). Genetics of cocaine and METH-amphetamine consumption and preference in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007834>

- [8] Philyaw TJ, Rothenfluh A, Titos I. The Use of *Drosophila* to Understand Psychostimulant Responses. *Biomedicines*. 2022; 10(1):119.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10010119>
- [9] Steketee, J. D., & Kalivas, P. W. (2011). Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- [10] Rigo, F., Filošević, A., Petrović, M., Jović, K., & Andretić Waldowski, R. (2021). Locomotor sensitization modulates voluntary self-administration of methamphetamine in *Drosophila melanogaster*. *Addiction Biology*, 26(3).  
<https://doi.org/10.1111/adb.12963>
- [11] Cerdá-Bernad, D., Valero-Cases, E., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2022). Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: effect on oxidative stress and mechanisms of action. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 62, Issue 12, pp. 3232–3249). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1864279>
- [12] Yang, W., Qiu, X., Wu, Q., Chang, F., Zhou, T., Zhou, M., & Pei, J. (2023). Active constituents of saffron (*Crocus sativus* L.) and their prospects in treating neurodegenerative diseases (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 25(5), 235.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2023.11934>
- [13] Rodriguez-Ruiz, V., Barzegari, A., Zuluaga, M., Zunooni-Vahed, S., Rahbar-Saadat, Y., Letourneur, D., Gueguen, V., & Pavon-Djavid, G. (2016). Potential of aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) in blocking the oxidative stress by modulation of signal transduction in human vascular endothelial cells. *Journal of Functional Foods*, 26, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.003>
- [14] Shoja, M., Mehri, S., Amin, B., Askari, V. R., & Hosseinzadeh, H. (2018). The Prophylactic and Therapeutic Effects of Saffron Extract and Crocin on Ethanol Withdrawal Syndrome in Mice. *Journal of*

Pharmacopuncture, 21(4), 277–283.

<https://doi.org/10.3831/KPI.2018.21.031>

[15] Kiashemshaki, B., Safakhah, H. A., Ghanbari, A., Khaleghian, A., & Miladi-Gorji, H. (2021). Saffron (*Crocus sativus* L.) stigma reduces symptoms of morphine-induced dependence and spontaneous withdrawal in rats. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 47(2), 170–181. <https://doi.org/10.1080/00952990.2020.1865995>

[16] Saeed Samarghandian, Mohsen Azimi-Nezhad, Fariborz Samini, "Ameliorative Effect of Saffron Aqueous Extract on Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Oxidative Stress on Diabetic Encephalopathy in Streptozotocin Induced Experimental Diabetes Mellitus", *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 920857, 12 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/920857>

[17] Shirali, S., Zahra Bathaie, S., & Nakhjavani, M. (2013). Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 27(7), 1042–1047. <https://doi.org/10.1002/ptr.4836>

[18] Mehri, S., Abnous, K., Mousavi, S. H., Shariaty, V. M., & Hosseinzadeh, H. (2012). Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(2), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9752-8>

[19] XIANG Min, QIAN Zhi-yu, ZHOU Cheng-hua. Effects of crocetin on formation of advanced glycation end products and expression of receptor for advanced glycation and products protein in diabetic rats[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 11(4): 448-452.

[20] Filošević, A., Al-Samarai, S., & Andretić Waldowski, R. (2018). High Throughput Measurement of Locomotor Sensitization to Volatilized Cocaine in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00025>

- [21] Xiao, C., Mileva-Seitz, V., Seroude, L., & Robertson, R. M. (2007). Targeting HSP70 to motoneurons protects locomotor activity from hyperthermia in *Drosophila*. *Developmental Neurobiology*, 67(4), 438–455. <https://doi.org/10.1002/dneu.20344>
- [22] Akbari-Fakhrabadi, M., Najafi, M., Mortazavian, S., Memari, A.-H., Shidfar, F., Shahbazi, A., & Heshmati, J. (2021). Saffron (*Crocus Sativus* L.), Combined with Endurance Exercise, Synergistically Enhances BDNF, Serotonin, and NT-3 in Wistar Rats. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 9(4), 426–434. <https://doi.org/10.52547/rbmb.9.4.426>
- [23] Highfill, C. A., Baker, B. M., Stevens, S. D., Anholt, R. R. H., & Mackay, T. F. C. (2019). Genetics of cocaine and METH-amphetamine consumption and preference in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 15(5), e1007834. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007834>
- [24] Tirelli, E., Laviola, G., & Adriani, W. (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 163–178. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00018-6)
- [25] Ja, W. W., Carvalho, G. B., Mak, E. M., de la Rosa, N. N., Fang, A. Y., Liong, J. C., Brummel, T., & Benzer, S. (2007). Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8253–8256. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702726104>
- [26] Rao, S. V., Muralidhara, Yeniseti, S. C., & Rajini, P. S. (2016). Evidence of neuroprotective effects of saffron and crocin in a *Drosophila* model of parkinsonism. *NeuroToxicology*, 52, 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.010>
- [27] Scialò, F., Sriram, A., Stefanatos, R., Spriggs, R. v., Loh, S. H. Y., Martins, L. M., & Sanz, A. (2020). Mitochondrial complex I derived ROS

regulate stress adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biology*, 32.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101450>

[28] Huong, N. T. T., Murakami, Y., Tohda, M., Watanabe, H., & Matsumoto, K. (2005). Social Isolation Stress-Induced Oxidative Damage in Mouse Brain and Its Modulation by Majonoside-R2, a Vietnamese Ginseng Saponin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1389–1393.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.1389>

## 8. ŽIVOTOPIS



### Natali Cindrić

**Kućna :** Josipa Blaževića Blaža 3, 51311, Skrad, Hrvatska

**E-adresa:** [natali.cindric1@gmail.com](mailto:natali.cindric1@gmail.com) **Telefonski broj:** (+385) 958562390

**Datum rođenja:** 06/02/2000 **Državljanstvo:** hrvatsko

#### RADNO ISKUSTVO

[ 01/2023 – 07/2023 ]

##### Istraživački rad u Laboratoriju za genetiku ponašanja

**Mjesto:** Sveučilište u Rijeci

**Zemlja:** Hrvatska

Istraživački rad u Laboratoriju za genetiku ponašanja u sklopu izrade diplomskog rada pod nazivom "Utjecaj vodenog ekstrakta *Crocus sativus* na bihevioralne fenotipove mužjaka *Drosophila melanogaster* inducirane metamfetaminom i redoks parametre" pod mentorstvom Doc.dr.dc.Rozi Andrečić-Waldowski  
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

[ 05/07/2021 – 16/07/2021 ]

##### Stručna praksa

###### Ljekarna Melita Rački-Burić

**Mjesto:** Skrad

**Zemlja:** Hrvatska

-upoznavanje s radom i ustrojem ljekarne  
-upoznavanje s farmaceutskim knjigama  
-slaganje lijekova za ručnu prodaju  
-izrada prašaka, krema, emulzija, suspenzija

#### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[ 2021 – Trenutačno ]

##### Diplomski sveučilišni studij "Biotehnologija u medicini"

**Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci** <https://www.biotech.uniri.hr/hr/studiji/diplomski-sveucilisni-studij-biotehnologija-u-medicini.html>

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

[ 2018 – 2021 ]

##### Sveučilišna prvostupnica Biotehnologije i istraživanja lijekova

**Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci** <https://www.biotech.uniri.hr/hr/studiji/preddiplomski-sveucilisni-studij-biotehnologija-i-istrazivanje-lijekova.html>

**Mjesto:** Rijeka

**Zemlja:** Hrvatska

[ 2014 – 2018 ]

##### Opća gimnazija

###### Srednja škola Delnice

**Mjesto:** Delnice

**Zemlja:** Hrvatska

#### JEZIČNE VJEŠTINE

**Materinski jezik/jezici:** hrvatski

Drugi jezici:

**engleski**

SLUŠANJE C2 ČITANJE C2 PISANJE C2

GOVORNA PRODUKCIJA C2 GOVORNA INTERAKCIJA C2

**njemački**

SLUŠANJE A1 ČITANJE A2 PISANJE A1

GOVORNA PRODUKCIJA A1 GOVORNA INTERAKCIJA A1

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

## DIGITALNE VJEŠTINE

---

MS Office (Word, Powerpoint, Outlook, Excel) | Izvršno sluzenje komunikacijskim programima (Skype, Zoom, Google meet, Teams) | Poznavanje rada u programima Avogadro PyMOL Chimera VDM | Napredno korištenje internetskih tražilica i pretraživanje baza podataka | Rad u programima za statističku analizu (GraphPad, Statistica)

## POČASTI I NAGRADE

---

**Studentska stipendija Ustanova koja je dodijelila priznanje/nagradu:** Općina Skrad

Dobitnica studentske stipendije Općine Skrad kroz sve godine studija (2018.-2023.)

## VOZAČKA DOZVOLA

---

**Automobili:** B

## ORGANIZACIJSKE VJEŠTINE

---

### Organizacija koncerata

Sudjelovanje u organizaciji koncerata "Woodrock" u sklopu Udruge mladih "Initium" Skrad.

Koncerti služe promociji Gorskog kotara, Općine Skrad te poboljšanju društvenog života mladih na tom području.

## MREŽE I ČLANSTVA

[ 2015 – Trenutačno ]

**Član upravnog odbora Udruge mladih "Initium" Skrad** Općina Skrad

Udruga mladih "Initium" Skrad neprofitna je udruga koja okuplja mlade na području Općine Skrad. Rad Udruge temelji se na organizaciji raznih manifestacija, radionica i događaja koji promoviraju Općinu i potiču mlade na međusobno druženje.

## KOMUNIKACIJSKE I MEĐULJUDSKE VJEŠTINE

---

### Komunikacijske i međuljudske vještine

Tijekom studiranja i obavljanja studentskog posla razvila sam odlične komunikacijske vještine, stekla iskustvo u javnom prezentiranju radova te sam odlična u radu u timu.