

ŠOLSKI CENTER VELENJE GIMNAZIJA  
Trg mladosti 3, 3320 Velenje

MLADI RAZISKOVALCI ZA RAZVOJ ŠALEŠKE DOLINE

RAZISKOVALNA NALOGA

**VPLIV DMSO NA VEDENJE, FIZIOLOGIJO IN MORFOLOGIJO  
VRTINČARJEV**

Tematsko področje: BIOLOGIJA

Avtorja:

Andraž Železnik, 4. letnik  
Lara Grudnik Pritržnik, 4. letnik

Mentorica: Klavdija Jug, univ. dipl. biol.

Velenje, 2024

Raziskovalna naloga je bila opravljena na Šolskem centru Velenje, Gimnazija.

Mentorica: Klavdija Jug, univ. dipl. biol.

Datum predavitve:

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Gimnazija Velenje, šolsko leto 2023/24

KG DMSO, vrtničarji, vedenjske raziskave, toksikologija

AV GRUDNIK PRITRŽNIK, Lara; ŽELEZNIK, Andraž

SA Jug, Klavdija, univ. dipl. biol.

KZ 3320, Velenje, SLO, Trg mladosti 3

ZA ŠCV, Gimnazija

LI 2024

IN **PATOLOGIJA *POLYCELIS FELINA* POD VPLIVOM DMSO**

TD Raziskovalna naloga

OP VII, 37 str., 1 tab., 2 graf., 18 sl., 9 vir.

IJ SL

JI sl / en

AI Planariji so družina ploskih črvov z odličnimi regeneracijskimi sposobnostmi. Zaradi tkiv, homolognih človeškim, so pogosto uporabljeni v toksikologiji in biomedicini. Dimetil sulfoksid (DMSO) je kemikalija, ki se pogosto uporablja v kriokonzervaciji in občasno v zdravstvu, v laboratoriju pa se uporablja tudi kot topilo za zdravila, netopna v vodi, ali kot prenašalec zdravil v telo. Vplivi na vedenje in nekateri vplivi na fiziologijo DMSO so že znani, vendar so slabo raziskani. Mehanizmi, s katerimi DMSO vpliva na organizme, pa so večinoma neznani. Ker je za izboljšavo kriokonzervacije glavna ovira ravno toksičnost DMSO, smo se jo odločili podrobneje raziskati z uporabo vrtničarjev vrste *Polycelis felina*. Osebkje smo izpostavili različnim koncentracijam DMSO za različna časovna obdobja. Z opazovanjem osebkov in preizkušanjem njihove odzivnosti smo ugotovili, da DMSO vpliva na vedenje vrtničarjev, saj zmanjša njihovo odzivnost na mehanske dražljaje in inhibira gibanje. DMSO povzroča tudi nekatere morfološke in fiziološke spremembe, kot so sprememba barve in poškodbe povrhnjice. To smo ugotovili z opazovanjem osebkov po dolgotrajni izpostavitvi DMSO (24 ur) pri nižjih koncentracijah (pod LD50) in kratkotrajni izpostavitvi pri višjih koncentracijah. V eksperimentu smo dokazali, da je lahko DMSO za

vrtnčarje tudi smrten.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Gimnazija Velenje, 2023/24

CX DMSO, Turbellaria, behavioural research, toxicology

AU GRUDNIK PRITRŽNIK, Lara; ŽELEZNIK, Andraž

AA Jug, Klavdija, univ. dipl. biol.

PP 3320 Velenje, SLO, Trg mladosti 3

PB ŠCV, Gimnazija Velenje

PY 2024

TI PATHOLOGY OF *POLYCELIS FELINA* UNDER THE INFLUENCE OF DMSO

DT RESEARCH WORK

NO VIII, 37 p., 1 tab., 2 graf., 18 fig., 9 ref.

LA SL

AL sl / en

AB Planaria, a type of flatworm, possess remarkable regenerative capabilities. These creatures are frequently utilized in toxicology and biomedicine due to their tissues being homologous to those of humans. Dimethylsulfoxide (DMSO) is a commonly used chemical in cryopreservation and, on occasion, in healthcare settings. It serves as a solvent for water-insoluble drugs and aids in drug delivery within the body. While some effects of DMSO on behavior and physiology are understood, much remains to be explored. The precise mechanisms through which DMSO impacts organisms are largely unidentified. Given that the primary challenge in enhancing cryopreservation techniques lies in the toxicity of DMSO, we opted to conduct a thorough experiment using *Polycelis felina*. Test subjects were exposed to varying concentrations of DMSO for different durations. Through observation and responsiveness testing, we discovered that DMSO alters the behavior of flatworms, diminishing their reaction to mechanical stimuli and impeding their movement. Additionally, DMSO induces certain morphological and physiological alterations, such as discoloration and epidermal damage. These effects were noted in subjects following prolonged exposure to lower concentrations of DMSO (below LD50) for 24 hours, as well as short-term exposure to higher concentrations. Our study has demonstrated that DMSO

can prove fatal to planaria.

## KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA.....	2
1.2 HIPOTEZE .....	3
2. PREGLED OBJAV .....	4
2.1 DIMETIL SULFOKSID.....	4
2.1.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI.....	4
2.1.2 UPORABA V MEDICINI.....	5
2.1.3 TOKSIKOLOGIJA .....	6
2.2 PLANARIJI.....	8
2.2.1 SISTEMATIČNO UVRŠČANJE PLANARIJEV IN <i>POLYCELIS FELINA</i> .....	9
2.2.2 EKOLOGIJA PLANARIJEV .....	10
2.2.3 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA PLANARIJEV.....	10
2.2.4 REGENERACIJSKI MEHANIZMI.....	14
2.2.5 UPORABA VRTINČARJEV V MEDICINI.....	15
2.3 VRTINČARJI IN DMSO .....	16
3. METODOLOGIJA .....	18
3.1 PRIDOBIVANJE OSEBKOV.....	18
3.2 METODOLOGIJA PRVEGA EKSPERIMENTA.....	20
3.3 METODOLOGIJA DRUGEGA EKSPERIMENTA .....	22
3.4 METODOLOGIJA TRETJEG EKSPERIMENTA.....	24
4. REZULTATI.....	25
4.1 REZULTATI PRVEGA POSKUSA .....	25
4.1.1 PO 24 URAH IZPOSTAVITVE.....	25
4.1.2 24 UR PO KONCU IZPOSTAVITVE .....	26
4.1.3 48 UR PO KONCU IZPOSTAVITVE .....	26
4.1.4 NADALJNJE SPREMLJANJE .....	26
4.2 REZULTATI DRUGEGA POSKUSA .....	27
4.3 REZULTATI TRETJEGA POSKUSA .....	30
5. DISKUSIJA.....	31
6. ZAKLJUČEK .....	33

7. POVZETEK .....	34
8. SUMMARY .....	35
9. VIRI .....	36
10. ZAHVALA .....	37



## KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz molekule DMSO .....	4
Slika 2: Preprost prikaz planarijev in njihovih regeneracijskih sposobnosti .....	8
Slika 3: Nekaj različnih vrst planarijev .....	9
Slika 4: Shematičen in mikroskopski prikaz telesnih sistemov planarijev.....	12
Slika 5: Reproductivni sistem planarijev.....	13
Slika 6: Razporeditev neoblastov po telesu planarija.....	14
Slika 7: Lokacija potoka, kjer smo nabirali vrtničarje.....	18
Slika 8: Nabiranje vrtničarjev v potoku – 22. 10. 2023.....	18
Slika 9: Shranjevanje vrtničarjev v hladilniku – 22. 10. 2023.....	19
Slika 10: Precejanje vode – 29. 1. 2024.....	19
Slika 11: Osebkci v DMSO. - 30. 1. 2024.....	20
Slika 12: Proces fiksiranja osebkov. - 1. 2. 2024.....	21
Slika 13: Osebkci fiksirani v etanolu.....	21
Slika 14: Opazovanje osebkov pod lupo. - 2. 2. 2024 .....	22
Slika 15: Osebek iz ponovitve eksperimenta v 11 % DMSO, dobro se vidi izločena sluz (30x povečava). – 7. 2. 2024 .....	28
Slika 16: Isti osebek po uri in petintrideset minutah, telo je skoraj popolnoma razpadlo (30x povečava). - 7. 2. 2024.....	28
Slika 17: Osebek čisto na začetku izpostavitve 5 % DMSO (30x povečava). - 7. 2. 2024 .....	30
Slika 18: Isti osebek po 25 minutah izpostavitve DMSO, koža je izgubila rjavo koloracijo (30x povečava). - 7. 2. 2024.....	30

## KAZALO GRAFIKONOV

Graf 1: (A) Preživetje planarijev kot funkcija koncentracije DMSO pri različnih časih izpostavljenosti, kot je navedeno na grafu. Vsaka podatkovna točka vključuje povprečje 12-18 osebkov. Navpične označbe prikazujejo standardno napako povprečja. (B) Vrednosti LD50 kot funkcija časa izpostavljenosti. Sklenjen krog predstavlja eksperimente pri času izpostavljenosti 2 min. Navpične označbe predstavljajo 95-odstotni interval zaupanja. ....	16
Graf 2: Učinek DMSO na gibljivost planarijev. (A) Črvi so bili izpostavljeni DMSO pri navedenih koncentracijah in število prečkanih kvadratov na minuto je bilo šteto 8 minut. To je prikazano kot prečkanj črt v primerjavi s časom. Motilnost planarja je obratno sorazmerna s koncentracijo DMSO. Vsaka vrstica vključuje rezultate z uporabo najmanj osmih črvov. (B) Na grafu so vsi nakloni z izjemo 0,1-odstotne koncentracije pomembno drugačni od kontrolnega naklona. V obeh grafih navpične označbe predstavljajo standardna napaka povprečja. ....	17

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Vrednosti LD <sub>50</sub> so raziskovalci pridobili z vnašanjem podatkov iz grafa 1 (A) v enačbo za izračun LD <sub>50</sub> , z izjemo časa dveh minut, kjer niso yavnali toksičnosti. Številke v oklepajih so 95 % interval zaupanja za posamezni parameter.....	16
---	----

## 1. UVOD

Planariji so edinstvena bitja, ki se uporabljajo v mnogih znanstvenih disciplinah. Že mnogo let jih uporabljajo v razvojni tehnologiji in raziskavah o generaciji, saj imajo izvrstne regeneracijske sposobnosti. V zadnjih letih pa so vse pogosteje uporabljeni tudi v farmaciji in toksikologiji. Njihova tkiva so podobna tkivom vretenčarjev. Za raziskave so primerni tudi zaradi tega, ker imajo širok nabor vedenjskih odzivov na okoljske dejavnike.

Takoj ko sva izvedela za planarije, sva vedela, da želiva delati raziskavo s tega področja. Po pregledu literature sva prišla do sklepa, da vplivi DMSO še niso popolnoma raziskani. Za temeljno vprašanje najine raziskovalne naloge sva si zato zastavila vprašanje: kako DMSO vpliva na vrtnčarje?

Dimetilsulfoksid je kemikalija, uporabljena v kriokonzervaciji in zdravstvu. Poznani so učinki kemikalije na organizme, vzroki za takšne odzive pa niso znani. S testiranjem na planarijih bi lahko ugotovili, s katerimi mehanizmi DMSO vpliva na tkiva.

## 1.1 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA

Z nalogo smo želeli odgovoriti na sledeča raziskovalna vprašanja z dveh vidikov:

### MAKROSKOPSKI VIDIK:

1. Ali je *Policelys felina* na DMSO enako občutljiva kot vrste planarijev, uporabljene v drugih raziskavah (*Schmidtea mediterranea*, *Dugesia* sp.)?
2. Ali bodo osebki, izpostavljeni DMSO, spremenili barvo?
3. Ali bodo imeli osebki, izpostavljeni DMSO, vidne poškodbe po površini telesa?
4. Ali se bo oblika telesa osebkov, izpostavljenih DMSO, spremenila?
5. Ali se bo vedenje osebkov, izpostavljenih DMSO, spremenilo (gibanje, odzivnost)?

### MIKROSKOPSKI VIDIK:

1. Ali se bodo na mikroskopskem nivoju pokazale poškodbe DMSO in ali se bodo te po izpostavitvi začele celiti?
2. Ali bodo vidne spremembe v zgradbi organov in tkiv?
3. Ali se bo število specifičnih celic, ki nakazujejo imunski odziv, spremenilo?

## 1.2 HIPOTEZE

Oblikovali smo naslednje hipoteze za raziskovalna vprašanja v raziskovalni nalogi:

1. *Policelys felina* je na koncentracije DMSO enako občutljiva kot ostale vrste vrtnčarjev.
2. Osebki, izpostavljeni DMSO, bodo zbledeli, ampak se bo čez čas povrnila prvotna barva.
3. Osebki, izpostavljeni DMSO, bodo imeli na površini telesa vidne poškodbe (predvsem zunanja epitelna plast).
4. Telesa osebkov, izpostavljena DMSO, bodo nenavadno nagubana.
5. Osebki, izpostavljeni DMSO, se bodo manj gibali, nenavadno zvijali in se bodo slabše odzivali na dražljaje.
6. Po izpostavitvi DMSO se bodo na mikroskopskem nivoju pojavile poškodbe, ki se bodo po koncu izpostavitve začele celiti.
7. V zgradbi organov in tkiv bodo vidne spremembe (območja brez celic, poškodovana bazna membrana itd.).
8. Število specifičnih celic, ki nakazujejo imunski odziv, se bo povečalo (neoblasi, bazofilična telesca in retikularne celice).

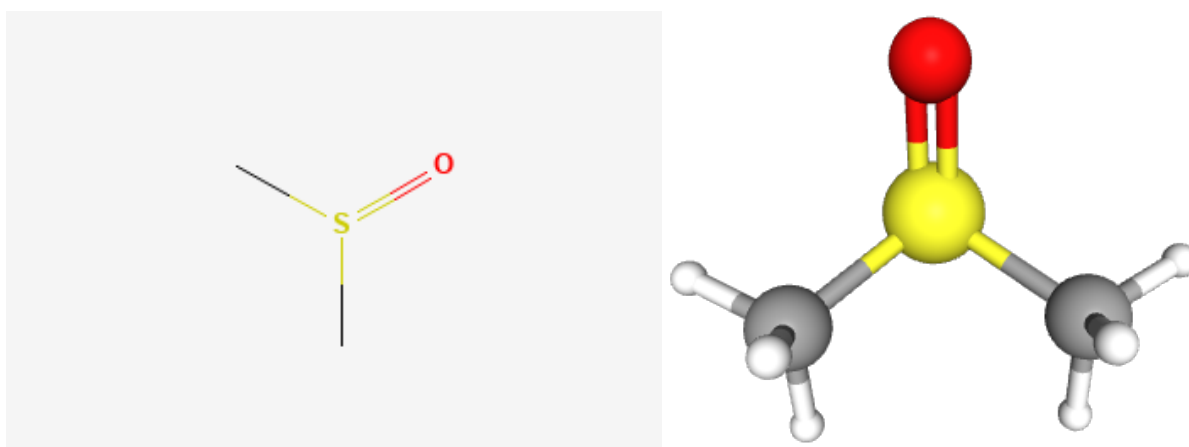
## 2. PREGLED OBJAV

Pregledali smo objave s treh področij. Prvo področje je DMSO: lastnosti, uporaba in toksičnost. Drugo področje so planariji na splošno: sistematika, ekologija, fiziologija, anatomija ter uporaba v toksikologiji in biomedicini. Tretje področje pa je povezava prejšnjih dveh, torej dosedanje raziskave vpliva DMSO na vrtničarje.

### 2.1 DIMETIL SULFOKSID

#### 2.1.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI

Dimetil sulfoksid (DMSO) je močno dipolarna molekula z molekulsko formulo  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  in molsko maso 78,14 g/mol. Tališče ima pri 18,5 °C, vrelišče pri 189 °C, plamenišče pri 95 °C, temperatura samovžiga pa je 215 °C. Z vodo se meša v vseh koncentracijah, poleg tega pa je topen v acetonu, etanolu, ogljikovem tetrakloridu, etil acetatu, benzenu in kloroformu. Ima gostoto 1,1 g/ml pri sobni temperaturi.



Slika 1: Prikaz molekule DMSO

Vir slike: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethylsulfoxide> – 21. 1. 2024

DMSO nastaja kot stranski produkt pri proizvodnji papirja in v lesarski industriji. Je produkt katalizirane reakcije dimetil sulfida s kisikom, pa tudi kot produkt oksidacije dimetil sulfida z dušikovim dioksidom ali dušikovim tetraoksidom.

V industriji se uporablja kot topilo za polimerizacijo akrilonitrila in drugih vinilnih monomerov ter drugih monomerov. Prav tako se uporablja v cianidnih reakcijah, industrijskih čistilih, hidravličnih tekočinah in kot sredstvo za odstranjevanje barve ter drugih težko topljivih materialov iz opreme.

V kemiji se pogosto uporablja kot topilo.

V kmetijstvu se lahko uporablja kot sredstvo za zaščito pred sesalci (npr. srnjadjo) in tudi kot stimulator rasti, vendar je uporaba zaradi toksičnosti omejena s predpisi. Uporablja se tudi kot topilo za pesticide.

### **2.1.2 UPORABA V MEDICINI**

DMSO ima dolgo zgodovino uporabe v medicini in farmaciji. Danes se uporablja kot ojačevalec penetracije v določenih farmacevtskih formulacijah, npr. v raztopinah natrijevega diklofenaka (odobreno v ZDA za zdravljenje znakov in simptomov osteoartritisa) in idoksuridina (odobreno v Evropi za zdravljenje obolenj s Herpes zoster). DMSO je varen in učinkovit mehanizem za prenos tako hidrofilicnih kot lipofilicnih zdravil skozi kožo za lokalizirano dostavo zdravil. Uporablja se tudi za zdravljenje intersticijskega cistitisa, prav tako pa lahko pomaga pri vnetnih obolenjih mehurja in pri zdravljenju kožnih in tkivnih poškodb, ki se pojavijo zaradi kemoterapije.

Poleg tega je DMSO najpogosteje uporabljen kriokonzervacijski agent, saj pride ob prisotnosti DMSO do manj poškodb celičnih membran med procesom. Uporablja se za kriokonzervacijo zarodkov, matičnih celic in celičnih kultur, vendar mora biti zaradi toksičnosti po taljenju čim prej odstranjen.

### **2.1.3 TOKSIKOLOGIJA**

#### **VPLIV NA ČLOVEKA**

Ob stiku s kožo ob prevelikih koncentracijah (>70 %) povzroči rdečico in srbenje, ki se pojavita takoj po izpostavitvi, koncentracije, enake ali manjše od 70 %, pa običajno teh simptomov ne sprožijo. Pri zelo občutljivih posameznikih pa lahko do reakcije pride tudi pri koncentracijah 10 %. Vnos skozi kožo povzroči pri ljudeh zadah, ki smrdi po česnu, degranulacijo mastocitov, povečanje števila polimordonuklearnih levkocitov in perivaskularni eosonofilis.

Pri vnosu dveh kapljic raztopine DMSO > 50 % pride do pekočega občutka in vazodilacije, koncentracije, nižje od 50 %, pa te reakcije ne sprožijo.

#### **ŠTUDIJE NA ŽIVALIH**

Pri eni izmed raziskav so raziskovalci v raztopino potopili podgane. Ni bilo takojšnjega odziva, v 24 urah pa je trinajst od štirinajstih podgan, ki so bile potopljene v 100 % raztopino DMSO, poginilo.

V drugi raziskavi so nerazredčen DMSO intravenozno vbrizgali petim samcem in petim samicam podgan. Količine so bile 2,5, 5 in 10 g/kg. Vsaka količina je bila vnesena v telo v eni minuti. Živali so po vbrizganju opazovali 14 dni. Vse smrti v eksperimentu so se zgodile v prvih 24 urah po vbrizganju DMSO. Pred smrtjo so bili prisotni tremorji, miastenija, dispneja in občasno konvulzije. Nesmrtno doze so zmanjšale motorično aktivnost in povzročile miastenijo.

V tretji študiji so 32 samcev podgan izpostavili hlapom DMSO s koncentracijo 200 mg DMSO na kubični meter zraka. Hlapom so bili osebki izpostavljeni tridesetkrat: sedem ur na dan, pet dni na teden, za šest tednov. Na zunaj niso osebki pokazali nobenih znakov toksičnosti, so pa imeli zadah po česnu že prvi dan izpostavitve.

V četrti raziskavi so raziskovalci štirim skupinam rezus makakov z želodčno intubacijo odmerili 90 % raztopino DMSO. DMSO so makakom odmerjali vsak dan do sedeminosemdeset tednov. Koncentracije, ki so jih uporabili, so bile 990, 2970 in 8910 mg/kg/dan. Glavna znaka, ki sta se pokazala pri osebkih, ki so jim peroralno dajali DMSO, sta bila sporadično prekomerno slinjenje in bruhanje. Pri višjih dozah je prišlo tudi do anoreksije. Med fizičnimi pregledi makakov niso našli nobenih z DMSO povezanih sprememb. Pri pregledu med nekropsijo niso našli nobenih z DMSO povezanih lezij, v lečah makakov pa ni bilo histoloških sprememb.

Pri razvojnih raziskavah so skupini od pet do šest zlatih hrčkov vbrizgali raztopino DMSO s koncentracijo od 50 do 5500 mg/kg intravenozno ali pa 5500 in 8250 mg/kg intraperitonealno na osmi dan nosečnosti. Pregled zarodkov tri dni pozneje je pokazal, da ni bilo vidnih nobenih embriocidnih ali teratogenih učinkov pri koncentracijah, nižjih od 2500 mg/kg. Pri višjih koncentracijah je prišlo do malformacij, kot so spajanje reber, nepravilnosti okončin, eksencefalija, mikroftalmija in razcepljena ustnica. DMSO ni opazno vplival na zdravje ali težo noseče samice.

V *Drosophila melanogaster* intraabdominalno vbrizganje DMSO ni povzročilo spolno vezanih recesivnih smrtnih primerov in ni povečalo pogostosti izgube spolnih kromosomov.

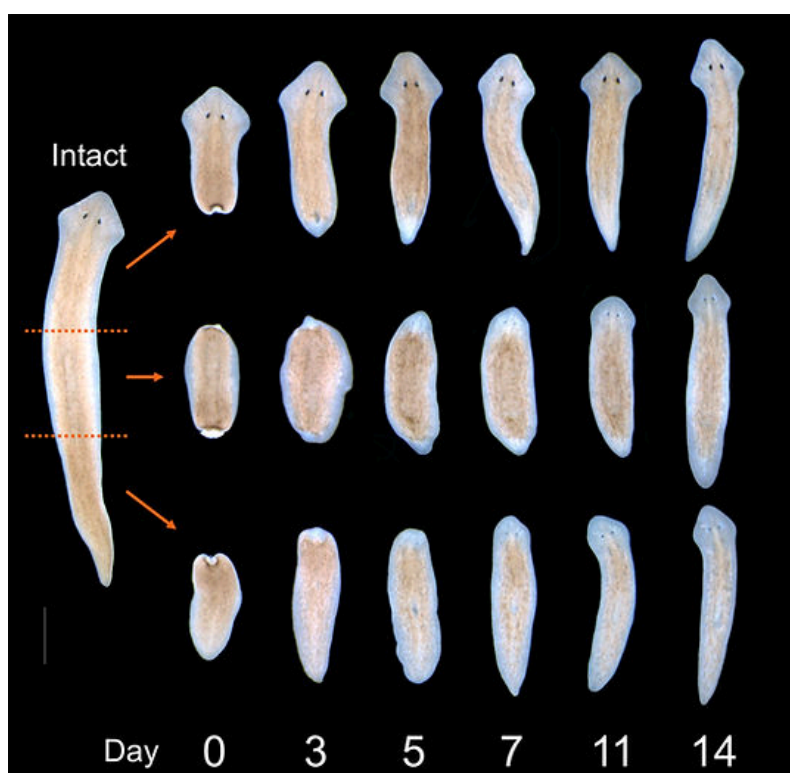
## **CITOLOŠKE RAZISKAVE**

Pri tej raziskavi so DMSO testirali na celicah jajčnika kitajskega hrčka do maksimalne koncentracije 5000 µg/ml s presnovno aktivacijo in brez nje. DMSO ni povzročil celične toksičnosti ali zamud v celičnem ciklu in ni povzročil povišanja frekvence izmenjave sestrskih kromatid.



## 2.2 PLANARIJI

Planariji so prostoživeče neparazitne živali. Njihova najbolj značilna lastnost je izjemna sposobnost regeneracije večjih delov telesa po amputaciji ali poškodbi. To je posledica delovanja matičnih celic ali neoblastov, ki so totipotente mezenhimske celice in so edine mitotsko aktivne celice pri nespolnih planarijih, iz katerih se na koncu razvijejo vsa diferencirana tkiva in organi. Neoblasti torej predstavljajo velik potencial za proučevanje genetskih in molekularnih mehanizmov regeneracije tkiv. Zaradi tega je bila *Schmidtea mediterranea*, ena izmed mnogih vrst planarijev, nedavno določena kot glavni modelni organizem za tovrstne študije.



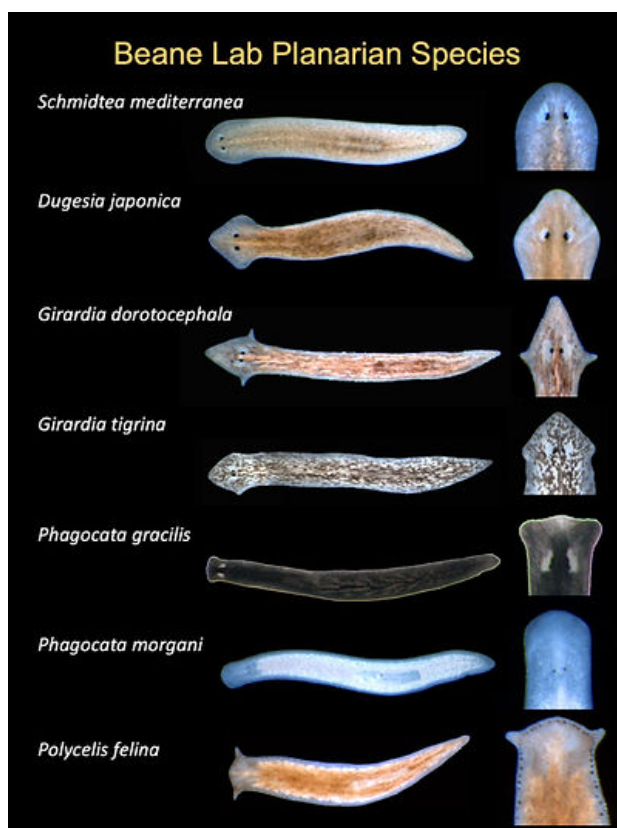
Slika 2: Preprost prikaz planarijev in njihovih regeneracijskih sposobnosti

Vir slike:

[https://static.wixstatic.com/media/b4036c\\_7519e4c018994b6db0c8f43b45476368~mv2.jpg/v1/fill/w\\_538,h\\_521,al\\_c,q\\_80,usm\\_0.66\\_1.00\\_0.01,enc\\_auto/Regen.jpg](https://static.wixstatic.com/media/b4036c_7519e4c018994b6db0c8f43b45476368~mv2.jpg/v1/fill/w_538,h_521,al_c,q_80,usm_0.66_1.00_0.01,enc_auto/Regen.jpg) - pridobljeno 20. 2. 2024

### 2.2.1 SISTEMATIČNO UVRŠČANJE PLANARIJEV IN *POLYCELIS FELINA*

Planariji pripadajo domeni evkariontov, kraljestvu živali (*Animalia*) in deblu ploščatih črvov (*Platyhelminthes*). Deblo se deli na več skupin in razredov, ki se ločijo predvsem po življenjskem okolju organizmov in zgradbi organizmov. Osebkki so lahko zajedavci ali prostoživeči ploski črvi in naseljujejo sladkovodna, morska in kopenska območja. Zaradi preprostosti teh osebkov pa je taksonomija precej zahtevna in marsikje še ni dobro raziskana. Planariji pripadajo redu *Tricladida*, ki je znan po prostoživečih črvih z izjemnimi regeneracijskimi sposobnostmi. V razredu je več kot 100 rodov in več 100 vrst. Ploski črvi, uporabljeni v tej raziskovalni nalogi, so vrste *Polycelis felina*, ki pripada družini *Planariide* in rodu *Polycelis*.



Slika 3: Nekaj različnih vrst planarijev

Vir slike:

[https://static.wixstatic.com/media/b4036c\\_110874b9302a4e8fb3a7917850be9262~mv2.jpg/v1/fill/w\\_401,h\\_534,al\\_c,q\\_80,usm\\_0.66\\_1.00\\_0.01,enc\\_auto/Multi-Species-Corrected.jpg](https://static.wixstatic.com/media/b4036c_110874b9302a4e8fb3a7917850be9262~mv2.jpg/v1/fill/w_401,h_534,al_c,q_80,usm_0.66_1.00_0.01,enc_auto/Multi-Species-Corrected.jpg) - pridobljena 20. 2. 2024

## **2.2.2 EKOLOGIJA PLANARIJEV**

Planarije lahko najdemo v mnogih življenjskih okoljih: morskih, sladkovodnih, braktičnih in kopenskih. So plenilci in lovijo manjše organizme v svoji okolici. Planariji imajo ključno vlogo v vodnih ekosistemih in služijo kot bioindikatorji. Kakovost vode lahko ocenimo glede na uspešnost planarijev v njej, saj so zelo občutljivi na okoljske spremembe in onesnaženje njihovega bivalnega okolja. Če je onesnaženje preveliko, se planariji ne morejo razmnoževati in dokaj hitro pomrejo. Nanje lahko negativno vpliva tudi sprememba temperature vode.

## **2.2.3 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA PLANARIJEV**

Planariji v velikosti variirajo od milimetra vse do metra. Poleg tega pa se primerki razlikujejo tudi po obliki in barvi ter postavitvi in številu oči ali drugih organskih sistemov. Planariji so tripoblastične živali s komplicirano interno anatomijo.

### **ŽIVČNI SISTEM**

Živčni sistem vključuje prave možgane, povezane z ventralnimi živčnimi vrvicami in preprostimi očesnimi čašami. Pod očesnimi pegami so gangliji, pogosto imenovani možgani planarijev. Živčni sistem je videti kot nekakšna lestev, ker so prečni živci povezani z živčnimi vrvicami, ki potekajo vzdolž telesa.

### **PREBAVNI SISTEM**

Imajo tudi dober prebavni sistem, ki ga sestavljajo tri glavne veje, zaradi česar je red poimenovan prav Tricladida, in protonefridni izločevalni sistem, ki je precej podoben ledvicam vrtinčarjev. Prehranjujejo se z mišičastim žrelom, ki ga iztegnejo skozi ustno odprtino, ki leži na sredini spodnje strani telesa. Pharynx ali žrelo je edina telesna odprtina in zato obenem deluje kot anus živali. Prebavni encimi, ki so izločeni iz ust, pričnejo zunanjo prebavo, v črevesju pa se prebava nadaljuje. Razvejana prebavna votlina omogoča, da hranila dosežejo vse predele telesa. Prehranjujejo se z živimi ali mrtvimi majhnimi živalmi, ki jih posesajo z mišičastimi usti.

## **PRENOS PLINOV IN HRANILNIH SNOVI**

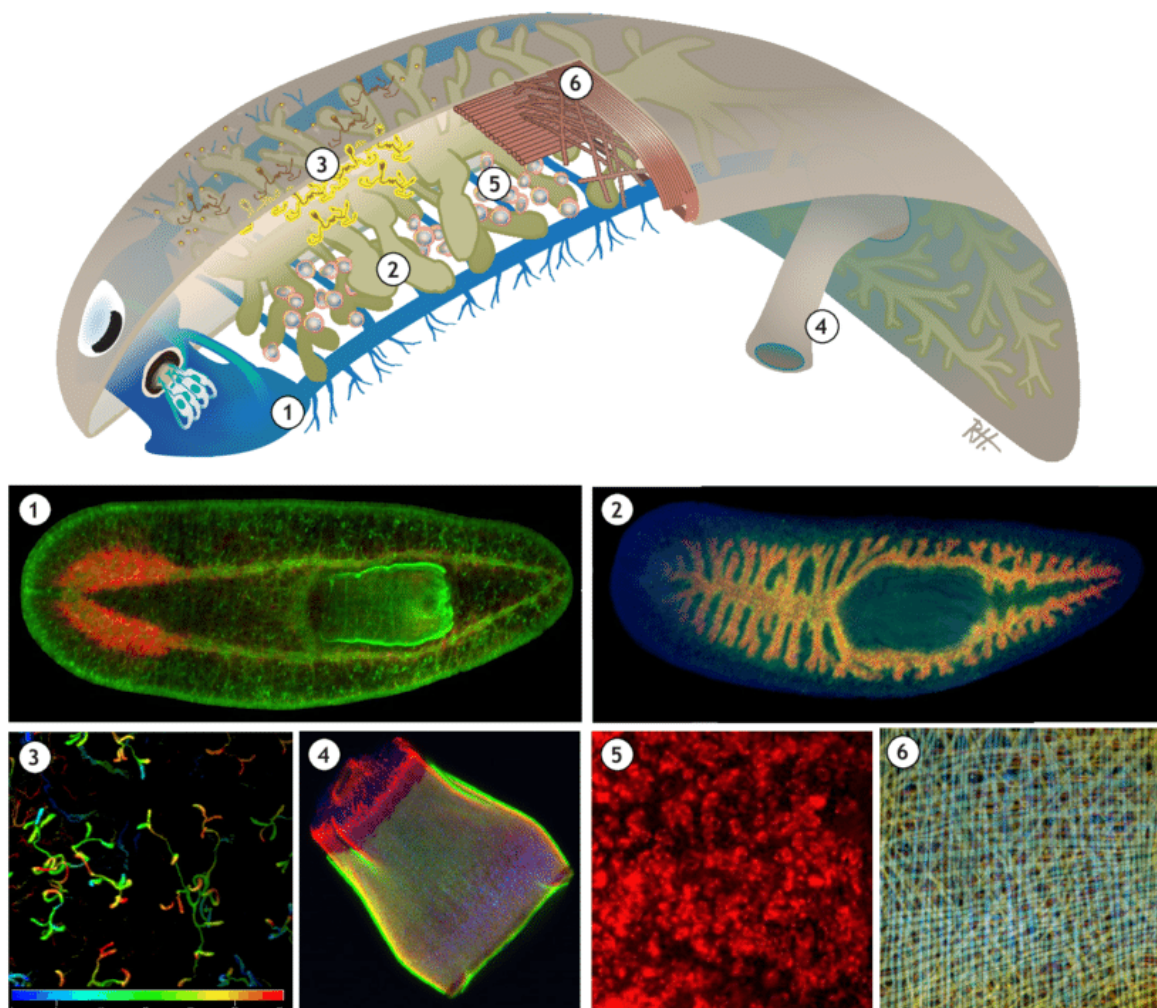
Krvožilnega in dihalnega sistema osebki nimajo. Hranila in plini se prenašajo z difuzijo. Po celotni površini telesa planarijev poteka difuzija kisika in ogljikovega dioksida.

## **IZLOČALA**

Sistem izločal je zgrajen iz številnih cevk, na katerih je veliko plamenskih celic in izločevalnih por. Plamenske celice odstranijo neželene tekočine iz telesa tako, da jih prečrpajo skozi kanale, ki vodijo do izločevalnih por. Imajo celično telo z jedrom in izboklino v obliki skodelice, notranjost, ki jo prekrivajo bički. Utripanje teh bičkov spominja na plamen in od tod izvira tudi ime. Skodelica je pritrjena na cevasto celico, katere notranja površina je prav tako prekrita z migetalkami, ki pomagajo pri premikanju tekočine skozi cevasto celico. Cevka se navzven odpre skozi nefronsko poro. Funkcija teh celic je uravnavanje osmotskega tlaka črva in vzdrževanje ionskega ravnovesja.

## **OSTALA TKIVA**

Neoblasti – odrasle matične celice planarijev – se nahajajo v mezodermu, ki obdaja vse notranje organe. Trislojna muskulatura telesne stene, zgrajena iz vodoravnih, navpičnih in poševnih mišičnih vlaken (gledano od zgoraj), obdaja mezenhim kot lupina in zagotavlja tako mehansko stabilnost kot lokacijske informacije spodnjim celicam ter omogoča premikanje.



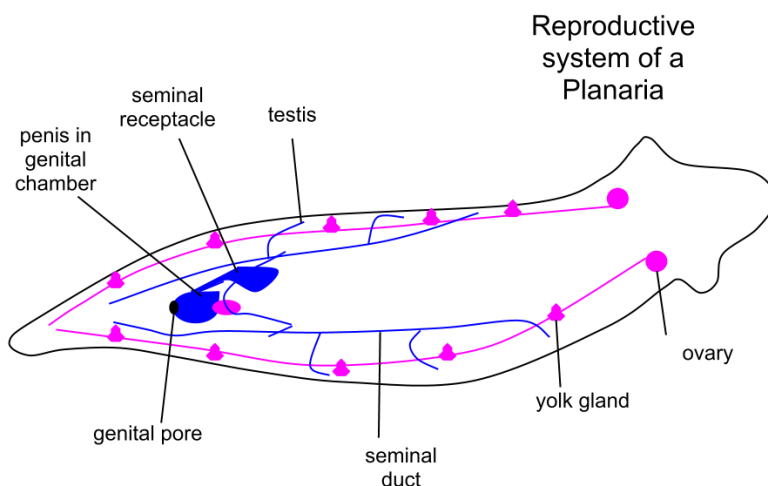
Slika 4: Shematičen in mikroskopski prikaz telesnih sistemov planarijev.

1. možgani (rdeče), centralni živčni sistem (zeleno) in žrelo (zeleno);
2. prebavila;
3. protonefridi;
4. Pharynx – žrelo;
5. neoblasti;
6. muskulatura telesne stene

Vir slike: <https://www.researchgate.net/profile/Miquel-Vila-Farre/publication/335764627/figure/fig3/AS:808731856080896@1569828108342/Planarian-anatomy-Schematic-top-and-microscopic-images-bottom-of-the-major-planarian.png> - pridobljeno 20. 2. 2024

## RAZMNOŽEVANJE

Planariji imajo večinoma hermafroditski reprodukivni sistem, sestavljen iz para jajčnikov, ki se nahaja za gangliji, testisov in žlez rumenjaka, nameščenih vzdolž celotne anteriorno-posteriorne osi, ter kopulacijskih organov v repu. Vsak planarij spermo obenem izloča in prejema. Jajčeca se razvijejo v telesu in izločijo v kapsulah, čez nekaj tednov pa se izležejo in odrastejo. Pogosto pa je tudi nespolno razmnoževanje s partenogenezo ali regeneracijo. Tiste vrste, ki temeljijo na nespolnem razmnoževanju s cepitvijo, imajo pogosto slabše razvite spolne organe. Uporabnejše pa je spolno razmnoževanje, ker se z njim povečuje stopnja genske raznolikosti in je vrsta posledično obstojnejša.

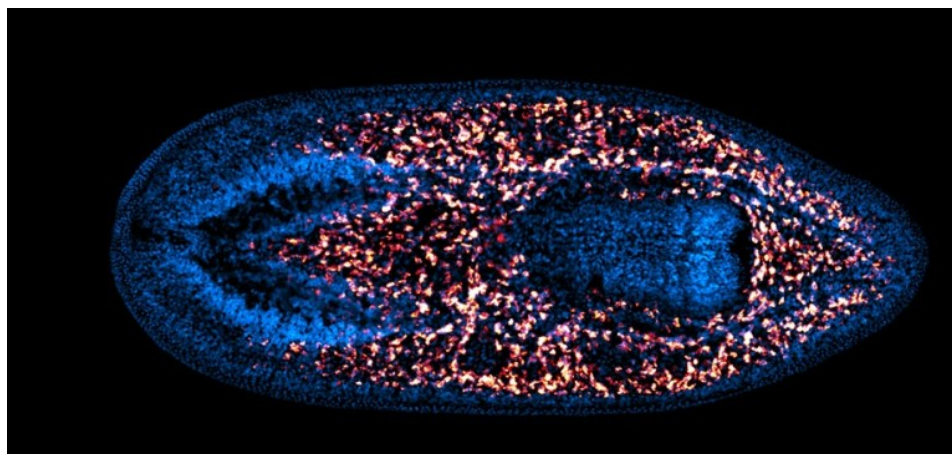


Slika 5: Reprodukivni sistem planarijev.

Vir slike: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/19/Planarian\\_reproductive\\_system.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/19/Planarian_reproductive_system.png) - pridobljeno 20. 2. 2024

## 2.2.4 REGENERACIJSKI MEHANIZMI

Regenerativne sposobnosti planarijev so posledica predvsem obilne populacije neobičajnih odraslih matičnih celic – neoblastov. Neoblasti so relativno majhne okrogle celice z visokim volumskim razmerjem med jedrom in citoplazmo. Porazdeljene so po celotnem mezenhimu planarija. Pogosto imajo podaljške, podobne filopodijem, in RNA-proteinska zrnca, morfološko in molekularno zelo podobna RNA-proteinskim zrcem, ki jih najdemo v mnogih živalskih vrstah. Neoblastov je v primerjavi z matičnimi celicami v drugih živalih precej veliko in je ocenjeno, da predstavljajo 20 – 30 % vseh celic. En sam neoblast, presajen v gostitelja brez matičnih celic, zadostuje za regeneracijo celotne živali. Neoblast postopoma nadomešča vse celice gostitelja s svojimi potomci. To dokazuje, da se lahko iz neoblastov razvijejo vse vrste celic, kar je definicija pluripotentnosti. Edina dela planarija brez neoblastov sta konica glave in pharynx in zato nista sposobna regeneracije.



*Slika 6: Razporeditev neoblastov po telesu planarija.*

Vir slike: <https://garciaad.files.wordpress.com/2014/05/neoblasts-e1401151953683.jpg?w=768> – pridobljeno 20. 2. 2024

Vsaka poškodba aktivira neoblastne delitve. Rane, pri katerih je bilo odstranjeno tkivo, z neznanim mehanizmom pritegnejo potomce neoblastov, kopičenje postmitotičnih potomcev neoblastov pod sveže zaceljeno rano pa povzroči blastemo – množico diferenciacijskih celic v procesu tvorbe tkiva. Blastema se pojavi kot tanek rob nepigmentiranega tkiva približno 24 ur po poškodbi in še naprej raste in dozoreva. Ker je prehranjevanje, dokler regeneracija ni dokončana, pogosto onemogočeno, blastema vseh tkiv ne more obnoviti v popolni velikosti.

Neoblasi pa so prav tako ključni za vzdrževanje anatomije pri nepoškodovanih osebkih. To je bilo dokazano na planarijih, ki so bili obsevani in je bilo delovanje njihovih neoblastov onemogočeno. Sčasoma je prišlo do izgube glave, čemur je sledilo zvijanje in na koncu liza preostalih tkiv. Stopnja delitve bazalnih neoblastov se poveča tudi po vsakem hranjenju in se zato osebek povečuje, ob pomanjkanju hrane pa se osebek manjša.

### **2.2.5 UPORABA VRTINČARJEV V MEDICINI**

Vrtinčarji so eni najbolj uporabljenih živalskih modelov v razvojni biologiji in v regeneracijskih raziskavah, uporaba pa se širi tudi na področju neurofarmakologije. So prvi organizmi, ki kažejo cefalizacijo, vključno s primitivnimi možgani in veliko podobnostmi z živčnim sistemom vretenčarjev. Živčni sistem vrtinčarjev je po morfolgiji in fiziologiji pravzaprav bolj podoben živčnemu sistemu vretenčarjev kot pa živčnemu sistemu drugih nevretenčarjev. Poleg tega je skoraj vsak neurotransmitter, ki ga najdemo pri sesalcih, prisoten tudi v vrtinčarjih. Primerni so tudi za preučevanje razvoja in regeneracije živčnega sistema.

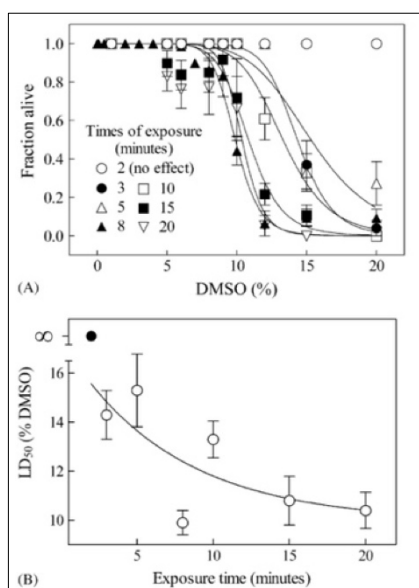
Vrtinčarji izražajo specifične vedenjske odzive na psihoaktivne substance, kot so kokain in opiat. Prav tako so bili uporabljeni v kemični in vedenjski toksikologiji in kot način za identifikacijo kemijskih teratogenov.



## 2.3 VRTINČARJI IN DMSO

Zaradi pogoste uporabe DMSO kot topila in popularnosti vrtničarjev kot modelnih organizmov že obstajajo članki na to temo.

V prvem članku so avtorji raziskovali toksičnost DMSO v vrtničarjih *Dugesia sp.* ter njegov vpliv na njihovo vedenje. Ugotavljali so LD<sub>50</sub> pri časih izpostavitve od 2 do 20 minut in naklon krivulje smrtnosti. Poleg tega so tudi podrobno opisali vedenjske spremembe, ki jih je povzročil DMSO. To so naredili s protokolom merjenja, pri katerem se osebek v petrijevki postavi na mrežo 1 cm<sup>2</sup> kvadratkov in se šteje, koliko kvadratov osebek prečka v 8 minutah. Ugotovili so, da DMSO vpliva na število kvadratov, ki so jih prečkali, v odvisnost od koncentracije, ki so ji osebki izpostavljeni.

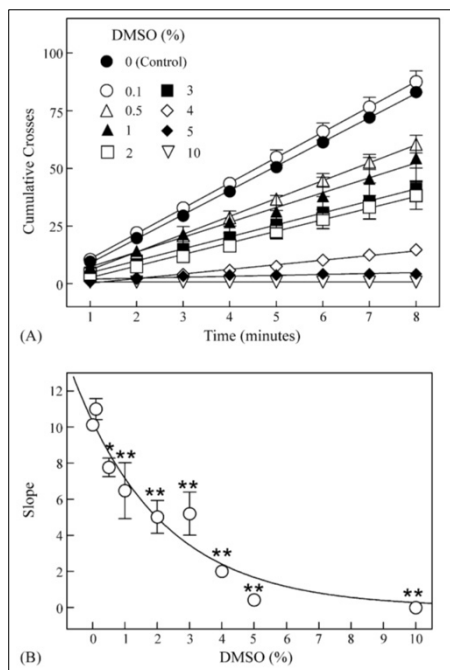


Graf 1: (A) Preživetje planarijev kot funkcija koncentracije DMSO pri različnih časih izpostavljenosti, kot je navedeno na grafu. Vsaka podatkovna točka vključuje povprečje 12-18 osebkov. Navpične označbe prikazujejo standardno napako povprečja. (B) Vrednosti LD<sub>50</sub> kot funkcija časa izpostavljenosti. Sklenjen krog predstavlja eksperimente pri času izpostavljenosti 2 min. Navpične označbe predstavljajo 95-odstotni interval zaupanja.

Table 1  
LD<sub>50</sub> values for DMSO exposure at different time periods

Exposure time (min)	LD <sub>50</sub> (%)
2	ND <sup>a</sup>
3	14.3 (13.6, 15.1) <sup>b,c</sup>
5	16.5 (15.2, 17.7) <sup>c</sup>
8	9.9 (9.6, 10.2)
10	13.3 (12.8, 13.8) <sup>c</sup>
15	10.8 (10.1, 11.5)
20	10.4 (9.7, 11.1)

Tabela 1: Vrednosti LD<sub>50</sub> so raziskovalci pridobili z vnašanjem podatkov iz grafa 1 (A) v enačbo za izračun LD<sub>50</sub>, z izjemo časa dveh minut, kjer niso zaznali toksičnosti. Številke v oklepajih so 95 % interval zaupanja za posamezni parameter.



Graf 2: Učinek DMSO na gibljivost planarijev. (A) Črvi so bili izpostavljeni DMSO pri navedenih koncentracijah in število prečkanj kvadratov na minuto je bilo šteto 8 minut. To je prikazano kot prečkanj črt v primerjavi s časom. Motilnost planarja je obratno sorazmerna s koncentracijo DMSO. Vsaka vrstica vključuje rezultate z uporabo najmanj osmih črvov. (B) Na grafu so vsi nakloni z izjemo 0,1-odstotne koncentracije pomembno drugačni od kontrolnega naklona. V obeh grafih navpične označbe predstavljajo standardna napaka povprečja.

V drugem članku so raziskovali vpliv DMSO na vedenje in antioksidativne encime vrtničarjev vrste *Dugesia japonica*.  $LC_{50}$  so merili pri časih izpostavitve 24, 48, 72 in 96 ur ter ugotovili, da je smrtnost neposredno odvisna od koncentracije. Ugotovili so tudi, da je zmanjšanje aktivnosti neposredno povezano s koncentracijo in da pri času izpostavitve v 1 uri 4 % raztopina DMSO zmanjša aktivnost za približno 50 %. Pri osebkih, izpostavljenih 0,1–1 % DMSO so izmerili povišanje encima CAT, pri osebkih, izpostavljenih 0,5 % DMSO pa tudi povišanje encima SOD.

Izvedenih je bilo tudi veliko drugih eksperimentov, ki pa za našo raziskavo niso ključni, saj se ukvarjajo z ekspresijo genov in biokemijo pri koncentracijah, pri katerih ne pride do makroskopskih poškodb, ne pa z vedenjem ali morfologijo vrtničarjev.

### 3. METODOLOGIJA

#### 3.1 PRIDOBIVANJE OSEBKOV

Profesorji na naši šoli vrtničarje že vrsto let nabirajo v potoku blizu Gorenja nad Zrečami, zato smo tudi mi obiskali ta potok. Preden smo nabrali vrtničarje, smo izmerili pH, temperaturo in trdoto vode. Vrtničarje smo našli na spodnji strani kamnov v mirnejših predelih potoka in jih s čopičem nežno postrgali v posodo, v kateri je bila voda iz potoka. Prav tako smo nabrali 10 litrov vode. Vrtničarje smo transportirali v hladilni torbi, kjer je temperatura ostala enaka, prav tako pa so vrtničarji imeli temo, ki jim bolj ustreza.



Slika 7: Lokacija potoka, kjer smo nabirali vrtničarje.

Vir slike: <https://www.google.com/maps> - pridobljeno 21. 2. 2024



Slika 8: Nabiranje vrtničarjev v potoku – 22. 10. 2023

Ker smo jih nabrali v nedeljo, so prvo noč preživel v hladilniku, nastavljenem na 6 °C. Naslednji dan smo jih prestavili v šolski hladilnik v biološkem kabinetu, kjer je bila temperatura nastavljena na 8 °C.



*Slika 9: Shranjevanje vrtničarjev v hladilniku – 22. 10. 2023*

Voda, ki smo jo nabrali v potoku, je bila precejena skozi gazo, da smo odstranili vse delce, ki bi lahko z različnimi procesi spreminjali kakovost vode.



*Slika 10: Precejanje vode – 29. 1. 2024*

### 3.2 METODOLOGIJA PRVEGA EKSPERIMENTA

Ker smo želeli vpliv DMSO opazovati čim podrobneje, smo pripravili večdnevni poskus. Poskus je bil zasnovan na podlagi članka o poskusu toksičnosti kverticina na *P. felina*. Vrtničarje smo nabrali v potoku ter jih pripeljali v laboratorij. Prvi dan smo dva osebka fiksirali, ostale pa smo razdelili v štiri skupine – po deset osebkov v vsako skupino.

Prva skupina je bila kontrolna, ostale tri skupine pa smo izpostavili trem različnim koncentracijam DMSO, raztopljenim v vodi, za 24 ur. Za *Dugesia japonica* je pri času izpostavitve 24 ur  $LC_{50}$  DMSO 4 % (2), zato smo za naš eksperiment izbrali naslednje koncentracije:

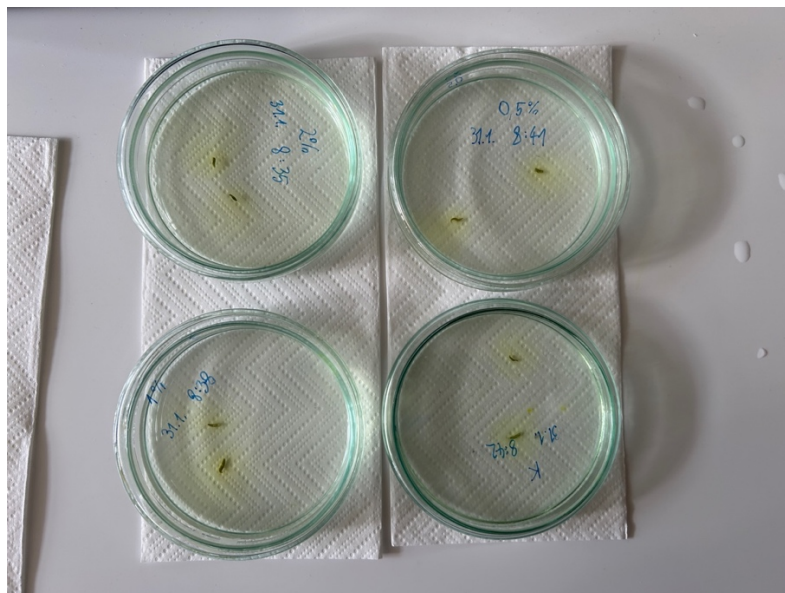
- 2. skupina je bila izpostavljena 0,5 % raztopini DMSO,
- 3. skupina je bila izpostavljena 1 % raztopini DMSO,
- 4. skupina je bila izpostavljena 2 % raztopini DMSO.



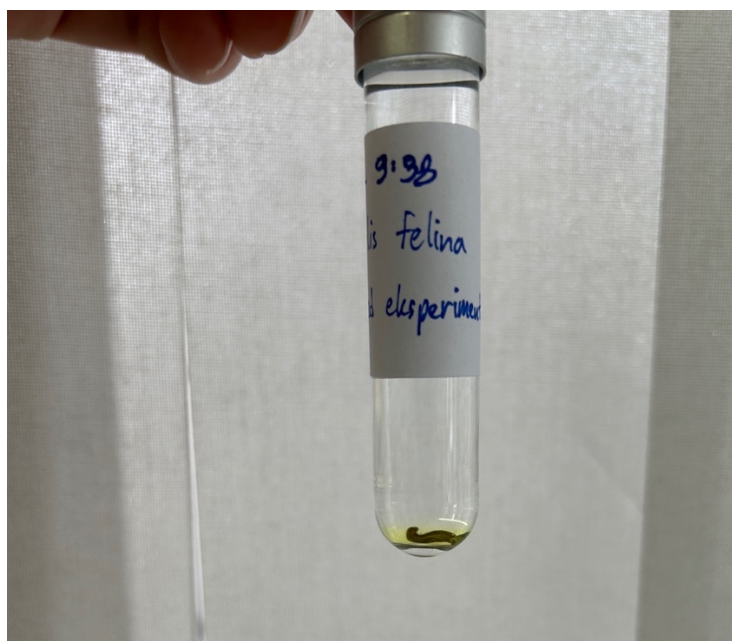
Slika 11: Osebki v DMSO. - 30. 1. 2024

Osebke smo izpostavili raztopinam za 24 ur, nato pa smo fiksirali dva osebka iz vsake skupine, ostale osebke pa smo prestavili nazaj v vodo. Vsak dan smo menjali vodo ter spremljali barvo, premikanje in odzivnost osebkov. Prvi, drugi, tretji in šesti dan po koncu izpostavitve smo fiksirali po dva osebka iz vsake skupine.

Za fiksiranje osebkov v eksperimentu smo uporabili Buinov fiksativ (1), vendar smo uporabili prilagojen recept: 10 % formalina, 85 % koncentrirane pikrinske kisline in 5 % ledocetne kisline (3).



Slika 12: Proces fiksiranja osebkov. - 1. 2. 2024



Slika 13: Osebkki fiksirani v etanolu. – 1. 2. 2024

### 3.3 METODOLOGIJA DRUGEGA EKSPERIMENTA

Da bi lahko podrobneje raziskali takojšnje vedenjske in tudi opaznejše fiziološke vplive DMSO na vrtničarje takoj po izpostavitvi, smo naredili eksperiment. Ker smo želeli vrtničarje opazovati pod stereo lupo, pod običajnimi pogoji pa se premikajo prehitro za opazovanje, smo uporabili protokol za imobilizacijo vrtničarjev s 3 % etanolom. Protokol pri vrtničarjih ustavi tako drsenje (premikanje s pomočjo migetalk) kot premikanje z uporabo mišic, inhibira pa tudi fotofobično vedenje. Protokol ne povzroči poškodb in si osebkji po odstranitvi iz etanola opomorejo v 3–4 urah.



Slika 14: Opazovanje osebkov pod lupo. - 2. 2. 2024

Raztopino 3 % etanola smo pripravili tako, da smo zmešali 4,3 mL 70 % etanola in 95,7 mL vode, ki sva jo pridobila iz potoka. Protokol je narejen za vrtničarje vrste *Schmidtea mediterranea*, ki so v laboratoriju pogostejši, čas, ki je potreben, da inhibira premikanje mišic, pa je odvisen od velikosti osebkov. Zaradi tega smo pustili osebkje v raztopini etanola eno, dve in tri ure, da bi določili čas, ki je potreben, da ustavi premikanje v *P. felina* pri osebkih velikosti okoli 1 cm, s katerimi smo delali eksperiment.

Po odstranitvi osebkov iz raztopine etanola smo jih 15 minut pustili v vodi, da so si opomogli. Vrtinčarje smo ločili v 2 skupini:

- prvo skupino smo uporabili za kontrolo in jo opazovali le v vodi;
- drugo skupino pa smo izpostavili 11 % koncentraciji DMSO v vodi (v/v).

Koncentracijo 11 % smo izbrali, saj je to določen LD<sub>50</sub> za 15-minutno izpostavitvev pri *Dugesia sp.* (2). Ker je *P. felina* občutljiva tudi na temperaturo in na sobni temperaturi ne more preživeti dlje časa, smo čas zunaj hladilnika omejili na 15 minut, temu pa je sledilo najmanj 15 minut v hladilniku.



### 3.4 METODOLOGIJA TRETJEG EKSPERIMENTA

Cilj tega eksperimenta je bil, da čim podrobneje opišemo vpliv DMSO na fiziologijo in vedenje. Ker smo nameravali osebke opazovati krajši čas, okrog 15 minut, smo izbrali koncentracijo 5 % (približno polovica  $LC_{50}$  za *Dugesia sp.*). Celoten čas izpostavitve smo osebke opazovali pod stereo lupo.

Ker smo želeli preveriti tudi vpliv na migetalko, smo po izpostavitvi DMSO enega od osebkov odstranili in premestili na stekelce za mikroskopijo. Osebek smo obarvali z nolandovo raztopino in vzorec nato opazovali pod mikroskopom.

Pri ostalih osebkih smo spremljali vedenje, izločanje sluzi, premikanje in konvulzije ter celoten proces dokumentirali s fotografiranjem in snemanjem.

## 4. REZULTATI

### 4.1 REZULTATI PRVEGA POSKUSA

#### 4.1.1 PO 24 URAH IZPOSTAVITVE

Osebki iz kontrolne skupine so izgledali normalno in so se tudi vedli običajno (so drseli ali pa mirovali). Na mehanski dražljaj so se takoj odzvali s krčenjem stran od dražljaja.

Osebki iz druge in tretje skupine so izgledali in se vedli zelo podobno osebkom iz kontrolne skupine, vendar niso bili tako aktivni. Na mehanske dražljaje so se osebki iz druge skupine odzvali samo, če so bili ti dražljaji na polovici telesa, ki je bližje glavi, če smo se jih dotaknili na polovici, bližji repu, pa se niso odzvali. Če je do odziva prišlo, pa je bil ta enak kot pri kontrolni skupini (krčenje stran od dražljaja) in enako intenziven. Osebki iz tretje skupine so se na mehanske dražljaje odzivali podobno kot osebki iz druge, vendar veliko manj intenzivno.

Osebi iz četrte skupine so izgledali nenavadno, saj je bila povrhnjica nagubana namesto gladka. Dva osebka iz četrte skupine, izpostavljeni 2 % raztopini DMSO, sta v roku štiriindvajsetih ur poginila in do konca razpadla. Pri osebkih, ki so preživeli, ni bilo razen v obliki povrhnjice videti večjih deformacij. Na mehanske dražljaje so se odzvali ne glede na lokacijo, vendar ne s krčenjem stran od dražljaja, ampak z zvijanem v naključne smeri; to zvijanje je po odstranitvi dražljaja trajalo 10–30 sekund.

Potem ko smo osebke predstavili iz raztopine DMSO v svežo vodo, so si osebki druge in tretje skupine po petih minutah že skoraj popolnoma vedenjsko opomogli in so postali enako aktivni kot kontrolna skupina, le nekateri osebki iz druge skupine so imeli nenavadno skrčene repe, v četrti skupini pa so se večji osebki nehali zvijati, manjši osebki pa so se zvijali manj pogosto in manj intenzivno. Po 15 minutah so si osebki še bolj opomogli, osebki prvih treh skupin so izgledali in se obnašali enako, osebki iz četrte skupine pa so se že skoraj vsi popolnoma prenehali zvijati.

#### **4.1.2 24 UR PO KONCU IZPOSTAVITVE**

En dan po koncu izpostavitve so imeli osebki iz vseh skupin, razen kontrolne skupina, rahlo razjedeno povrhnjico, vedli pa so se vsi enako. Tudi na mehanske dražljaje so se vsi odzivali normalno, tretja in četrta skupina malo manj intenzivno.

#### **4.1.3 48 UR PO KONCU IZPOSTAVITVE**

Dva dni po koncu izpostavitve so imeli osebki vseh skupin, razen kontrolne, še vedno rahlo razjedeno povrhnjico. Osebki druge in tretje skupine so se obnašali popolnoma normalno in se na mehanske dražljaje odzivali na enak način in enako intenzivno kot osebki kontrolne skupine. Osebki četrte skupine so se na mehanske dražljaje odzivali z vihanjem roba telesa stran od dražljaja namesto s krčenjem. Ko smo jih prestavili v posode s svežo vodo, so osebki prvih dveh skupin na to reagirali s premikanjem in krčenjem, osebki tretje in četrte pa ne tako zelo intenzivno.

#### **4.1.4 NADALJNJE SPREMLJANJE**

Osebke smo nato spremljali še štiri dni, v prihodnjih dneh so se vsi osebki vedli običajno in se normalno odzivali na mehanske dražljaje, poškodbe povrhnjice pa so se iz dneva v dan vidno izboljševale. Eksperiment smo sedem dni po začetku zaključili.

## 4.2 REZULTATI DRUGEGA POSKUSA

Ena ura v raztopini etanola je za imobilizacijo vrtničarjev te velikosti premalo (popolnoma imobiliziralo je samo enega od osebkov, ostali so se še vedno rahlo premikali, nekateri celo drseli).

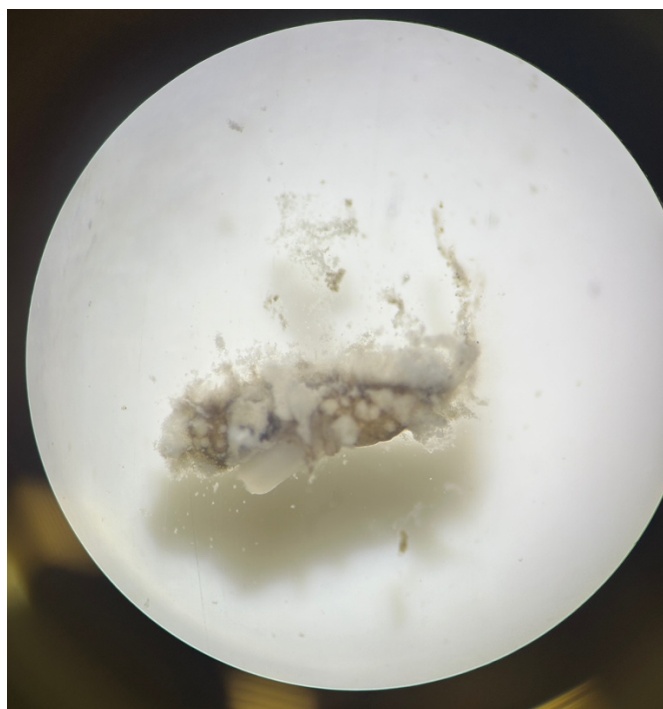
Po 2 ali 3 urah v raztopini etanola in nato 15 minutah v vodi so bili vsi opazovani osebki uspešno imobilizirani: še vedno so se bili sposobni premikati s pomočjo mišic, a se brez stresorjev (mehanskih ali kemičnih – dotiki, DMSO) niso, niso pa se mogli premikati s pomočjo migetalk. Prav tako je bila inhibirana fotofobičnost.

Osebki iz kontrolne skupine, ki so bili izpostavljeni svetlobi iz leče, prav tako pa za 15 minut sobni temperaturi, so si po 24 urah popolnoma opomogli – ni bilo vidnih poškodb, lahko so se normalno premikali z uporabo migetalk, prav tako mišic. S tem smo pokazali, da jih krajši intervali izpostavljenosti sobni temperaturi in svetlobi ne poškodujejo, prav tako pa si po imobilizaciji popolnoma opomorejo. Le eden od osebkov, ki je bil izpostavljen samo etanolu, je imel na koncu izpostavitve rano na repu. Osebki med opazovanjem pod lupo niso pokazali nobenega nenavadnega vedenja: bili so pri miru, ni prišlo ne do drsenja ne do krčenja ali zvijanja. Edina opazna razlika je bila nekolikšna nagubanost površine telesa.

Osebki, ki so bili izpostavljeni DMSO, so kazali številna nenavadna vedenja. Prišlo je do opaznega povišanja v izločanju sluzi. Prav tako je prišlo do zvijanja in trzanja, ki sta bila na začetku zelo intenzivna, čez čas pa sta se zmanjšala. Po približno 10 minutah ni bilo več zaznavnega gibanja, razen gibanja žrela. Eden izmed osebkov (ki je bil pred izpostavitvijo DMSO v raztopini etanola 1 uro) je iztegnil žrelo izven telesa, vendar ga ni odvrigel (vrtničarji zaradi določenih stresorjev lahko odvržejo žrelo). Prav tako so vsi osebki, izpostavljeni DMSO, nekoliko zbledeli (a ne popolnoma).



*Slika 15: Osebek iz ponovitve eksperimenta v 11 % DMSO, dobro se vidi izločena sluz (30x povečava). – 7. 2. 2024*



*Slika 16: Isti osebek po uri in petintrideset minutah, telo je skoraj popolnoma razpadlo (30x povečava). - 7. 2. 2024*

Po končani 15-minutni izpostavitvi smo vrnili osebke iz raztopine DMSO nazaj v vodo. Po 15 minutah v vodi smo preverili njihovo odzivnost na mehanske dražljaje. Tako osebki iz kontrolne skupine kot osebki, ki so bili izpostavljeni DMSO, so se na mehanske dražljaje le šibko odzivali.

Približno 24 ur po izpostavitvi so bili osebki, ki so bili izpostavljeni DMSO, mrtvi, njihovo telo pa je bilo delno dekompozirano.

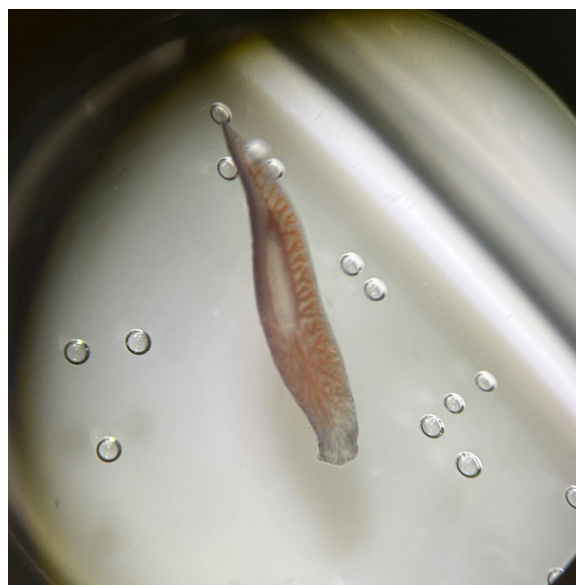
Eksperiment smo poskusili ponoviti samo s predhodno dvournno izpostavljenostjo etanolu, saj je ta prvič delovala najbolje. Ko smo osebke dodali v raztopino DMSO, so poginili skoraj takoj, tako da vedenjskih podatkov nismo dobili, smo pa opazili, da je tik pred smrtjo prišlo do povišanega izločanja sluzi. Osebke smo pustili v raztopini po tem, ko so poginili, in s tem ugotovili, da po smrti razpadajo v raztopini DMSO opazno hitreje, kot pa če so tik pred smrtjo ali tik po njej prestavljeni v vodo.

### 4.3 REZULTATI TRETJEGA POSKUSA

Pri 5 % koncentraciji DMSO pride pri *P. felina* do spremembe v premikanju takoj po izpostavitvi, osebki se ne premikajo več z drsenjem, ampak samo še z zvijanjem. Osebek, ki smo ga opazovali pod mikroskopom, je imel migetalk vidno poškodovane, plast migetalk je bila opazno tanjša. Nismo opazili povišanega izločanja sluzi, smo pa zabeležili zelo opazno spremembo barve pri osebkih, in sicer iz temno rjave v svetlo rjavo ali pa iz svetlo rjave v prosojno (odvisno od začetne obarvanosti osebkov). Osebki so se po petrijevki približno pet minut še premikali, čeprav samo s krčenjem in zvijanjem, zadnjih deset minut izpostavitve pa so ostali na istem mestu. Še vedno pa so se premikali, vendar samo s trzanjem in občasnimi konvulzijami, to premikanje pa je postajalo čez čas vedno manj intenzivno.



Slika 17: Osebek čisto na začetku izpostavitve 5 % DMSO (30x povečava). - 7. 2. 2024



Slika 18: Isti osebek po 25 minutah izpostavitve DMSO, koža je izgubila rjavo koloracijo (30x povečava). - 7. 2. 2024

## 5. DISKUSIJA

S prvim eksperimentom smo ovrgli prvo hipotezo, saj sta dva izmed osebkov poginila pri koncentraciji, ki je za *S. mediterranea* polovica  $LC_{50}$ . Tudi drugi eksperiment je to ovrgel, saj je bil pri eksperimentu čas do smrti krajši kot petnajst minut, še posebej pri ponovitvi; a do tega odstopanja pri ponovitvi bi lahko prišlo, tudi če raztopine DMSO ne bi dovolj premešali in bi bila koncentracija DMSO na dnu petrijevke večja. Prvi in drugi eksperiment nam pokažeta, da je *P. felina* na DMSO občutljivejša kot *Dugesia sp.* ali *S. mediterannea*. Druge hipoteze nam ni uspelo ne ovreči ne potrditi, saj pri prvem eksperimentu ni prišlo do opazne spremembe obarvanosti, pri tretjem eksperimentu pa so osebki poginili in do tega, da bi se jim povrnila prvotna barva, ni moglo priti. Kljub temu smo pokazali, da DMSO lahko vpliva na obarvanost vrtničarjev, vendar samo pod določenimi pogoji.

Tretjo in četrto hipotezo je najbolje potrdil prvi eksperiment, pri katerem je pri osebkih na površini kože prišlo do ran in do nagubanosti. Zanimivo je, da rane med izpostavitvijo in takoj po njej še niso nastale oziroma niso bile opazne, 24 ur po koncu izpostavitve pa so bile, medtem ko je bila nagubanost prisotna takoj. Nagubanost se je po koncu izpostavitve počasi izboljšala, pa tudi rane so se začele celiti, kar pomeni, da sta oba procesa reverzibilna. Na žalost nimamo primerjave celjenja podobnih ran pri osebkih, ki niso bili izpostavljeni DMSO, tako da ne moremo sklepati o tem, ali DMSO inhibira celjenje ali ne. Ker sta obe vrsti poškodbe oziroma deformacije vezani na epitel, sta medsebojno verjetno tudi povezani.

Tudi peto hipotezo sva potrdila ter za podporo obeh zbrala precej slikovnega materiala in videov. DMSO povzroči poškodbe tako epitela kot migetalk, kar prepreči drsenje vrtničarjev (to je sicer njihov primarni mehanizem premikanja). Zaradi tega osebki za premikanje uporabijo sekundarni mehanizem, tj. premikanje z mišicami. Ker DMSO vpliva tudi na delovanje mišic, pa osebki mišic ne morejo uporabiti pravilno, zato namesto premikanja s krčenjem in raztezanjem v določeno smer (kot pri ščetinarjih) pride do nenavadnega krčenja, zvijanja, trzanja in konvulzij.



Hipoteza, ki se osredotoča na mikroskopski nivo, na histologijo in morfološko tkivo, žalost nismo mogli potrditi ali ovreči, saj na nobenem inštitutu ali univerzi niso imeli časa, da bi nam pri izvedbi tega pomagali, naša šola pa zato nima primerne opreme. Osebkice smo fiksirali in shranili v 70 % etanolu na primerni temperaturi, kar pomeni, da lahko histološke raziskave naredimo tudi v prihodnosti.

Enako kot že predhodne raziskave smo ugotovili, da DMSO znatno vpliva na vedenje vrtinčarjev in da pri osebkicah pride do specifičnih vedenjskih odzivov: zvižanje, trzanje in nenavadno premikanje farinksa ter zmanjšana aktivnost, katerih intenzivnost je odvisna od koncentracije DMSO.

Poleg tega smo ugotovili, zakaj se osebkice, izpostavljeni višjim koncentracijam DMSO, nehajo premikati z drsenjem, kar do zdaj še ni bilo znano. Ugotovili smo tudi, da DMSO lahko vpliva na barvo in izločanje sluzi ter da povzroča pospešeno razpadanje mrtvih osebkic.

Do napak pri nalogi bi lahko prišlo zaradi veliko spremenljivk, ki jih je težko vse natančno spremljati in kontrolirati (npr. točna temperatura, natančni časi izpostavitve) in zaradi stresa, ki smo ga osebkicam povzročili z menjavanjem vode ter merjenjem odzivnosti. To bi lahko popravili tako, da bi nalogo opravili v čim bolj kontroliranem okolju in s še natančneje določenimi protokoli. Raziskovalno nalogo bi lahko izboljšali tudi s tem, da bi si že na začetku natančneje zastavili cilje naloge in da bi se eksperimentov lotili bolj sistematično, z več predhodnimi poskusi in s kalibriranjem eksperimentov, preden smo jih izvedli. Poleg tega bi bila raziskovalna naloga boljša, če bi imeli dostop do boljše opreme, saj bi nam to omogočilo histopatološke raziskave vpliva DMSO.

## 6. ZAKLJUČEK

To raziskovalno nalogo smo se odločili delati predvsem zaradi najinega zanimanja za biologijo in eksperimentiranje. Vrtinčarji so naju že od nekdaj zelo zanimali in sva si že dolgo želela eksperimentirati z njimi. Skozi raziskovalno nalogo sva se naučila veliko glede skrbi za vrtničarje in to znanje delila tudi s profesorji biologije na šoli, da bi lahko ta zanimiva bitja večkrat uporabili pri pouku biologije. Naučila sva se tudi natančnosti in pisanja znanstvenih člankov.

V nadaljevanju eksperimenta bomo vzorce osebkov, ki smo jih po izpostavitvi različnim koncentracijam DMSO fiksirali v 70 % etanolu, razrezali z mikrotomom, jih obarvali in opazovali pod mikroskopom. Tako bomo izvedeli več o vplivu DMSO na tkiva vrtničarjev.

## 7. POVZETEK

Planariji so družina ploskih črvov z odličnimi regeneracijskimi sposobnostmi. Zaradi tkiv, homolognih človeškim, so pogosto uporabljeni v toksikologiji in biomedicini. Dimetil sulfoksid (DMSO) je kemikalija, ki se pogosto uporablja v kriokonzervaciji in občasno v zdravstvu, v laboratoriju pa se uporablja tudi kot topilo za zdravila, netopna v vodi, ali kot prenašalec zdravil v telo. Vplivi na vedenje in nekateri vplivi na fiziologijo DMSO so že znani, vendar so slabo raziskani. Mehanizmi, s katerimi DMSO vpliva na organizme, pa so večinoma neznani. Ker je za izboljšavo kriokonzervacije glavna ovira ravno toksičnost DMSO, smo se jo odločili podrobneje raziskati z uporabo vrtničarjev vrste *Polycelis felina*. Osebkke smo izpostavili različnim koncentracijam DMSO v različnih časovnih obdobjih. Z opazovanjem osebkov in preizkušanjem njihove odzivnosti smo ugotovili, da DMSO vpliva na vedenje vrtničarjev, saj zmanjša njihovo odzivnost na mehanske dražljaje in inhibira gibanje. DMSO povzroča tudi nekatere morfološke in fiziološke spremembe, kot so sprememba barve in poškodbe povrhnjice. To smo ugotovili z opazovanjem osebkov po dolgotrajni izpostavitvi DMSO (24 ur) pri nižjih koncentracijah (pod LD50) in kratkotrajni izpostavitvi pri višjih koncentracijah. V eksperimentu smo dokazali, da je lahko DMSO za vrtničarje tudi smrten.

## 8. SUMMARY

Planaria, a type of flatworm, possess remarkable regenerative capabilities. These creatures are frequently utilized in toxicology and biomedicine due to their tissues being homologous to those of humans. Dimethylsulfoxide (DMSO) is a commonly used chemical in cryopreservation and, on occasion, in healthcare settings. It serves as a solvent for water-insoluble drugs and aids in drug delivery within the body. While some effects of DMSO on behavior and physiology are understood, much remains to be explored. The precise mechanisms through which DMSO impacts organisms are largely unidentified. Given that the primary challenge in enhancing cryopreservation techniques lies in the toxicity of DMSO, we opted to conduct a thorough experiment using *Polycelis felina*. Test subjects were exposed to varying concentrations of DMSO for different durations. Through observation and responsiveness testing, we discovered that DMSO alters the behavior of flatworms, diminishing their reaction to mechanical stimuli and impeding their movement. Additionally, DMSO induces certain morphological and physiological alterations, such as discoloration and epidermal damage. These effects were noted in subjects following prolonged exposure to lower concentrations of DMSO (below LD50) for 24 hours, as well as short-term exposure to higher concentrations. Our study has demonstrated that DMSO can prove fatal to planaria.

## 9. VIRI

1. Cracraft, J; Donoghue, M. J., *Assembling the Tree of Life* (Oxford: Oxford university press, 2004), 213 – 217. – 19. 2. 2024
2. Ivankovic M, Haneckova R, Thommen A, Grohme MA, Vila-Farré M, Werner S, Rink JC. Model systems for regeneration: planarians. *Development*. 2019 Sep 11;146(17):dev167684. doi: 10.1242/dev.167684. PMID: 31511248. – 20. 2. 2024
3. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Annotation Record for , DIMETHYL SULFOXIDE, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Retrieved February 21, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. – 21. 2. 2024
4. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 679, Dimethyl Sulfoxide. Retrieved February 21, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-Sulfoxide>. – 21. 2. 2024
5. Pagán OR, Rowlands AL, Urban KR. Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neurosci Lett*. 2006 Oct 30;407(3):274-8. doi: 10.1016/j.neulet.2006.08.073. Epub 2006 Sep 18. PMID: 16979295. – 20. 2. 2024
6. Rompolas P, Azimzadeh J, Marshall WF, King SM. Analysis of ciliary assembly and function in planaria. *Methods Enzymol*. 2013;525:245-64. doi: 10.1016/B978-0-12-397944-5.00012-2. PMID: 23522473. – 21. 2. 2024
7. Stevens AS, Pirotte N, Plusquin M, Willems M, Neyens T, Artois T, Smeets K. Toxicity profiles and solvent-toxicant interference in the planarian *Schmidtea mediterranea* after dimethylsulfoxide (DMSO) exposure. *J Appl Toxicol*. 2015 Mar;35(3):319-26. doi: 10.1002/jat.3011. Epub 2014 Jun 25. PMID: 24964768. – 21. 2. 2024
8. Yuan Z, Zhao B, Zhang Y. Effects of dimethylsulfoxide on behavior and antioxidant enzymes response of planarian *Dugesia japonica*. *Toxicol Ind Health*. 2012 Jun;28(5):449-57. doi: 10.1177/0748233711414609. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21976142. – 20. 2. 2024
9. Winstor L, Sluys R. Basic Histological Techniques for Planarians. *Methods Mol Biol*. 2018;1774:285-351. doi: 10.1007/978-1-4939-7802-1\_9. PMID: 29916162

## 10. ZAHVALA

Zahvaljujema se mentorici Klavdiji Jug, ki naju je podpirala skozi celotno obdobje raziskovanja in pisanja raziskovalne naloge. Prav tako se zahvaljujema Urški Zupanc, asistentki za biologijo in kemijo na Gimnaziji Velenje, za pomoč pri eksperimentih in nasvete. Zahvaljujema se tudi očetoma, ki sta pomagala pri prevozu in še posebej najinima mlajšima sestrama, Anji Železnik, ki je pomagala pri organizaciji, in Maruši Grudnik Pritržnik, ki je pomagala pri iskanju vrtnčarjev. Zahvaljujema se tudi Polonci Glojek za lektoriranje raziskovalne naloge.