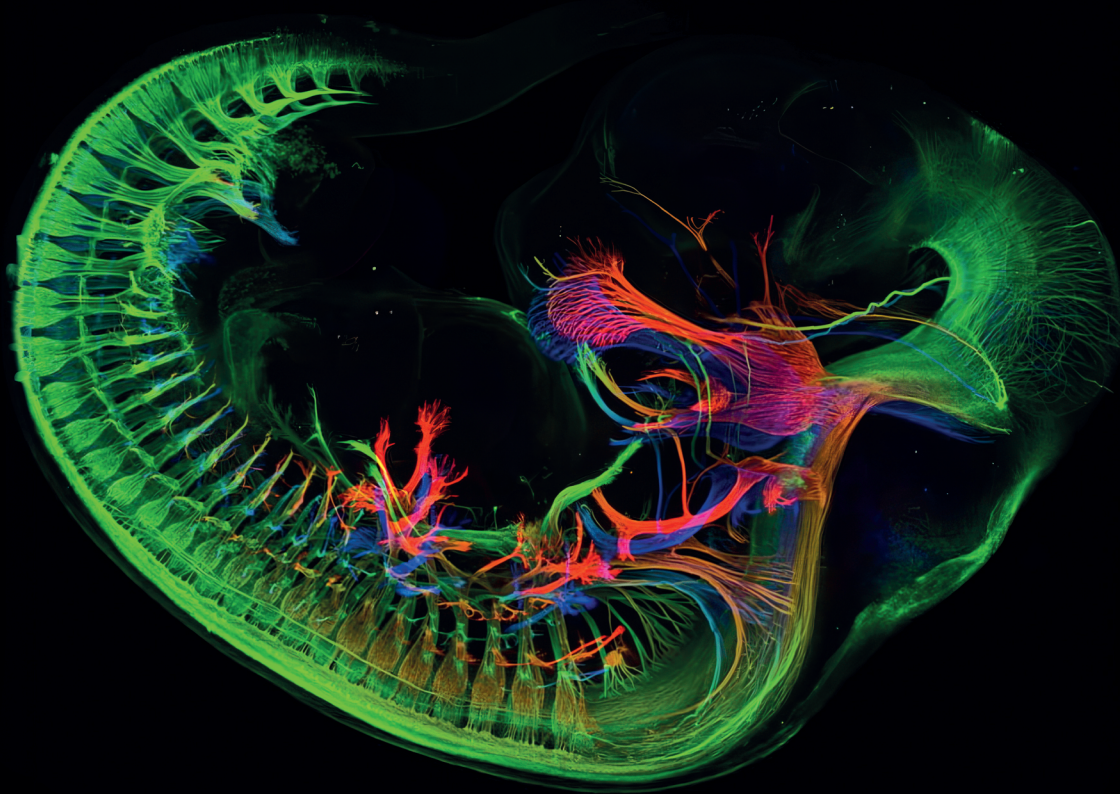


ДЖЕМАЛ МОТЕН • ЦВЕТЕЛИНА БАЦАЛОВА • БАЛИК ДЖАМБАЗОВ

РЪКОВОДСТВО

ЗА ЛАБОРАТОРНИ УПРАЖНЕНИЯ
ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО



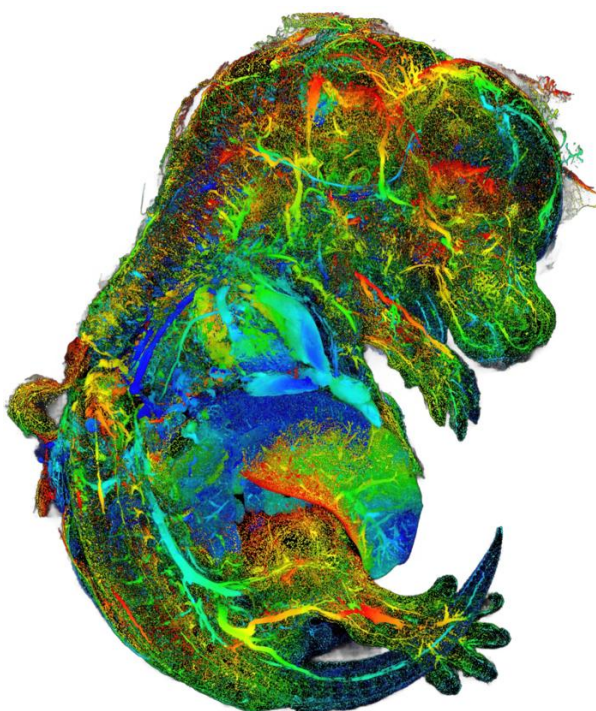
Пловдив, 2025

УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

ДЖЕМАЛ МОТЕН ● ЦВЕТЕЛИНА БАЦАЛОВА ● БАЛИК ДЖАМБАЗОВ

РЪКОВОДСТВО

ЗА ЛАБОРАТОРНИ УПРАЖНЕНИЯ
ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО



Пловдив, 2025

УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

Настоящото практическо ръководство по „Молекулярна биология на развитието“ е разработено за нуждите на студентите от специалност „Молекулярна биология“ в Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“. То е структурирано така, че да осигури интегриран подход, който успешно съчетава ключови теоретични познания с практически умения. В него са включени подробни протоколи за провеждане на експерименти с класическите моделни организми, използвани в биологията на развитието. Чрез него студентите ще придобият практически опит, който е от съществено значение за разбирането на основните принципи на развитието на организмите на молекулярно и клетъчно ниво.

© Джемал Мотен, Цветелина Бацалова, Балик Джамбазов – автори, 2025 г.

© Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2025 г.

ISBN 978-619-281-096-2 (pdf)

СЪДЪРЖАНИЕ

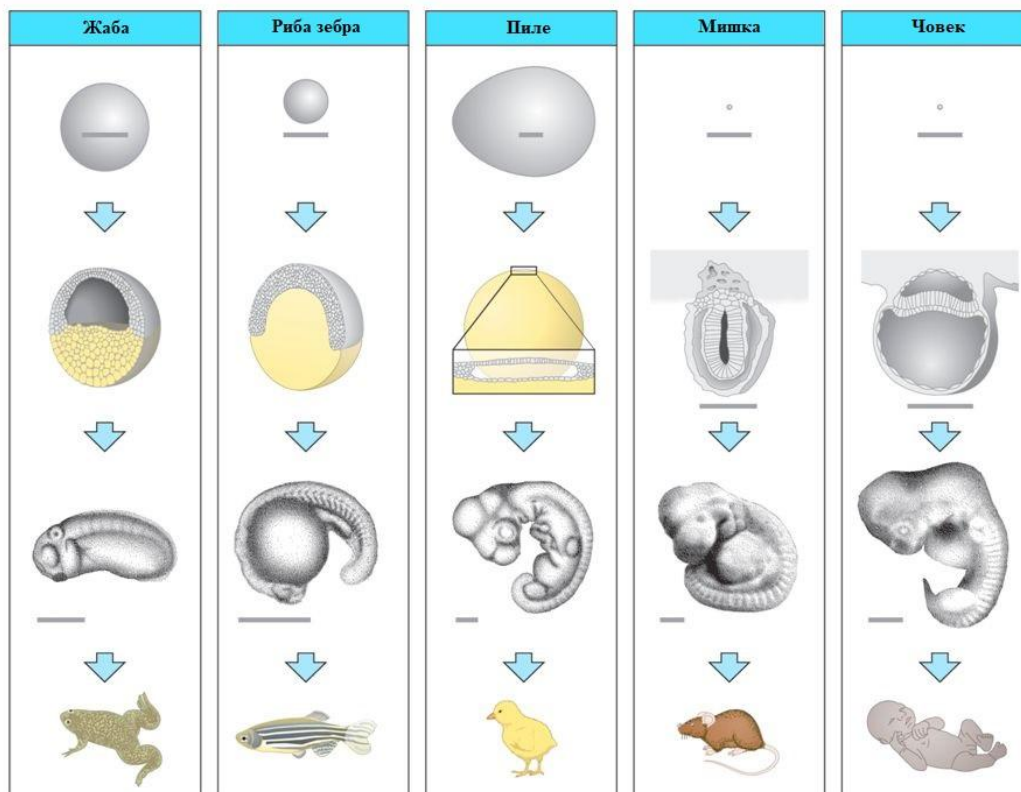
Използвани съкращения	- 4 -
Упражнение 1. Моделни организми в молекулярната биология на развитието	- 5 -
Упражнение 2. Идентифициране стадите на развитие при <i>Drosophila melanogaster</i> . Проучване влиянието на УВ радиацията върху ларви и възрастни от <i>Drosophila melanogaster</i> (I част)	- 12 -
Упражнение 3. Проучване влиянието на УВ радиацията върху ларви и възрастни от <i>Drosophila melanogaster</i> (II част)	- 17 -
Упражнение 4. <i>Caenorhabditis elegans</i> – анатомия и етапи на развитие. Наблюдение на див тип и мутантни форми <i>C. elegans</i>	- 21 -
Упражнение 5. Техника на култивиране на <i>C. elegans</i> в лабораторни условия.....	- 30 -
Упражнение 6. Регенерация. Изследване на възможността за регенерация при малочетинести и плоски червеи	- 36 -
Упражнение 7. Влияние на химични и физични тератогени върху ранното ембрионално развитие на <i>Danio rerio</i>	- 45 -
Упражнение 8. Ембрионално развитие при земноводни (<i>Xenopus laevis</i>). Изследване на възможността за индукция на партеногенеза при яйца от жаба (<i>Rana ridibunda</i>).....	- 52 -
Упражнение 9. Програмирана клетъчна смърт (апоптоза) при развитие на организма. Методи за детекция на апоптоза	- 59 -
Упражнение 10. Създаване на трансгенни моделни организми	- 66 -
ПРИЛОЖЕНИЕ	- 75 -
Литература	- 114 -

Използвани съкращения

- **AMPK** (AMP-activated protein kinase) – Киназа, която действа като основен регулатор на клетъчния енергиен метаболизъм
- **ATG** (Autophagy-related gene) – Гени, свързани с процеса на автофагия
- **ATG14L** – Протеин, участващ в автофагията, компонент на комплекса VPS34
- **Bcl-2** – Антиапоптотичен белтък, който инхибира програмираната клетъчна смърт
- **Beclin-1 (ATG6)** – Ключов регулатор на автофагията, част от клас III PI3-киназен комплекс
- **DMSO** – Диметилсулфоксид
- **Dmp53** – Протеин p53 от *Drosophila melanogaster*
- **ES клетки** (Embryonic stem cells) – Ембрионални стволови клетки
- **hpf** (hours post fertilization) – Часове след оплождане
- **MS** (Murashige and Skoog) – Хранителна среда за растителни тъканни култури.
- **mTOR** (mammalian target of rapamycin) – Ензимен комплекс, който регулира клетъчния растеж, делене и преживяване.
- **NGM** (Nematode Growth Medium) – Хранителна среда за отглеждане на нематоди
- **ПКС** – Програмирана клетъчна смърт
- **PPT** – Фосфинотрицин, хербицид, използван като селективен маркер в растителната трансформация
- **Rab GTPази** – Белтъци, участващи в транспорта на везикули вътре в клетката
- **RPM** – Обороти в минута
- **SNARE** – Белтъци, които участват в сливането на мембраните на везикулите
- **T1, T2** (transgenic generation) – Първо и второ поколение трансформанти
- **ULK1/2-ATG13-FIP200** – Протеинови комплекси, които са част от началните етапи на автофагията
- **UV светлина** – Ултравиолетова светлина
- **VPS34** – Клас III PI3-киназа, която има важна роля за формирането на автофагозоми

Моделни организми в молекулярната биология на развитието

Молекулярната биология на развитието е интердисциплинарна област, която изучава как генетичната информация управлява процесите на растеж, клетъчна диференциация и морфогенеза при многоклетъчните организми. Сложността на тези процеси изисква експериментални подходи, при които да се проследяват молекулните и клетъчните механизми в контролиран модел. От повече от 1 милион видове организми, съвременната биология на развитието използва много малък брой, които често се описват като моделни организми. Основната цел на използването на моделните организми е да се установи, как се осъществява развитието на тялото при човека. Поради тази причина има голям интерес към процесите, които се случват и при човека. Процесите свързани с развитието са толкова фундаментални, че има удивителни прилики в развитието на много различни организми (**Фигура 1**). Въпреки различните форми на възрастните, тези организми споделят сходни механизми за развитие. Яйцата и възрастните на тези гръбначни животни са съвсем различни по размер и форма, но по време на развитието на ембриона цялостният дизайн и план на тялото са много сходни. В това упражнение ще бъде обяснено защо изследователската дейност е насочена само към малък брой от видове, чрез сравняване на техните преимущества и недостатъци.

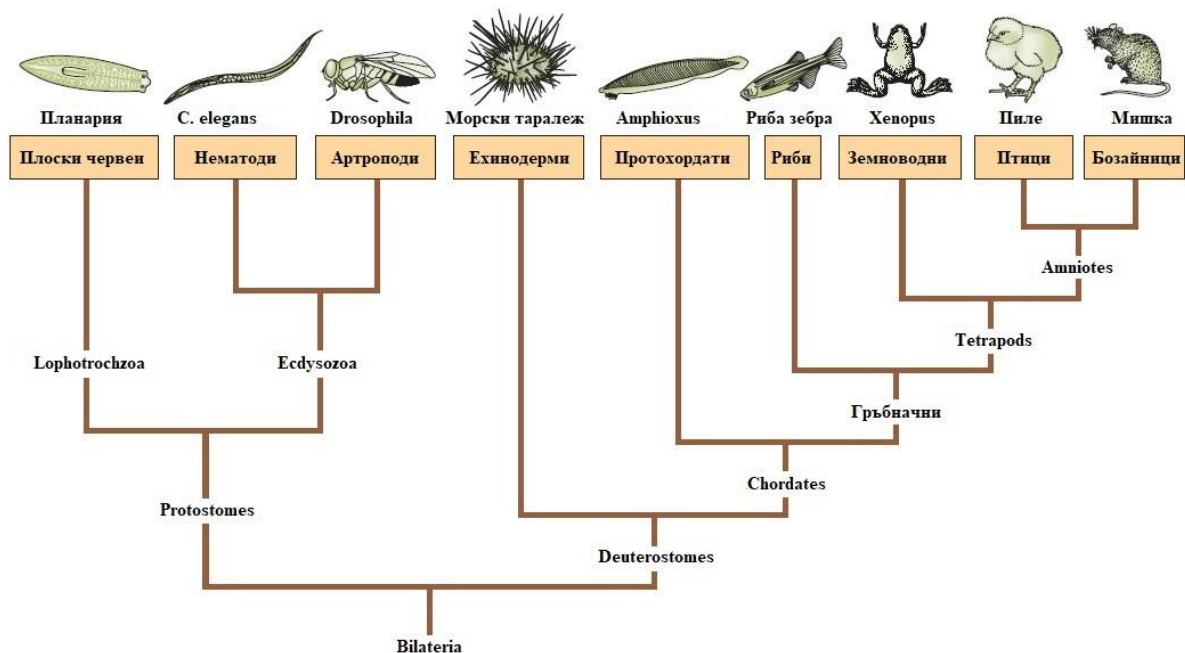


Фигура 1. Прилики в ембрионалното развитие на различни гръбначни животни
(*Scott F. Gilbert, 2016*)

„ГОЛЕМИТЕ ШЕСТ“

Най-често използваните моделни организми в биологията на развитието са: *Mus musculus*, *Gallus domestica*, *Xenopus laevis*, *Brachydanio rerio*, *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* известни още като „големите шест“. Други видове, като морският таралеж и планарията, също имат важна роля в редица изследвания (Фигура 2). Морският таралеж е най-важният организъм извън шестте, заема основно място преди молекулярната ера. За първи път е използван края на XIX век за наблюдаване на различните етапи от ембрионалното му развитие. Някои от предимствата на морския таралеж са лесното получаване на голям брой яйца, които могат да бъдат оплодени *in vitro*. Ембрионите на морските таралежи са прозрачни, което позволява да бъдат наблюдавани различните морфологични процеси *in vivo*. Недостатък на морския таралеж е прекалено дългия му жизнен цикъл, което го прави неподходящ за генетични изследвания. Микроманипулациите с този вид организъм също са много трудни.

Ще разгледаме някои от предимствата и недостатъците на отделните моделни организми. В шестте най-често използвани моделни организми имаме два безгръбначни вида и четири гръбначни. Гръбначните животни служат като основни модели за изследване на човешкото развитие и затова заемат преобладаваща позиция в изследванията, свързани с биологията на развитието.



Фигура 2. Филогенетично дърво, показващо еволюционните връзки между шестте основни моделни организма в биологията на развитието (Jonathan M.W. Slack, 2013)

БРОЙ ЕМБРИОНИ И ЦЕНА

Caenorhabditis elegans е абсолютен шампион по отношение на брой ембриони. Тъй като е хермафродит, един-единствен червей може да се самооплоди и да снесе около

300 яйца в рамките на краткия си няколкодневен жизнен цикъл. При наличието на мъжки индивиди и кръстосано оплождане броят им може да надхвърли 1000. Това, в комбинация с изключително краткия жизнен цикъл, позволява генерирането на голям брой ембриони за много кратко време. Подобна е ситуацията и с *Drosophila melanogaster*. Една женска плодова мушица може да снесе стотици яйца през живота си. Култивирането на хиляди мухи в малко пространство е лесно, което осигурява постоянен и практически неограничен достъп до ембриони. *Xenopus laevis* е класически пример за организъм, избран именно заради ембрионите си. Чрез хормонална индукция една женска жаба може да бъде стимулирана да хвърли хайвер от няколко хиляди яйца наведнъж. *Brachydanio rerio* (риба зебра) също предлага отлични възможности. Една двойка рибки може да бъде накарана да хвърля хайвер почти всяка сутрин, като произвежда от няколко десетки до няколкостотин ембриона. На противоположния полюс, с най-ограничен достъп до ембриони, са амниотите. При *Gallus domesticus* (домашно пиле) оплодени яйца могат да се набавят в големи количества и на ниска цена от търговски доставчици, което елиминира нуждата от отглеждане на възрастни индивиди в лабораторни условия. Това позволява работа със стотици ембриони, макар и не от едно и също чифтосване. Най-ограничен в това отношение е *Mus musculus* (домашна мишка). Като бозайник, тя има вътрешно оплождане и плацентарно развитие. Една женска ражда средно 5 до 10 малки. Въпреки че техники като индукция на суперовулация могат да увеличат броя на добитите яйцеклетки и ембриони за *in vitro* манипулации, количеството остава несравнимо по-малко от това при другите модели.

По отношение на разходите за отглеждане в лабораторни условия, подредбата на организмите е почти същата като тази по продуктивност на ембриони. Най-евтини за отглеждане са безгръбначните. *C. elegans* изисква само петрита с хранителна среда (агар) и слой бактерии (*E. coli*) за храна. Те се отглеждат при стайна температура или в стандартен термостат, заемат минимално пространство и не изискват почти никаква ежедневна поддръжка освен периодичното прехвърляне на културите. *Drosophila melanogaster* е малко по-скъпа в сравнение със *C. elegans*, но все пак изключително евтина. Отглежда се в малки стъклени или пластмасови епруветки с хранителна среда, състояща се от царевично брашно, захар, мая и агар. Разходите са пренебрежимо малки в сравнение с всеки моделен организъм от групата на гръбначните животни. В средния ценови клас се намират водните гръбначни. *Danio rerio* и *Xenopus laevis* изискват специализирани аквариумни системи. Тези системи са свързани с немалка първоначална инвестиция и текущи разходи за поддръжка. Необходимо е постоянно филтриране, аериране и контрол на температурата и химичния състав на водата. Храната им също е по-скъпа, а поддръжката на съоръженията изисква обучен персонал. Като цяло разходите са значително по-високи от тези за безгръбначните животни, но все още далеч по-ниски от тези за бозайниците. Безспорно най-скъпият за отглеждане модел е мишката, *Mus musculus*. Мишките трябва да се отглеждат в специализирани, строго контролирани помещения (вивариуми), които поддържат бариера срещу патогени. Това включва сложни системи за вентилация, стерилизация на клетки, храна, вода и постеля. Разходите за специализирана храна, ветеринарни грижи, както и за персонала, който трябва да спазва строги протоколи, са много високи. Освен това, отглеждането на

генетично модифицирани линии и криоконсервацията на ембриони и семенна течност добавят допълнителни, съществени разходи. Етичните регулации и административната тежест също допринасят за високата цена. Пилето, *Gallus domesticus*, заема специфична позиция. Ако една лаборатория трябва да отглежда индивиди за разплод, разходите биха били значителни. Практически обаче, почти всички лаборатории заобикалят този проблем, като купуват оплодени яйца от външни доставчици. По този начин разходът се свежда до цената на яйцата и поддръжката на инкубатори, което прави експерименталната работа с пилета значително по-евтина от тази с мишки.

ДОСТЪП И МИКРО МАНИПУЛАЦИИ

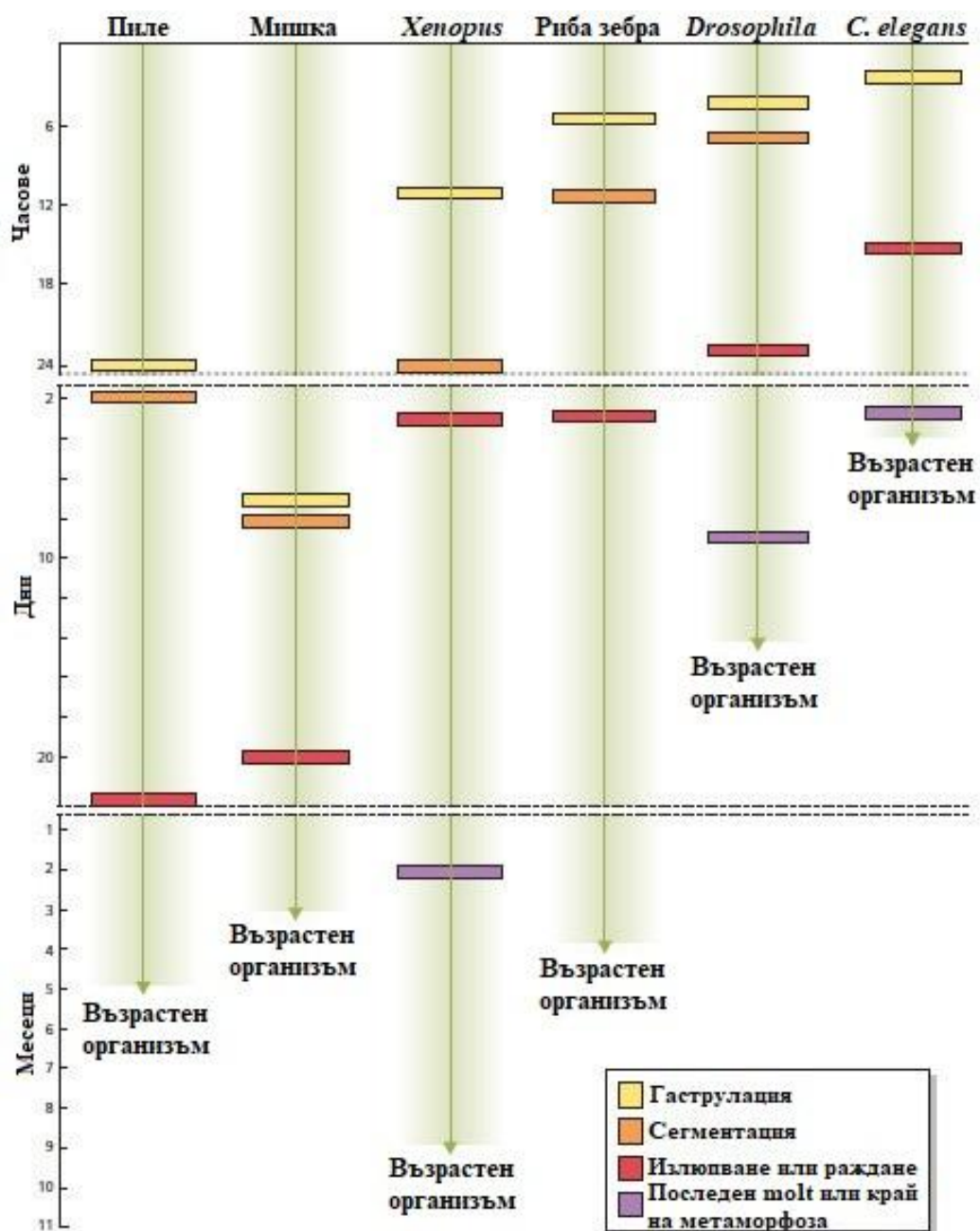
Моделните организми с външно развитие имат важно предимство. *Xenopus laevis* и *Brachydanio rerio* са първенци в това отношение. Развитие в вода позволява непрекъснато наблюдение без инвазивни процедури. *Gallus domesticus* също се включва в тази група, макар и с леки ограничения. Развитие е външно (в яйцето), което го прави лесно за наблюдение чрез изрязване на „прозорец“ в черупката. Безгръбначните *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* също се развиват външно и предлагат добра възможност за наблюдение и изследване. Напълно противоположен е случаят с *Mus musculus*. Като бозайник, развитието е изцяло вътрешно, в матката на майката. Това прави достъпа до ембрионите изключително труден, инвазивен и скъп.

Xenopus laevis и *Gallus domesticus* са класически модели в експериментална ембриология. Ембрионът на *Xenopus* е голям, а неговите клетки в ранните етапи (бластомерите) са огромни. Това го прави идеален за „cut-and-paste“ експерименти, които са в основата на биологията на развитието. Отстраняването на части от тъкан (експлант), присаждането им на друго място в същия или в друг ембрион (трансплантация) и наблюдаването на резултата е сравнително лесно. Големите клетки позволяват и лесно инжектиране на РНК, ДНК или флуоресцентни маркери в конкретни бластомери, за да се проследи тяхната съдба. Ембрионът на пилето е също подходящ за хирургически манипулации поради своя размер и достъпност до жълтъка. *Brachydanio rerio* е изключително добър модел за микроинжекции. Въпреки че е по-малък от този на жабата, ембрионът е много устойчив и прозрачен. Прозрачността на ембриона позволява директно наблюдение на ефектите от манипулацията върху развитието на живия организъм, което е огромно предимство. Трансплантацията на клетки между ембриони също е рутинна процедура. Микроманипулациите при *Mus musculus* са от съвсем различен характер. Те са съсредоточени почти изцяло върху предимплантационния ембрион (до стадий бластоцист). Инжектирането на ДНК в пронуклеуса на зиготата или инжектирането на генетично модифицирани ембрионални стволови клетки в бластоцист са основните техники за създаване на трансгенни и „нокаут“ мишки. Хирургическите манипулации на по-късни ембриони *in utero* са възможни, но са изключително специализирани и трудни. *Caenorhabditis elegans* предлага уникална форма на микроманипулация: лазерна аблация. Това е най-прецизната форма на „хирургия“ на клетъчно ниво, достъпна в който и да е животински модел. *Drosophila melanogaster* е може би най-неподходящият организъм за класически хирургически манипулации. Ембрионът е много малък и е обвит в здрави обвивки (хорион и

вителинова мембрана), които го правят труден за физически манипулации като рязане и присаждане. Основната форма на микроманипулация е инжектирането на ДНК в задния полюс на ембриона за създаване на трансгенни линии.

ГЕНЕТИКА И ГЕННИ КАРТИ

Едно от най-важните условия, за да бъде избран даден организъм за генетични изследвания е продължителността на неговия жизнен цикъл, тъй като той пряко определя колко бързо могат да се провеждат експерименти, изискващи кръстосване и отглеждане на няколко поколения (Фигура 3).



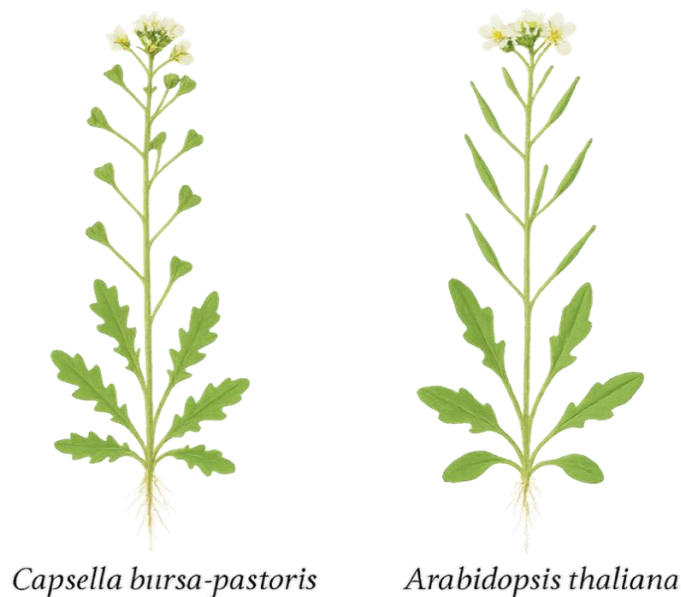
Фигура 3. Продължителност на жизненият цикъл на шестте най-често използвани в биологията на развитието моделни организми (Jonathan M.W. Slack, 2013)

Caenorhabditis elegans е абсолютният рекордьор. При оптимални лабораторни условия (около 25°C), жизненият му цикъл – от яйце до възрастен индивид, който сам снася яйца – е само 3 дни. *Drosophila melanogaster* е класическият генетичен модел именно поради своя бърз жизнен цикъл – при 25°C той отнема около 10 до 12 дни. Рибата зебра представлява отличен компромис между филогенетична близост до човека (като гръбначно) и скорост на развитие. Тя достига полова зрялост за около 2 до 3 месеца. Това е значително по-бързо от останалите гръбначни модели и е една от основните причини за нейната нарастваща популярност. На другия полюс са бозайниците и птиците. *Mus musculus* достига полова зрялост за около 8 до 10 седмици. Въпреки че това е бързо за бозайник, то е в пъти по-бавно от безгръбначните. Създаването на хомозиготна „нокаут“ линия мишки чрез стандартни кръстоски може да отнеме повече от година. *Gallus domesticus* достига полова зрялост за около 6 месеца. Най-неподходящ в това отношение е *Xenopus laevis*. Африканската ноктеста жаба има изключително бавен жизнен цикъл, като достига полова зрялост чак след 1 до 2 години.

Прецизно аотираната геномна карта е от голямо значение за съвременната биология, защото позволява надеждното идентифициране на гени и изясняването на тяхната функция и еволюция. Всички моделни организми вече разполагат с почти напълно секвенирани геноми и генни карти с висока резолюция.

МОДЕЛНИ РАСТЕНИЯ

Развитието при растенията се различава фундаментално от това при животните. Организацията на развитието поне при цъфтящите растения е силно консервативна в различните видове. Едно от първите използвани моделни растения е *Capsella bursapastoris* (обикновена овчарска торбичка) (Фигура 4), основно се е използвало за описателни проучвания.



Фигура 4. Растителни моделни организми, използвани в биологията на развитието.
(Lanisha Butterfield, 2010)

Растението *Arabidopsis thaliana* (Фигура 4) се е превърнало в основен моделен организъм за редица биологични системи (включително и за развитието), благодарение на по-добрите възможности за генетичен анализ и манипулация, което позволява комбинирани клетъчни, генетични и молекулярни подходи. Малкият размер на неговия геном и фактът, че то е диплоидно растение, прави *Arabidopsis thaliana* полезно за генетично картиране и секвениране (много растения са полиплоидни, правейки мутационният анализ труден). С около 135 Mbp и пет хромозоми, *Arabidopsis thaliana* има един от най-малките геноми сред растенията. Жизненият цикъл е около 6 седмици. Освен *Arabidopsis thaliana* често се използва друго двусемеделно растение като моделен организъм *Antirrhinum majus* (кученце, лъвска муцунка).

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Сравнете най-често използваните в молекулярната биология на развитието моделни организми на базата на критериите посочени в Таблица 1. Отбележете предимствата и недостатъците на всеки един от тях.

	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Brachydanio rerio</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Gallus domestica</i>	<i>Mus musculus</i>
Брой ембриони						
Цена						
Достъп						
Микроманипулации						
Генетика						
Генна карта						

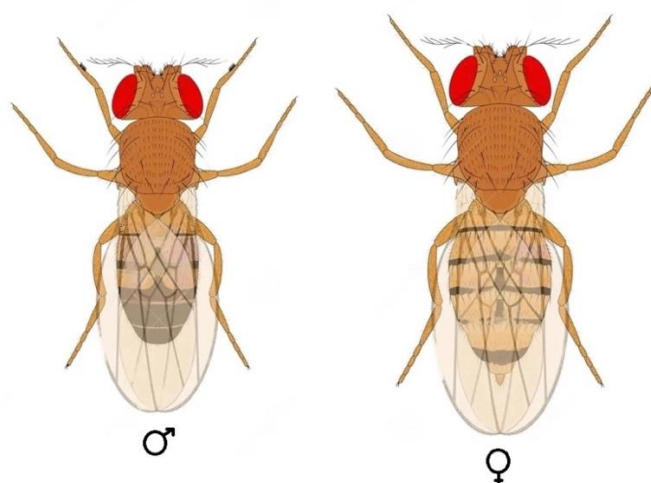
Задача 2. Етика на работа с животински модели – „До каква степен е оправдано използването на животински модели в биомедицинските изследвания?“ Представете научни и етични аргументи „за“ и „против“.

Задача 3. Направете сравнителен анализ на предимствата и недостатъците на съвременните алтернативи на експериментите с животни (органоида, клетъчни култури, компютърни модели, микродозирание при хора) спрямо традиционните животински модели.

Идентифициране стадите на развитие при *Drosophila melanogaster*. Проучване влиянието на УВ радиацията върху ларви и възрастни от *Drosophila melanogaster* (I част)

ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА

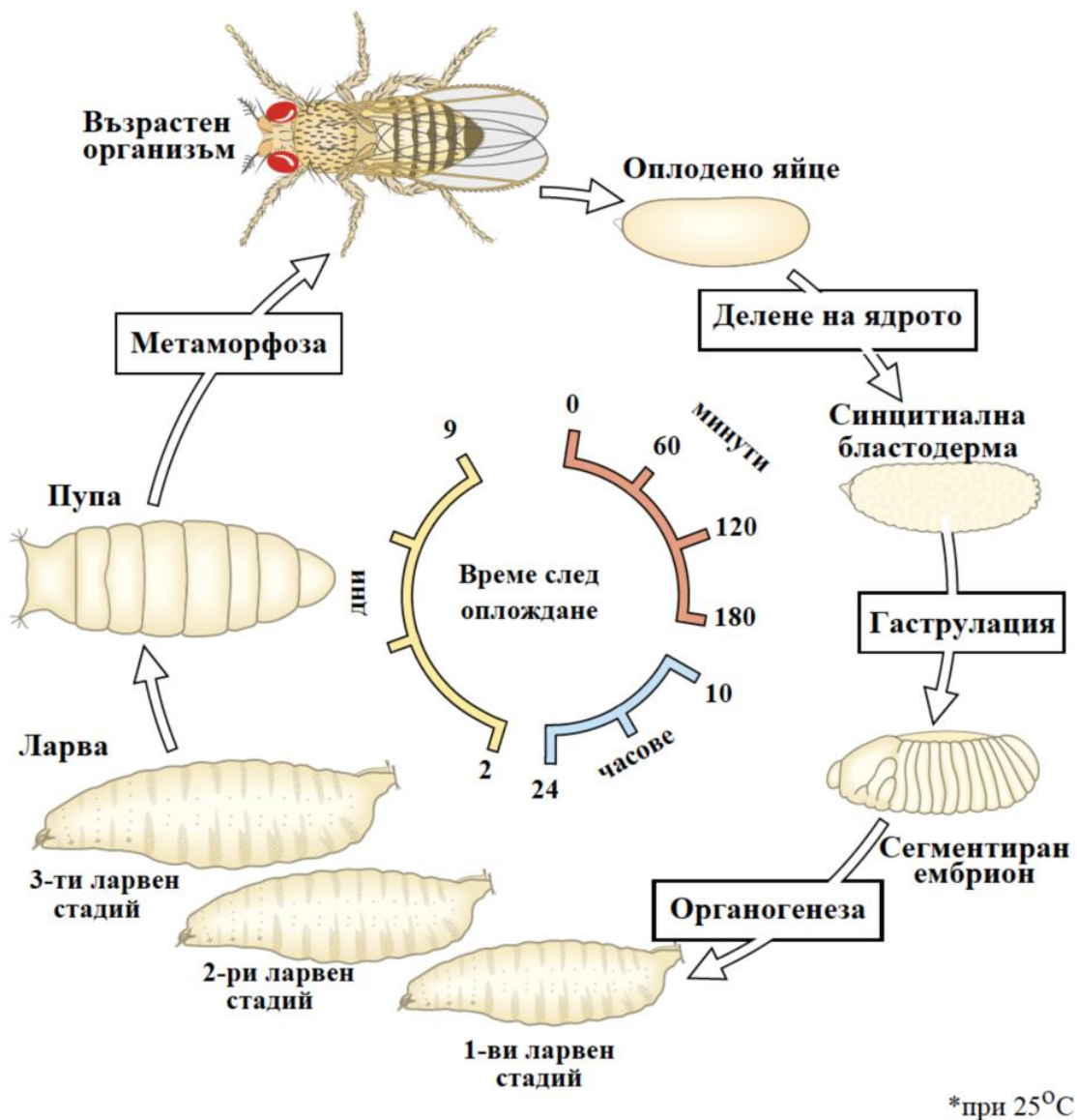
Родът *Drosophila* обхваща приблизително 1500 вида дребни двукрили насекоми, известни популярно като плодови мушици. Представителите му са с дължина на тялото около 3 mm и се характеризират с ясно изразен полов диморфизъм (**Фигура 1**). При вида *Drosophila melanogaster* мъжките индивиди са с по-малки размери в сравнение с женските, като коремчето им е цилиндрично и завършва с тъп край. При женските коремчето е по-голямо, закръглено и завършва с по-остър връх. Допълнителен белег за разграничаване е наличието на тъмно оцветено петно, формирано от няколко от най-задните абдоминални сегменти при мъжките, което се вижда с просто око. Женските притежават осем абдоминални сегмента, докато при мъжките те са шест. Характерна морфологична особеност е т.нар. полов гребен – структура, разположена в дисталната част на най-горния сегмент на предните крака на мъжките, изградена от множество хитинови четини, отсъстваща при женските. *D. melanogaster* е един от най-широко използваните моделни организми в генетиката и биологията на развитието, благодарение на сходството на основните генетични механизми с тези при по-висшите организми, включително човека. Възрастните дрозофили могат да живеят до 10 седмици. Оплождането е вътрешно и сперматозоидите се съхраняват в семенна торбичка в женската. Женските достигат своя пик в снасянето на яйца между 4-ти и 7-ми ден от тяхното формиране. По това време те снасят между 50 – 70 яйца на ден.



Фигура 1. Полов диморфизъм при *Drosophila melanogaster* (T. A. Dettlaff & S. G. Vassetzky)

ЖИЗНЕН ЦИКЪЛ

Жизненият цикъл на *Drosophila* е сравнително кратък – продължителността му е приблизително две седмици (Фигура 2). Той включва четири основни стадия на развитие: яйце (ембрионален етап), ларва, какавида (пупа) и възрастен индивид (имаго). Продължителността на отделните етапи е силно зависима от температурата на средата, в която се отглеждат мухите. При температура 20°C преходът от яйце до ларва продължава средно около 8 дни, докато при 25°C този период се съкращава до приблизително 5 дни. Фазата на пупа при 20°C трае около 6,3 дни, а при 25°C – около 4,2 дни. В резултат на това, при оптимална температура от 25°C целият жизнен цикъл може да продължи приблизително 10 дни, докато при 20°C са необходими около 15 дни. Отглеждането на *Drosophila* изисква поддържане на температура в диапазона 20 – 25°C. Продължителното излагане на температури над 30°C може да предизвика стерилитет или смърт на индивидите, докато по-ниските температури водят до намалена жизненост и значително удължаване на жизнения цикъл.



Фигура 2. Жизнен цикъл на *Drosophila melanogaster* (Lewis, 2019)

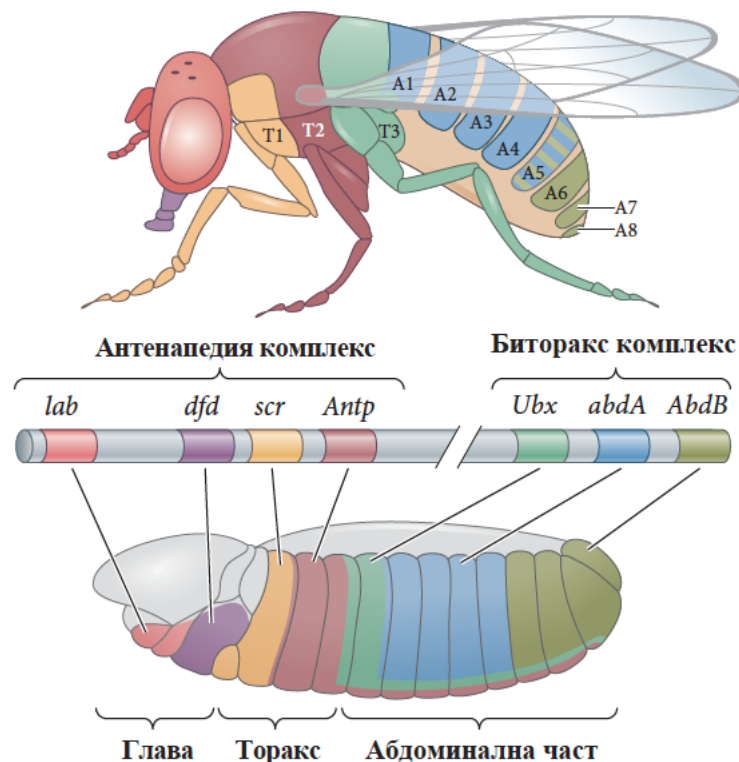
Яйцата са приблизително 0,5 мм и приличат на оризови зърна. Яйцето е обвито с тънка вътрешна обвивка и външна твърда наречена хорион, в anteriорният край на яйцето има два филамента. Навлизането на сперматозоидите в яйцето става през микропил разположен в anteriорния край. Микропилът позволява на сперматозоидите да преминават през него един по един и предотвратява полиспермията при *Drosophila*. Много сперматозоиди могат да навлязат в едно яйце, но само един участва в оплождането. ДНК на мъжките и женските пронуклеуси се реплицира преди пронуклеусите да са се слели и след сливането на пронуклеусите майчините и бащините хромозоми остават разделени до края на първата митоза.

В яйцето кариокинеза (ядреното делене) протича без цитокинез (клетъчно делене), така се създава синцитиум, единична клетка с много ядра, намиращи се в обща цитоплазма (**Фигура 3**). 256 ядра се формират в резултат на осем ядрени деления със средна продължителност от 8 минути всяко. Тази бърза скорост на делене се постига чрез редуващи се S (репликация на ДНК) и M (митоза) периоди в отсъствието на G₁ (пресинтетичен) период на клетъчния цикъл. По време на деветия цикъл на делене приблизително пет ядра достигат повърхността на posteriорния край на яйцето. Тези ядра се затварят от клетъчни мембрани и образуват полюсните клетки. От полюсните клетки произлизат зародишните клетки, от които се развиват гаметите – сперматозоиди и яйца – във възрастното насекомо, докато от бластодермата произлизат соматичните клетки на ембриона. В десети цикъл на ядрено делене ядрата мигрират към периферията на яйцето и деленето продължава, макар и с прогресивно по-бавна скорост. По време на тези етапи на ядрено делене ембрионът се означава като синцитиална бластодерма, тъй като не съществуват други клетъчни мембрани освен тази на самото яйце. Въпреки че ядрата се делят в обща цитоплазма, самата цитоплазма далеч не е еднородна. Формира се морфогенен градиент, който е важен за оформянето на тялото и формирането на различните органи и тъкани. Когато ядрата достигнат периферията на яйцето по време на десетия цикъл на ядрено делене, всяко ядро се огражда от микротубули и микрофиламенти. Ядрата и свързаните с тях цитоплазмени острови се наричат енергиди. След 13-ят цикъл на делене (около 6000 ядра), клетъчната мембрана се вгъва навътре между ядрата, като в крайна сметка разделя всички енергиди в отделни клетки. Така се формира клетъчната бластодерма, тя е изградена от един слой от клетки, които се трансформират в многослойна структура, в процес, познат като гаструлация. По време на гаструлацията се образува ендодерма, мезодерма и ектодерма. От ендодермата произлизат вътрешностите (черва, стомах), от мезодермата произлизат мускулите и сърцето, а от ектодермата се развива епидермиса и централната нервна система. След 24 часа от яйцата се излюпват ларви.



Фигура 3. *Drosophila melanogaster* – ранна ембриогенеза (Lewis, 2019)

Ларвите са бели, пълзят във влажна хранителна среда хранейки се постоянно, което води до бърз растеж. В последният стадий ларвата може да достигне до 4.5 мм. Ларвите преминават през три етапа: първият етап трае 24 часа, следващия – също 24 часа и третият ларвен етап продължава 48 часа. Ларвата има 12 сегмента: 1 главов сегмент, 3 торакални и 8 абдоминални (**Фигура 4**). Когато са готови за преминаване в какавида, ларвите в третия етап напускат средата и се прикрепят към стените на съда в който се намират. Стената на тялото е мека и еластична, изградена отвън от кутикула, а отвътре – от епидермис. Голям брой чувствителни органи са разположени равномерно по дължината на цялото тяло.



Фигура 4. Сравнение на сегментирането на ларви и възрастни. При възрастните трите гръдни сегмента могат да бъдат разграничени по техните придатъци: T1 (проторакс) има само крака; T2 (мезоторакс) има крила и крака; T3 (метоторакс) има халтери (не се виждат) и крака (Gilbert, 2018)

Какавидите са неподвижни и са първоначално меки и бели, но накрая се втвърдяват и стават кафяви. За период от 4 дена, ларвните тъкани се разрушават и тъканите на възрастния организъм се формират. Излизането на имагото е белег за край на този етап от индивидуалното развитие. Мъжките мухи са сексуално активни няколко часа след като се появят (около 8 ч.). Женските нямат зрели яйца до 2 дена след появяването им. По време на развитието, строго контролирана генетична регулация осъществява формирането на тялото и индивидуални тъкани и органи.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Изследване на наследствените ефекти от ултравиолетова радиация върху *Drosophila melanogaster* (възрастни индивиди и ларви).

Цел на изследването: Да се установи и оцени мутагенният потенциал на различни дози (време на експозиция) ултравиолетова радиация, приложена върху ларви и възрастни индивиди на *Drosophila melanogaster*, чрез анализ на фенотипните промени и виталитета в първото поколение (F1). Сравнението между двата стадия при различни експозиционни времена позволява оценка на стадийно-специфичната чувствителност към УВ облъчване.

Необходими материали:

- Култура от *Drosophila melanogaster* (1 колба с активни индивиди от див тип)
- 50 мл стерилни пластмасови епруветки с хранителна среда (10 броя)
- Диетилов етер
- Дисекционен микроскоп
- UV лампа
- Памучни тампони
- Морилки
- Пинсети

Методика

1. Подготовка и етикетиране

- Етикетирайте 10-те пластмасови епруветки с хранителна среда, обозначавайки времето на облъчване (2, 3, 4, 5 или 6 минути) и съответния стадий (ларви или възрастни).

2. Изолиране на индивиди

- От културата с *Drosophila melanogaster* изолирайте по 7 мъжки и 7 женски индивида за всяка епруетка. Използвайте диетилов етер за временно обездвижване, за да се улесни прехвърлянето.

3. Ултравиолетова експозиция

- Разположете епруетките на фиксирано разстояние от източника на UV радиация, осигурявайки идентични условия за всички проби.
- Облъчете всяка епруетка за времето, съответстващо на етикета.

4. Отглеждане и мониторинг

- Поставете облъчените епруетки в контролирана среда с температура между 20 – 25°C.
- Премахнете родителските индивиди (P поколение) след 3 – 5 дни, за да се фокусира наблюдението върху F1 поколението.

Проучване влиянието на УВ радиацията върху ларви и възрастни от *Drosophila melanogaster* (II част)

Ултравиолетовата (UV) радиация е форма на електромагнитно излъчване, което носи достатъчно енергия, за да предизвика химични реакции и да увреди биологични молекули, включително ДНК. Това я прави силен мутаген за всички живи организми, включително и за *Drosophila melanogaster*. Ефектите на UV радиацията върху *Drosophila* варират в зависимост от стадия на развитие и дозата на облъчване. UV спектърът обхваща диапазона от 100 до 400 нанометра (nm) и условно се разделя на три основни поддиапазона (UV-A, UV-B и UV-C), които имат различни биологични ефекти. UV-A (315 – 400 nm) прониква най-дълбоко и действа предимно индиректно чрез фотоиндуцирани реактивни кислородни радикали (ROS), които увреждат ДНК, липиди и белтъци. Тя е основна причина за фотостареенето (бръчки, отпусната кожа, пигментни петна). Допринася за развитието на рак на кожата. Подразделя се на UV-A1 (340 – 400 nm) и UV-A2 (315 – 340 nm). UV-B (280 – 315 nm) прониква в епидермиса на кожата, но не достига дермата. Основната причина за слънчево изгаряне (еритем). Директно се абсорбира от ДНК и РНК, причинявайки специфични увреждания. UV-B е отговорен за синтеза на витамин D в кожата, но също така е и главният фактор за развитието на повечето видове рак на кожата. UV-C (100 – 280 nm) има изключително силно мутагенно и унищожително действие върху живите клетки. Дължината на вълната около 254 nm съвпада с пика на абсорбцията на нуклеиновите киселини (ДНК и РНК), което го прави изключително ефективен за тяхното увреждане. Поради тази причина UV-C се използва за стерилизация на въздух, вода и повърхности в болници, лаборатории и индустрията.

МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА UV РАДИАЦИЯТА

Основният механизъм на увреждане от UV радиацията (особено UV-B и UV-C) е директната абсорбция на енергия от ДНК молекулата. Това води до образуване на димери на пиримидиновите бази, най-вече тиминови димери (циклобутанови пиримидинови димери). Тези димери нарушават нормалната структура на ДНК двойната спирала, което възпрепятства правилното протичане на процесите на репликация и транскрипция. Клетките имат механизми за поправка на ДНК уврежданията, като например ексцизионна репарация на нуклеотиди (NER). Ако обаче увреждането е прекалено голямо или механизмите за поправка не функционират ефективно, мутациите се запазват в генома. РНК, подобно на ДНК, абсорбира UV-C/UV-B, образувайки урацил димери или оксидативни увреждания (UV-A). Тя е почувствителна поради еднOVERижната си структура. Протеините също абсорбират UV светлина, главно поради наличието на ароматни аминокиселини като триптофан и тирозин, които имат пик на абсорбцията около 280 nm (в UV-B диапазона). UV-A лъчите генерират свободни радикали, които окисляват аминокиселините, което променя

структурата и функцията на протеина. По-енергийното UV-B и UV-C лъчение може директно да разкъса пептидните връзки или да доведе до образуване на кръстосани връзки между протеини. Липидите, особено ненаситените мастни киселини в клетъчните мембрани, са основна мишена на оксидативния стрес, индуциран предимно от UV-A. Свободните радикали атакуват двойните връзки в мастните киселини, предизвиквайки верижна реакция, която уврежда клетъчните мембрани.

ЕФЕКТИ ВЪРХУ РАЗЛИЧНИТЕ СТАДИИ ОТ ЖИЗНЕНИЯ ЦИКЪЛ

Ранните стадии на яйцата са силно податливи на UV радиация (UV-B и UV-C), тъй като клетките се делят бързо и нямат достатъчно развити механизми за поправка на ДНК. Облъчването в този стадий може да доведе до висока смъртност на ембрионите и до множество соматични и летални мутации. Ларвите са по-устойчиви от яйцата, тъй като техните клетки имат по-добри репарационни механизми. Ларвен стадий L2–L3 съдържа активно делящи се имагинални дискове (примордиите на възрастните органи). UV-B и UV-C предизвиква в тях силен ДНК-стрес, фосфорилиране на хистон H2Av, Dmp53-медирана апоптоза и последваща компенсаторна пролиферация. Резултатът са соматични мутации, видими в очи и крила на възрастните. Какавидите са относително защитени, тъй като какавидата е покрита с твърда обвивка, която поглъща част от радиацията. Въпреки това, облъчването може да засегне клетките, които формират възрастните структури (имагинални дискове), което да доведе до морфологични аномалии. Облъчването на възрастни мухи е най-често използваният метод за индукция на мутации в експериментите. То засяга най-вече зародишната линия (клетките, които формират гаметите).

ФЕНОТИПНИ ПРОЯВИ НА МУТАГЕНЕЗАТА

Цветът и формата на очите са едни от най-често изследваните мутантни белези при *Drosophila*, тъй като се контролират от множество гени. Мутации, предизвикани от UV облъчване, могат да засегнат гените, отговорни за синтеза на пигменти (напр. еритроптерин и двуаденин). Това води до промени в цвета на очите. Мутации в гена *white (w)* водят до фенотип „white eye“ (бели очи), тъй като се блокира транспорта на всички очни пигменти в клетките на окоето. Мутации в други гени могат да доведат до фенотипи като „apricot“ (кайсиеви), „eosin“ (еозинови) или „brown“ (кафяви) очи. Размерът, формата и венацията на крилата също са силно податливи на мутации, предизвикани от UV радиация. Мутациите засягат гени, отговорни за развитието на имагиналните дискове, от които се формират крилата. *Vestigial* – води до силно редуцирани, закърнели крила, които са нефункционални. *Apterous* – причинява пълна липса на крила. *Cut* – характеризира се с назъбени ръбове на крилата. Мутациите, засягащи развитието на тялото, могат да доведат до промени в неговата форма, сегментация и цвета. Мутации в гени, контролиращи ранната сегментация на ембриона, могат да доведат до липса на определени сегменти или до дублирането им. Мутации в гени като „ebony“ или „yellow“ променят цвета на хитиновата обвивка от нормалния жълтеникаво-кафяв до черен.

ВЛИЯНИЕ НА ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТТА НА ОБЛЪЧВАНЕ

Броят на мутациите е правопрпорционален на дозата на облъчване, която се определя от интензитета на UV източника и времето на експозиция. При кратки облъчвания се получават по-малко ДНК увреждания, които могат да бъдат поправени от клетъчните механизми. Това води до по-нисък процент на мутации, но и до по-висока преживяемост на индивидите. Продължителното облъчване води до натрупване на множество ДНК увреждания, които са непоправими. Това води до висок процент на летални мутации, което от своя страна води до смъртност на индивидите и сериозни морфологични аномалии.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Анализ на фенотипните прояви на мутагенезата при *Drosophila melanogaster* след облъчване с UV-C радиация.

Цел на изследването: Отчитане на фенотипните прояви на мутагенезата при *Drosophila melanogaster* след експериментално облъчване с UV-C радиация. Чрез сравнение на морфологични изменения – в структурата на тялото, крилата, очите и пигментацията.

Необходими материали:

- 50 мл пластмасови епруветки
- Диетилов етер
- Дисекционен микроскоп
- Четка за пикиране
- Памучни тампони
- Морилки
- Пинсети

Методика за отчитане на мутациите

5. Сортиране на индивидите

- Прехвърлете всички мухи от облъчените индивиди в нови епруветки и ги надпишете с маркер.
- Използвайте диетилов етер за временно обездвижване.

6. Фенотипно отчитане

- Под микроскоп, внимателно преглеждайте всяка муха, като използвате четката за пикиране, за да я премествате и да я наблюдавате от всички страни.

7. Отчитане на мутациите (Приложение 1)

- **Очи:** Проверете за промени в цвета (напр. white, apricot, brown) или формата.
- **Крила:** Наблюдавайте за промени в размера и формата (напр. vestigial – закърнели, apterous – без крила), или във венацията.

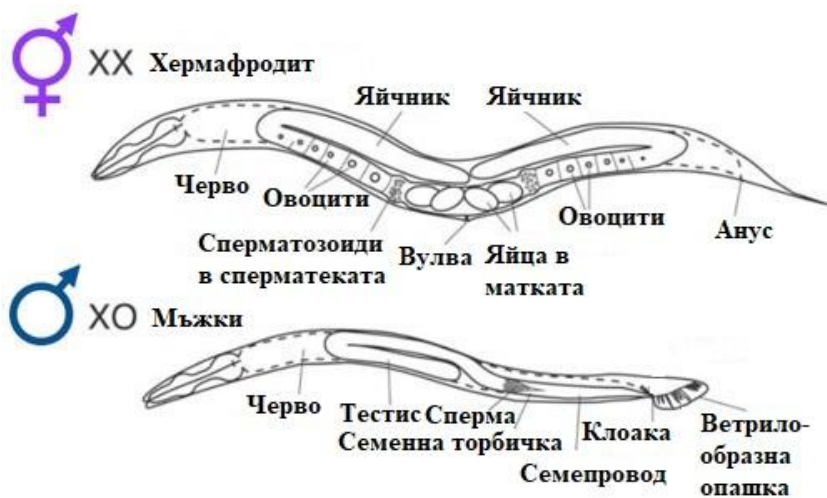
- **Тяло:** Проверете за промени в цвета на тялото (напр. ebony – черно тяло, yellow – жълто тяло) или аномалии в сегментацията и структурата на косъмчетата.
- **Антенки, крайници и други придатъци:** Наблюдавайте за дублиране, редуциране или липса на структури.

8. Документиране на резултатите

- Запишете всички открити мутации, като използвате таблица. Таблицата трябва да съдържа колони за:
 - **Експериментална група:** (форма и време на облъчване).
 - **Вид на мутацията:** (напр. „vestigial wings“).
 - **Брой на индивидите:** (напр. „5“).
 - **Пол:** (за да се проследи дали мутацията е свързана с пола).

Caenorhabditis elegans* – анатомия и етапи на развитие. Наблюдение на див тип и мутантни форми *C. elegans

Caenorhabditis elegans е малък, свободноживеещ почвен нематод, който от 60-те години на XX век се използва като моделен организъм в биологията на развитието. *C. elegans* се характеризира с висока метаболитна активност, кратък жизнен цикъл и висока плодовитост, което го прави изключително удобен за експериментални изследвания. Той е най-добре проученото животно, тъй като локализацията и произходът на всяка клетка в ембриона, ларвата и възрастния организъм са известни. Геномът на *C. elegans* е един от първите напълно секвенирани геноми на многоклетъчен организъм. Той съдържа приблизително 19 099 гена, разположени на 6 хромозоми (пет автозоми и една полова хромозома). Идентифицирани са над 2000 гена, чиято мутация води до смърт. Съществува и възможност за дългосрочно съхранение на щамове чрез криоконсервация в течен азот. Недостатък на *C. elegans* са малкият размер на яйцата и плътната им обвивка, които правят микро манипулациите с тях много трудни. По отношение на пола, *C. elegans* съществува в две форми: хермафродити (XX) и мъжки индивиди (XO) (Фигура 1.).

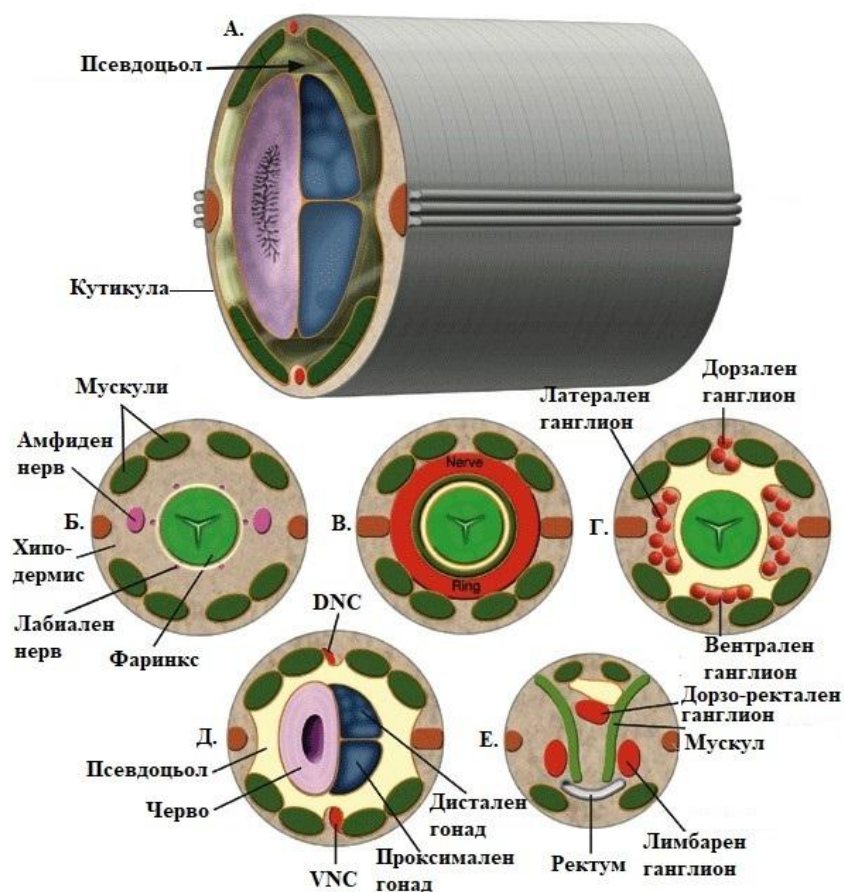


Фигура 1. Структура на хермафродит и мъжки *C. elegans*

Хермафродитите са самооплождащи се индивиди, които притежават две X-хромозоми. Самооплождането води до генетично идентично потомство, което е особено полезно за поддържане на хомозиготни линии. Мъжките се получават много рядко (0,1%) от хермафродитна зародишна линия. При кръстосване обаче честотата на мъжките в поколението може да достигне над 50%. Интересно е, че високата температура увеличава вероятността за възникване на мъжки индивиди, като по този начин може да се индуцира смесено потомство. Мъжкото оплождане облекчава изолирането и поддържането на мутантни щамове. Мутантни форми се създават лесно чрез химическа мутагенеза или йонизираща радиация.

АНАТОМИЯ

Caenorhabditis elegans е организъм с относително проста, но изключително добре дефинирана анатомия, която се е превърнала в ключов фактор за неговия успех като моделен организъм за изследване на процесите на развитие. Тялото му е цилиндрично, несегментирано и заострено в краищата, с дължина около 1 mm при възрастния индивид. Той е покрит от специфична външна обвивка – кутикула, която заедно с хиподермата и мускулатурата изгражда основната соматична стена и огражда телесната кухина – псевдоцелома (псевдоцъол) (Фигура 1 и Фигура 2). Псевдоцъолът съдържа вътрешните органи, които „плуват“ свободно в течност, изпълваща кухината. Кутикулата е сложна, многослойна екстрацелуларна структура, секретирана от хиподермата. Изградена е от четири основни слоя: епикутикула, екзокутикула, мезокутикула и ендокутикула, всеки от които притежава подслое. Основните вещества, изграждащи кутикулата са албумини (25%), колаген и кератин (29%), фиброиди, гликопротеини и липопротеиди (30%). Тя изпълнява функции на защитна бариера, скелетна опора и медиатор в механиката на движенията.



Фигура 2. Анатомия на възрастен организъм *C. elegans* (WormAtlas, <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>)

Непосредствено под кутикулата се разполага хиподермата – специфична епителна тъкан, която при *C. elegans* обикновено е синцитиална. Хиподермата образува удебелени надлъжни зони, наречени хорди (обикновено четири основни – дорзална, вентрална и две латерални), в които се разполагат нервни и секреторни структури.

Мускулатурата е съставена от четири надлъжни снопа, разположени по дорзалната и вентралната страна на тялото. Тя е прикрепена към кутикулата и осигурява характерните за нематодите синусоидални движения. Нервната система на *C. elegans* е изключително добре картирана и се състои от 302 неврона при хермафродита. Те са групирани в два основни ганглия в главата и няколко по-малки в тялото. Най-характерните сетивни структури са амфиди (двойка хеморецепторни органи на главата), фазмиди (разположени каудално), сетивни четинки и папили. Те възприемат механични, химични и термични стимули и играят ключова роля в ориентацията на животното в околната среда. Храносмилателната система е праволинейна, преминаваща от предния към задния край на тялото. Тя започва с устен отвор, заобиколен от сетивни органи. Следва устна кухина, която преминава в силно мускулест фаринкс – основен орган за поемане и механична обработка на храната. Фаринксът се свързва с чревната тръба, представляваща еднослоен епител, специализиран за абсорбция. Отделителната система е силно опростена. Тя се състои от няколко специализирани клетки, които образуват канали. При хермафродита половата система има двойна U-образна структура, съдържаща два овариума, две овидукти и две спермидукални структури, които се обединяват във вулвата – външен полов отвор. При мъжкия половата система е линейна, завършваща с клоака и копулаторни структури (спикули).

ЖИЗНЕН ЦИКЪЛ

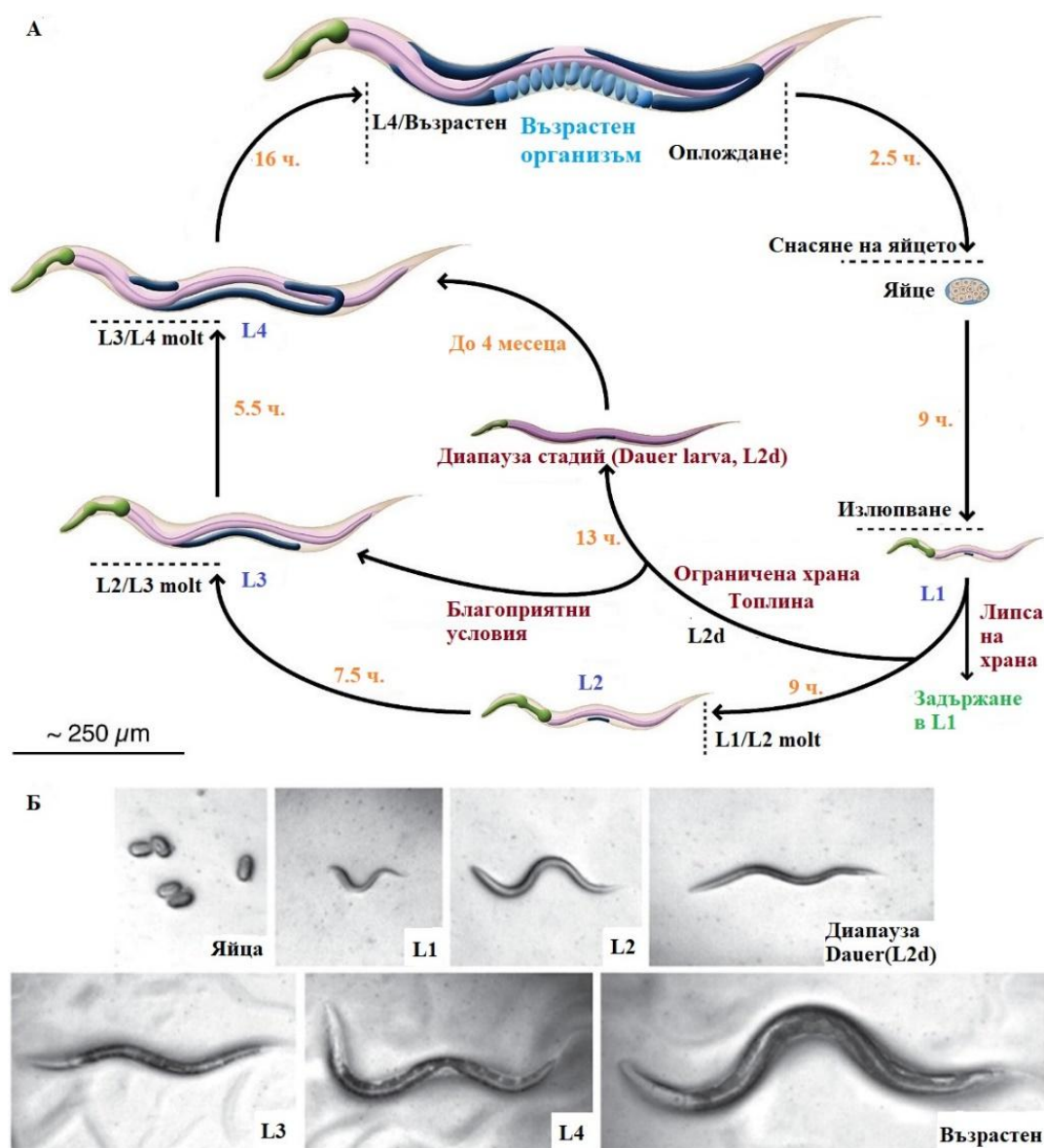
Жизненият цикъл на *Caenorhabditis elegans* е кратък, бърз и добре дефиниран, което го прави идеален модел за изследване на развитието. При оптимални условия, целият цикъл от оплодена яйцеклетка до възрастен индивид отнема приблизително 3 дни при 20°C, при 15°C отнема около 6 дни. Цикълът включва ембрионално развитие, четири ларвни стадия (L1–L4) и възрастна форма. При неблагоприятни условия ларвите могат да влязат в алтернативен стадий на развитие, наречен dauer (**Фигура 3**).

- **Ембрионално развитие**

Оплождането е вътрешно и настъпва в матката на хермафродита. Зиготата се дели, като всяко делене е асиметрично и води до образуването на клетки с различна съдба (напр. клетки, които ще дадат начало на тялото, и клетки, които ще формират зародишната линия). Ембрионът преминава през етапи на клетъчна пролиферация, гаструлация (формират се трите основни зародишни слоя – ектодерма, мезодерма и ендодерма) и морфогенеза (формиране на основните тъкани и органи). Ембрионът преминава от сферична форма към удължена, червеобразна форма, като се удължава трикратно в яйцето. Продължителността на този етап е около 14 ч. при 20°C. В края на ембриогенезата, вътре в яйцето се намира напълно формирана ларва от първи стадий (L1), състояща се от 558 клетки.

- **Ларвни стадии (L1 – L4)**

След излюпването, младият червей преминава през четири последователни ларвни стадия: L1, L2, L3 и L4 (**Фигура 3.**). Всеки стадий се характеризира с интензивен растеж и селективно клетъчно делене. Преходът от един стадий към следващ се осъществява чрез линеене. Червеят навлиза в кратък период на летаргия (характеризиращ се с неподвижност и прекратяване на храненето), по време на който се синтезира нова кутикула под старата. Старата кутикула се отделя и ларвата преминава в следващия стадий.



Фигура 3. А. Жизнен цикъл на *C. elegans* при 20°C (Altun & Hall, 2012). Б. Микрографии на яйца, ларви(L1-L4) и възрастен индивид (Fielenbach & Antebi, 2008)

L1 ларвата е дълга около 250 μ m и притежава всички основни соматични структури, но половата система е неразвита и се състои само от 4 клетки (Z1, Z2, Z3, Z4), които са предшественици на цялата гонада. Ларвата се храни активно с бактерии. L2 стадия се характеризира с активен растеж и диференциация. Клетките на половата система започват да се делят и да формират основата на двете рамена на гонадата при хермафродитите. В края на L2, при неблагоприятни условия (липса на храна, висока температура, пренаселеност), ларвите могат да навлязат в алтернативния диапауза (dauer) стадий. Това е адаптивен отговор, който позволява на нематода да преживее неблагоприятните условия. Dauer ларвата спира развитието си, става тънка, радиално свита и плътна. Формира се специална, многослойна кутикула, която е силно устойчива на химикали, изсушаване и други стресови фактори. В този стадий ларвата не се храни. Метаболизмът е силно забавен и ларвата разчита на натрупаните липидни запаси.

Ларвата е почти неподвижна, но може да реагира на стимули и да се придвижва към благоприятни места. В този стадий нематодът може да оцелее месеци (сравнено с 2 – 3 седмици живот при нормални условия). При подобряване на условията ларвата излиза от dauer и преминава в стадий L4. По време на L3 гонадата продължава да се удължава и клетките в нея навлизат в мейоза. В L4 завършва развитието на половата система, като при хермафродитите се формират вулвата и матката, а при мъжките се формират тестис и копулационните структури. В края на този етап, хермафродитът започва да произвежда сперматозоиди, а след това и яйцеклетки.

- **Стадий на възрастен индивид**

Хермафродитът притежава около 959 соматични клетки, а мъжките – 1031. Възрастният хермафродит (XX) започва да снася оплодени яйца около 3 – 4 часа след последното линееене. Той снася около 250 – 300 яйца през първите 3 – 4 дни от живота си, след което плодовитостта намалява. Хермафродит, който се опложда самостоятелно може да даде потомство от 300 индивида поради по-малкото количество семенна течност. Ако се чифтоса с мъжки индивид обаче, този брой може да нарасне до 1200 – 1400. Продължителността на живота на възрастния индивид е около 2 – 3 седмици, в зависимост от условията.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Приготвяне на течна хранителна среда (LB) за *Escherichia coli* OP50.

В лабораторни условия *C. elegans* се култивира върху Nematode Growth Medium (NGM), като основен хранителен източник се използва *Escherichia coli* щам OP50. Този щам представлява урацил-ауктотроф, което означава, че неговият растеж е ограничен върху NGM средата. Ограниченият бактериален растеж е особено важен, тъй като осигурява оптимални условия за наблюдение на нематодите, улеснява процесите на чифтосване и предотвратява прекомерното натрупване на бактерии, което възпрепятства нормалното развитие на животните. Култура от *E. coli* OP50 може да бъде получена от Caenorhabditis Genetics Center (CGC) или изолирана от вече съществуващи култури. За поддържането им бактериите се отглеждат в LB среда.

Необходими материали:

- 10 g Bacto-tryptone
- 5 g Bacto-yeast extract
- 5 g NaCl
- 15 g агар
- Дестилирана вода
- рН метър

Методика

9. Приготвяне на LB среда:

- Смесете съставките за средата (10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl и 15 g агар), към тях добавете дестилирана вода до 1 литър.
- Коригирайте рН- то на разтвора до рН 7.5.
- Стерилизирайте средата чрез автоклавиране.

10. Култивиране на бактериите:

- Инокулирайте стерилната среда с бактериална колония от *E. coli* OP50.
- Култивирайте бактериите за една нощ при 37°C, за да се получи достатъчно гъста култура.
- Получената бактериална суспензия е готова за използване.

11. Съхранение:

- Бактериалната култура се съхранява в хладилник при 4°C, което осигурява възможност за използване в продължение на няколко месеца.

Задача 2. Приготвяне на петрита с NGM среда за култивиране на *Caenorhabditis elegans*.

Caenorhabditis elegans се култивира в лабораторни условия върху NGM среда, излята асептично в стерилни петрита. NGM средата осигурява необходимите хранителни вещества за растежа на бактериите (*E. coli* OP50), като същевременно поддържа подходящи осмотични условия за самите нематоди. В случай че се изисква добавяне на лекарства (напр. левамизол, стрептомицин или нистатин) към средата, те се добавят директно към NGM разтвора преди неговото разливане в петритата, което гарантира хомогенното им разпределение.

Необходими материали:

- NaCl
- Агар
- Пептон
- 5 mg/ml холестерол, разтворен в етанол (не се автоклавира)
- 1 M KPO₄ буфер, рН 6.0 (108.3 g KH₂PO₄, 35.6 g K₂HPO₄, дест. H₂O до 1 L)
- 1 M MgSO₄
- 1 M CaCl₂
- 2-литрова колба
- Стерилни петрита с различен диаметър (35 mm, 60 mm, 100 mm)

Методика

1. Приготвяне на основния разтвор:

- В 2-литрова колба смесете 3 g NaCl, 17 g агар и 2.5 g пептон. Добавете 975 ml дестилирана вода.
- Покрийте отвора на колбата с алуминиево фолио и автоклавирайте при стандартни условия в продължение на 50 минути.

2. Охлаждане на средата:

- След автоклавиране охладете колбата в 55°C водна баня за 15 минути, за да се предотврати термична деградация на добавяните компоненти.

3. Добавяне на стерилни добавки:

- Към охладения разтвор прибавете последователно 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml холестерол (5 mg/ml в етанол), 1 ml 1 M MgSO₄ и 25 ml 1 M KPO₄ буфер, pH 6.0.
- Разбъркайте внимателно за пълно хомогенизиране.

4. Разливане в петрита:

- В условия на стерилна работна среда, разлейте NGM средата в петрита, като запълните приблизително 2/3 от обема им.

5. Инкубация на готовите петрита:

- Оставете петритата на стайна температура за 2 – 3 дни, за да се елиминира остатъчната влага и да се установи евентуално наличие на замърсяване. При правилно съхранение (в херметически затворен контейнер при стайна температура) петритата могат да се използват няколко седмици, а при съхранение на 4°C – до няколко месеца.

6. Инокулация с бактерии:

- Поддържайки стерилни условия, прибавете върху средата:
 - 0.05 ml течна култура от *E. coli* OP50 за петрита с диаметър 35 mm;
 - 0.1 ml за петрита с диаметър 60 – 100 mm.
- Бактериалната суспензия може внимателно да се разстеле по повърхността на средата със стерилен инструмент (напр. скрапер), като се избягва достигане до ръбовете на съда. Това предотвратява миграцията на нематодите към стените, където те могат да изсъхнат и загинат.

7. Инкубация:

- Поставете петритата с инокулираните бактерии при стайна температура за една нощ или в инкубатор при 37°C за около 8 часа, за да се осигури формиране на стабилен бактериален слой.

Задача 3. Размразяване на *C. elegans*. Наблюдение на див тип и мутантни форми.

Замразените флакони с червеи се съхраняват в течен азот при –196°C или във фризер при –80°C. Процесът на размразяване трябва да бъде бърз, за да се гарантира максимална преживяемост на ларвите и успешно възстановяване на щамата. Бавното размразяване може да доведе до рекристализация – процес, при който малките, по-малко вредни ледени кристали се сливат в по-големи и увреждащи структури, което води до клетъчна смърт и ниска преживяемост.

Необходими материали и апаратура:

- Замразени криоепруветки със *C. elegans* (в разтвор на глицерол)
- Стерилни петрита с NGM среда и добавени бактерии (*E. coli* OP50)
- M9 буфер (за промиване): 3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, H₂O до 1 L
- Стерилна вода

- Лабораторен котлон или водна баня
- Етанол 70%
- Парафилм
- Инвертен микроскоп
- Ламинарен бокс

Методика

I. Протокол за размразяване на замразени щамове

1. Подготовка преди размразяване:

- В ламинарен бокс заложете култура *E. coli* OP50 в петрита с NGM среда. Инкубирайте ги при 37°C за 24 ч. предварително, за да се образува бактериален слой.
- Настройте водната баня на 20 – 25°C.
- Подгответе етикети с код на щама, генотип, дата на размразяване и работна група.

2. Изваждане на криоепруветките:

- Извадете криоепруветките от течния азот или –80°C фризер.
- Дезинфекцирайте външната повърхност на криоепруветките с 70% етанол.

3. Бързо размразяване (1 – 2 мин):

- Незабавно потопете долната част на епруветките във водната баня. Дръжте капачките над нивото на водата, за да предотвратите контаминация. Разклащайте епруветката леко, докато съдържанието се размрази почти напълно, като остане само малко парченце лед.
- Отворете криоепруветките внимателно и пипетирайте леко нагоре-надолу 2 – 3 пъти за хомогенизация.

4. Центрофугиране и промиване:

- Прехвърлете съдържанието (1 ml) в 1.5 ml епруветка. Центрофугирайте на 1000 rpm за 1 минута при стайна температура, за да се утаят червеите. Изхвърлете супернатантата (глицеролът е токсичен във високи концентрации).
- Добавете 1 ml M9 буфер и смесете внимателно.

5. Прехвърляне върху NGM петрита:

- Отворете криоепруветките в стерилни условия (ламинарен бокс) и използвайте стерилни пипети, за да прехвърлите 4 – 5 капки от епруветката с размразени червеи и M9 буфер в центъра на бактериалния слой на предварително подготвеното NGM петри.
- Оставете петритото на стайна температура за няколко часа (или докато излишната течност се абсорбира напълно от агара).
- След като течността се абсорбира, затворете петритото и го инкубирайте при стандартна температура (20°C). Поддържайте умерена влажност, за да избегнете изсъхване.
- 2 – 4 часа след посяване, проверете под инвертен микроскоп за живи, слабо подвижни ларви/възрастни.

- При наличие на живи ларви и млади възрастни прехвърлете по 10 – 20 индивида на нови петрита с бактерии.

II. Наблюдение на див тип и мутантни форми

1. Див тип (Wild Type, щам N2):

- Щамът N2 е стандартният лабораторен див тип, спрямо който се сравняват всички мутанти.
- Характерните му черти са: гладка, симетрична, червеобразна форма; енергично и координирано синусоидално движение; стандартен размер за съответния етап на развитие; гладка кутикула, без видими мехури, издутини или други аномалии.

2. Мутантни форми:

- **Unc (Uncoordinated):** Обща категория за некоординирано движение. *unc-54* (парализирани, неподвижни), *unc-119* (силно некоординирани, бавни).
- **Rol (Roller):** Червеите се движат, като се въртят около надлъжната си ос, оставяйки кръгли следи.
- **Dpy (Dumpy):** Червеите са значително по-къси и по-дебели от дивия тип.
- **Lon (Long):** Червеите са по-дълги от дивия тип.
- **Sma (Small):** По-малки като цялостен размер.
- **Bli (Blister):** Появяват се мехури по кутикулата, пълни с течност.
- **Egl (Egg-laying defective):** Хермафродитите не могат да снасят яйца ефективно. Яйцата се натрупват и излюпват вътре в тялото на родителския индивид, което води до неговата смърт.

Техника на култивиране на *C. elegans* в лабораторни условия

В това упражнение ще се запознаете с методите за отглеждане на *C. elegans* в лабораторни условия. Тук се включват методи за култивиране и трансфер, обеззаразяване на колониите, синхронизиране, както и процедури за замразяване за дългосрочно съхранение и за тяхното възстановяване от замразеното състояние.

КУЛТИВИРАНЕ И ТРАНСФЕРИРАНЕ НА *C. elegans*, ОТГЛЕЖДАНИ В ПЕТРИТА С NGM СРЕДА:

Използват се няколко метода за прехвърляне на *C. elegans* от едно петри в друго. Един от най-бързите и лесни начини е чрез метода „изрязване“, при който стерилизиран скалпел или шпатула се използва за преместване на парче агар от старото петри на ново. Парчето агар обикновено съдържа десетки червеи на различни стадии от развитието си. След прехвърлянето им върху новата среда червеите постепенно се разпростират върху бактериалния монослой и започват активно да се хранят и размножават. Методът е особено полезен, когато червеите са проникнали в агара и не могат да бъдат лесно изолирани. Методът на „изрязване“ е подходящ за прехвърляне на хомозиготни индивиди, но не и когато популацията е хетерозиготна или ако трябва да се поддържа чрез чифтосване.

Друг широко използван метод за прехвърляне на *C. elegans* е основан на използването на стерилизирани ленти от филтърна хартия с размери приблизително 3 – 4 cm дължина и 1 – 2 cm ширина. Стерилизираната филтърна хартия се поставя внимателно върху повърхността на петрито, където абсорбира влагата от агара и по този начин събира червеите. След кратко време филтърната хартия, заедно с прилепналите към нея индивиди се пренася върху ново петри, съдържащо NGM среда и бактериален монослой (*E. coli* OP50). При допир на хартията до повърхността на средата на новото петри, червеите мигрират върху новата хранителна среда. След приключване на трансфера, използваната филтърна хартия се изхвърля, за да се избегне риск от контаминация.

Третият широко прилаган метод за прехвърляне на отделни индивиди от *C. elegans* между различни петрита се осъществява с помощта на платинена тел с дължина приблизително 2,5 cm, закрепена към върха на стъклена пипета или държач. За да бъде инструментът безопасен за манипулация с нематодите, краят на платинената тел се сплесква внимателно с чук, а след това се заглажда с фина шкурка, така че да се премахнат остри ръбове. По този начин се предотвратява евентуално механично увреждане на червеите или нарушаване целостта на агара. Преди всяко използване телта се стерилизира чрез нагряване върху пламък на спиртна лампа и след това се оставя да се охлади за кратко. Този подход минимизира риска от контаминация на културите.

ЧЕСТОТА НА ПРЕХВЪРЛЯНЕ

Честотата, с която трябва да се прехвърлят червеи, зависи от генотипът на изследваните индивиди, температурните условия на култивиране и целите на експеримента. Обичайно, прехвърляне е необходимо на всяко едно до три поколения. Прехвърлянето е по-лесно, ако се направи преди гладуване. При прехвърляне на хетерозиготни организми, най-добре е да се прехвърли само един червей на всяко ново петри. Това позволява потвърждаване на хетерозиготния генотип в следващото поколение. За поддържане на култури, съдържащи и мъжки, и хермафродити, е необходимо да се прехвърлят по-голям брой индивиди (напр. 6 – 8 мъжки и 3 – 4 млади възрастни хермафродити), за да се осигури успешно кръстосване и поддържане на популацията. Температурата оказва пряко влияние върху скоростта на развитие и необходимостта от по-чести прехвърляния. Индивидите, култивирани при 25°C, достигат до състояние на гладуване значително по-бързо в сравнение с тези, отглеждани при 16°C. *C. elegans* се развиват 2.1 пъти по-бързо при 25°C в сравнение с 16°C и 1.3 пъти по-бързо при 20°C в сравнение с 16°C.

ПОЧИСТВАНЕ НА ЗАМЪРСЕНИ КОЛОНИИ ОТ *C. elegans*

В лабораторни условия културите на *C. elegans* понякога могат да се замърсят с различни микроорганизми – бактерии, дрожди или плесени. Повечето замърсители не представляват пряка заплаха за червеите, въпреки това наличието им може да затрудни експерименталната работа. Най-простият и ефективен метод за отстраняване на плесени е многократното прехвърляне на червеите. Бактериалните замърсители и дрождите се отстраняват ефективно чрез обработка на културата с разтвор на натриев хипохлорит (белина), който унищожава замърсителя и всички червеи с изключение на яйцата. Яйцата на *C. elegans* имат плътна хитинова обвивка, която ги прави устойчиви на действието на хипохлорита.

ЗАМРАЗЯВАНЕ НА *C. elegans* ЗА ДЪЛГОСРОЧНО СЪХРАНЕНИЕ

Caenorhabditis elegans могат да бъдат замразявани и съхранявани за неопределено дълъг период от време в течен азот (-196°C) или във фризер при -80°C. Съхранението в течен азот е предпочитано за дългосрочно съхранение, тъй като при прекъсване на електричеството, културите при -80°C могат да бъдат загубени. Успешното замразяване зависи от използването на индивиди в правилния стадий на развитие, използването на криопротектор (глицерол) и постепенното охлаждане до -80°C преди дългосрочно съхранение. Най-висока преживяемост при замразяване показват младите ларви в стадии L1–L2. За разлика от тях яйцата, възрастните индивиди и тези в състояние на диапауза имат значително по-ниска степен на оцеляване.

Има два начина за замразяване на *C. elegans*: замразяване в течен разтвор (Liquid Freezing Solution) или замразяване в мек агар (Soft Agar Freezing Solution). За дългосрочно съхранение на *C. elegans* в течен азот се препоръчва замразяването в течен разтвор. Недостатък е, че червеите се утаяват на дъното на епруветката, което затруднява изолирането на малко количество без размразяване на цялата проба. Замразяването в мек агар е подходящо за работни запаси. Добавянето на агар предотвратява утаяването

и поддържа нематодите суспендирани. Това позволява вземането на малка част от съдържанието, докато останалото може да бъде върнато във фризера. Този метод се прилага основно при съхранение на -80°C . При тази температура не е необходимо пълно размразяване.

След съхранение в течен азот степента на възстановяване на *C. elegans* обикновено е в границите 35 – 45% от първоначалния брой индивиди. Тази стойност може да намалее леко при дългогодишно съхранение, но остава значително по-висока в сравнение с културите, поддържани при -80°C . Въпреки че съхранението във фризер позволява запазване на жизнеспособни червеи за повече от десет години, ефективността на възстановяване е пониска. Затова се препоръчва поне една криоепруветка от всеки щам да се съхранява в течен азот като резерв. Някои мутантни щамове не преживяват замразяване при -80°C , както и голяма част от индивидите от дивия тип.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Отстраняване на замърсявания от плесени от петрита със *C. elegans* и синхронизиране на културата.

При дългосрочно поддържане на *C. elegans* върху NGM среда, често се появяват замърсявания от плесени (гъбични колонии), които могат да се развият поради нестерилни условия, влага или въздушни спори. Плесенните замърсявания представляват сериозен проблем при лабораторното култивиране на *C. elegans*. Гъбичките се конкурират с бактериалния хранителен източник (*E. coli* OP50) за хранителни вещества, могат да произвеждат токсични метаболити, които са вредни за червеите и физически възпрепятстват тяхното движение и достъп до храна чрез формирането на плътен мицел. Целта на процедурата е прехвърляне на нематодите върху чисти среди и постепенно премахване на замърсяването.

Синхронизирането на култури от *C. elegans* е важна лабораторна техника, която позволява да се работи с голям брой индивиди, намиращи се на един и същ етап от развитието. Това е от голямо значение за експерименти, изискващи възрастово-специфични анализи, като например изследвания на гена експресия, протеомика, метаболомика, тестове за продължителност на живота или поведенчески анализи.

Необходими материали:

- Петри със *C. elegans*
- Няколко нови NGM петрита, предварително засети с *E. coli* OP50
- Инвертен микроскоп
- Платинена или стоманена игла за прехвърляне на червеи („worm pick“)
- Спиртна лампа или горелка
- 70% етанол

- Разтвор за лизис: смес от белина (натриев хипохлорит, 5%) и 1М NaOH в съотношение 2:1. Приготвя се непосредствено преди употреба. **(ВНИМАНИЕ: Работете с ръкавици и предпазни очила в камина)**
- Стерилен буфер М9
- Микроцентрофужни епруветки (1.5 ml)
- Микропипети и стерилни накрайници
- Микроцентрофуга

Методика

1. Метод 1: Физическо прехвърляне (за локализирано замърсяване)

- Почистете добре работната повърхност със 70% етанол.
- Стерилизирайте иглата за прехвърляне на пламък и я оставете да се охлади, като я докоснете до чиста агарова повърхност на ново петри.
- Под микроскоп, внимателно огледайте замърсеното петри. Идентифицирайте зона с активни червеи, която е максимално отдалечена от плесенната колония.
- Работете бързо, за да минимизирате времето, през което петрито е отворено. Внимателно повдигнете капака.
- С помощта на стерилната игла, „издърпайте“ (пикирайте) 5 до 10 здрави, млади, снасящи яйца хермафродити. Избягвайте да взимате ларви или възрастни.
- Прехвърлете червеите върху ново, чисто NGM петри, като ги поставите в периферията на бактериалния слой.
- Инкубирайте новото петри при стандартна температура (20°C).
- Наблюдавайте ежедневно културата. Проверявайте новото петри за признаци на плесен. Ако замърсяване се появи отново, повторете процедурата, като прехвърлите червеи от второ поколение върху трето чисто петри.

2. Метод 2: Химическо пречистване чрез лизис (за разпространено замърсяване) и синхронизиране на културата

- С помощта на 1 ml буфер М9, измийте цялата повърхност на замърсеното петри, за да съберете възможно най-много червеи (и яйца) в течна суспензия. Прехвърлете суспензията в микроцентрофужна епруветка.
- Центрофугирайте епруветката за 1 минута при 1000 x g, за да утайте червеите. Внимателно отстранете супернатантата.
- Добавете 500 µl от прясно приготвения разтвор за лизис към утайката. Разклатете енергично (vortex) за 10 – 15 секунди и след това наблюдавайте под микроскоп. Процесът трябва да продължи точно докато възрастните червеи се разпаднат, което обикновено отнема 5 – 7 минути. Не превишавайте това време, тъй като хипохлоритът ще започне да уврежда и яйцата.
- Напълнете епруветката догоре (около 1 ml) със стерилен буфер М9. Това разрежда лизиращия разтвор и спира реакцията. Центрофугирайте за 1 минута при 1000 x g. Яйцата ще се утаят на дъното.

- Внимателно отстранете течността, като внимавате да не засмучете утайката от яйца.
- Повторете последните две стъпки още 3 – 4 пъти. Това е много важно, за да се премахнат всички следи от лизиращия разтвор, които са токсични за излюпващите се ларви.
- След последното промиване, отстранете по-голямата част от супернатантата, оставете малък обем (20 – 50 μ l) и ресуспендирайте утайката от яйца. Пренесете суспензията с яйца върху свежо NGM петри, като я накапете върху бактериалния слой.
- Наблюдавайте капка от културата под микроскоп. При 20°C ларви в L1 могат да бъдат събрани след приблизително 8 часа, ларви в L2 – приблизително след 18 часа, ларви в L3 – приблизително след 25 часа и ларви в L4 – приблизително след 37 часа.
- Оставете петрито при 20°C. Ларви в L1 могат да бъдат събрани след приблизително 8 часа, ларви в L2 – приблизително след 18 часа, ларви в L3 приблизително след 25 часа и ларви в L4 – приблизително след 37 часа.

Задача 2. Замразяване на *C. elegans*, използвайки разтвор за замразяване (Liquid Freezing Solution).

Caenorhabditis elegans може да се съхранява дългосрочно при -80°C или в течен азот, като се използва криопротективен разтвор – Liquid Freezing Solution (LFS). Този разтвор съдържа глицерол (криопротектор), който предотвратява образуването на големи ледени кристали в клетките на червеите по време на замразяване. Образуването на ледени кристали е основната причина за клетъчна смърт при този процес. За най-добри резултати се замразяват млади ларви (L1 и L2), които са значително по-устойчиви на процеса на замразяване и размразяване в сравнение с по-късните стадии и възрастните индивиди. Бавното и контролирано понижаване на температурата позволява на водата постепенно да излезе от клетките, което намалява вътреклетъчното образуване на кристали.

Необходими материали:

- Култура на *C. elegans* (гъста култура с множество възрастни червеи и ларви от всички стадии)
- Стерилен S (M9) буфер (129 ml 0.05 M K_2HPO_4 , 871 ml 0.05 M KH_2PO_4 , 5.85 g NaCl)
- Разтвор за замразяване – S буфер + 30% глицерол (v/v) (автоклавиран)
- Етанол 70%
- Стерилни криоепруветки (1.8 или 2 ml)
- Микропипети и стерилни накрайници
- Перманентен маркер, устойчив на ниски температури и алкохол
- Течен азот (-196°C) или ултранискотемпературен фризер (-80°C)

Методика

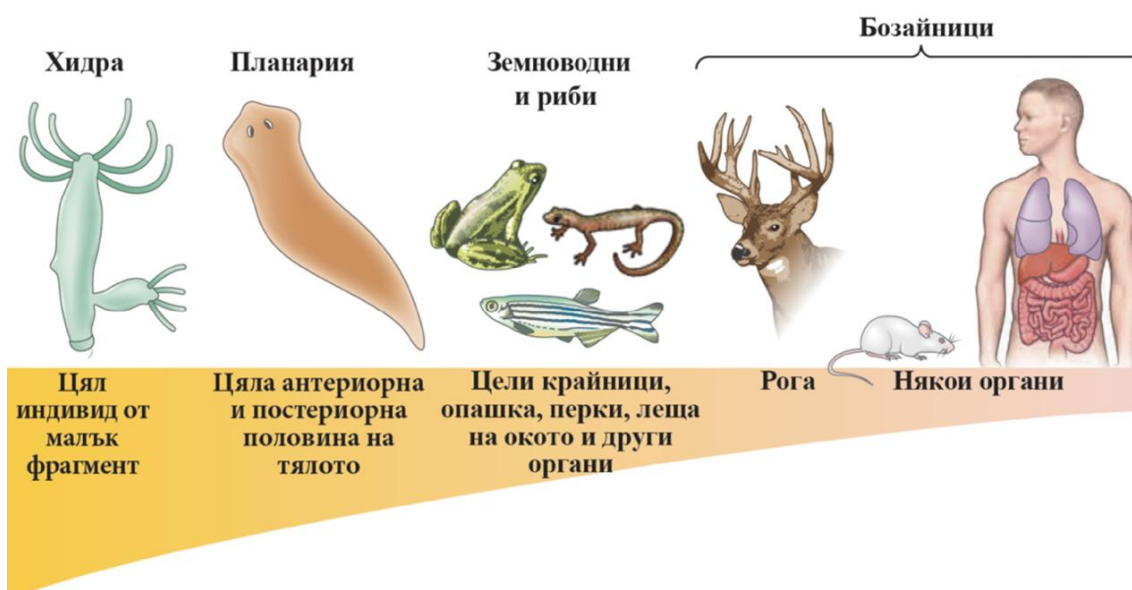
1. Замразяване на *C. elegans* чрез използване на подходящ разтвор

- Надпишете ясно всяка криоепруветка с името на щама и датата.
- Добавете 0.5 ml от течния замразяващ разтвор във всяка надписана криоепруветка.
- Използвайте едно голямо или 2 – 3 малки петрита, в които има голям брой индивиди в L1 – L2.
- Промийте червеите от петрито със стерилен S буфер (2 ml за малко и 4 ml за голямо петри), за да ги отделите от агара.
- Прехвърлете по 0,5 ml от S буфера с червеите в надписаните стерилни 1,8 ml криоепруветки.
- Затворете плътно капачките и хомогенизирайте съдържанието чрез леко обръщане на епруветките.
- За да избегнете увреждане от бързото замразяване, температурата трябва да се понижава постепенно. Поставете епруветките в кутия от стиропор във фризер при -80°C за 24 часа. След 24 часа прехвърлете епруветките в течен азот (-196°C) за дългосрочно съхранение.
- Размразете една епруветка, за да проверите до каква степен червеите оцеляват след замразяването.

Регенерация. Изследване на възможността за регенерация при малочетинести и плоски червеи

В биологията регенерацията представлява процес, при който организмите възстановяват или заместват изгубени, увредени или ампутирани части на тялото. Способността за регенерация варира значително между отделните видове (**Фигура 1**). В основата си регенерацията е сложен процес, интегриращ клетъчно обновяване, тъканно възстановяване и морфогенетичен растеж. Основните механизми на регенерацията се управляват от молекулярни процеси, като главна роля тук играе генната регулация, която управлява клетъчното делене, диференциация и морфогенеза. В някои случаи значителни количества тъкани се подменят през определен период. Примери за това са последователната продукция на фоликули в яйчниците, израстването на косата и ноктите, подмяната на епидермални клетки на няколко седмици или обновяването на епителните клетки в червата на 2 – 3 дни.

Някои моделни организми демонстрират изключително висока регенеративна способност. Класически примери са хидрата и планарията, при които клетките бързо реагират на нараняване, активирайки каскада от клетъчни и молекулярни събития, водещи до пълно възстановяване на изгубените структури. При животните, впечатляващи примери за регенерация се наблюдават при бодлокожи (например морски звезди и морски таралежи), ракообразни, някои влечуги и земноводни. Особено интересен феномен е автотомията – защитен механизъм, при който животното съзнателно отделя (самоампутира) крайник или опашка с цел да избяга от хищник, след което започва процес на възстановяване на загубената част. Регенерацията е доказателство за забележителната адаптивност и устойчивост на биологичните системи.



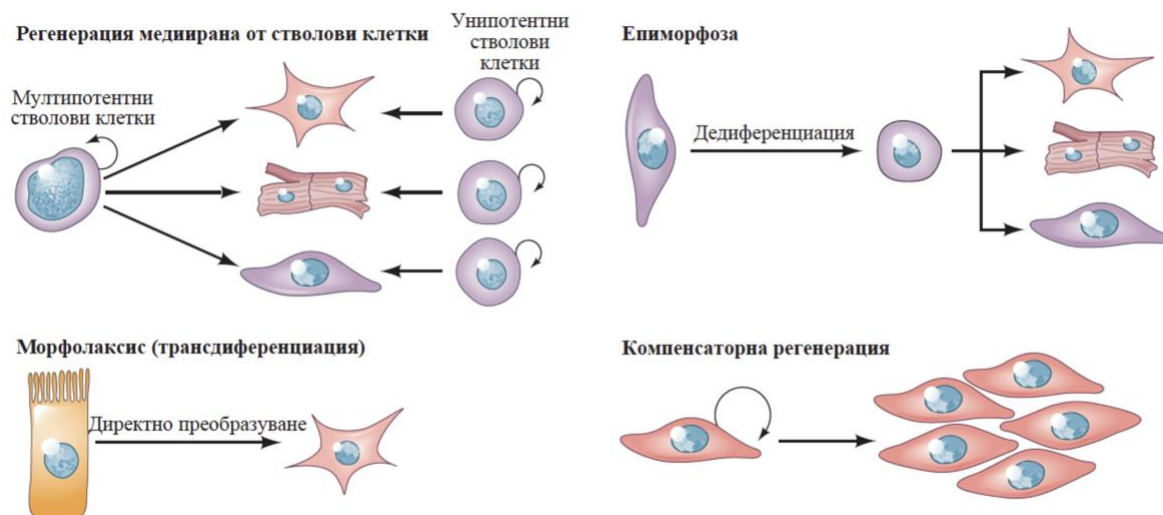
Фигура 1. Различни организми и техните регенеративни способности

МЕХАНИЗМИ НА РЕГЕНЕРАЦИЯ

Не всички организми притежават еднаква способност за регенерация, а и самите механизми, чрез които се осъществява този процес, могат да се различават съществено (**Фигура 2**). Възстановяването на изгубени тъкани или органи може да се осъществи по четири основни начина:

- 1. Регенерация, медирана от стволови клетки.** Това е процес, при който специализирани клетки с висок потенциал за самообновяване и диференциация възстановяват изгубени или увредени тъкани и органи. Този механизъм е широко разпространен – от безгръбначни до бозайници, включително и човека. Стволовите клетки служат като постоянен клетъчен резерв, който се активира при физиологична нужда (редовна подмяна на клетки) или в отговор на травма. Активираните стволови клетки започват бързо клетъчно делене, за да увеличат клетъчната маса, необходима за регенерацията. Част от тях остават стволови клетки, докато други се диференцират в необходимите специализирани клетки (например мускулни клетки, нервни клетки, кръвни клетки).
- 2. Епиморфоза.** При този механизъм клетките на ампутираното място преминават през процес на дедиференциране, за да образуват недиференцирана клетъчна маса, известна като бластема. Въпреки че произходът им често е различен, бластемните клетки са морфологично сходни. Впоследствие те се диференцират, за да формират нова структура. Клетките на бластемата обикновено се диференцират в същия или подобен клетъчен тип. Този процес е характерен за регенерацията на крайници при земноводните. Експериментално е установено, че ако бластема от крайник се трансплантира на друго място по тялото на същия индивид, тя ще продължи да се развива като крайник, доказвайки автономността на този механизъм.
- 3. Морфалаксис.** За разлика от епиморфозата, при морфалаксиса не се формира бластема. След ампутация се осъществява ремоделиране на съществуващите тъкани: някои клетки мигрират към мястото на увреждането, други се репозиционират в структурата. Клетките променят експресията на гени и придобиват нови морфологични и функционални характеристики. Градиенти от сигнални молекули (напр. Wnt, BMP, FGF) дефинират оста на регенерация и позиционната идентичност на клетките. Част от клетките умират чрез програмирана клетъчна смърт, освобождавайки място за репозициониране и реконструкция на структурата. Процесът е типичен за някои безгръбначни животни (напр. хидра, медузи), както и за регенерацията при растенията.
- 4. Компенсаторна регенерация.** Този механизъм включва пролиферация на диференцирани клетки, които запазват своите специализирани характеристики. За разлика от другите типове, тук не участват стволови или дедиференцирани клетки. Всяка клетка се дели, за да генерира сходни по функция и структура клетки, без формиране на недиференцирана тъканна маса. Типичен пример е черният дроб при бозайниците, който може да възстанови своята маса и

функция след увреждане или отстраняване на част от него, без да се формира бластема.



Фигура 2. Механизми на регенерация в организмите (регенерация, медирана от стволови клетки; епиморфоза; морфалаксис и компенсаторна регенерация)

НЕТИПИЧНА (АНОРМАЛНА) РЕГЕНЕРАЦИЯ

В някои случаи процесът на регенерация не води до пълно и точно възстановяване на изгубената структура. Вместо напълно идентично копие на оригиналния орган или тъкан, регенерацията може да доведе до непълно възстановяване, морфологично променена структура, или свръхрастеж спрямо първоначалните размери. Пример за непълна регенерация се наблюдава при поповите лъжички, при които след ампутация на опашката новата структура често е по-малка – приблизително половината от оригиналната. При отстраняване на долната челюст на някои видове саламандри (като дъждовника), се формира нова, по-малка и често недоразвита челюст. Тя представлява хрущялен модел на оригиналната, което показва, че сигналните пътища за формиране на тъканта са активни, но контролиращите растежа и окончателната форма са нарушени. Същото се наблюдава и при гущерите, които могат да регенерират опашките си, новата опашка е изградена от несегментирана хрущялна тръба. Поради тази морфологична разлика, регенерираната опашка лесно се отличава от първоначалната. При ракообразните в някои случаи процесът на регенерация се обърква, водейки до феномен, наречен хетероморфоза. Хетероморфозата е вид анормална регенерация, при която на мястото на ампутиран орган израства друг, различен по структура и функция орган. Най-известният пример за хетероморфоза при ракообразните е регенерацията на антена на мястото на око. Сред членестоногите са описани случаи, при които след ампутация на антена, от мястото на раната се регенерира крак. Свръхрастеж или свръхкомпенсация може да се наблюдава при някои случаи – например при омари, където от основата на отстранен крайник може да се формира крайник с по-голям брой сегменти или анормално развитие на щипките (дактила и пропода).

ПОЛЯРНОСТ И РЕГУЛАЦИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЯТА

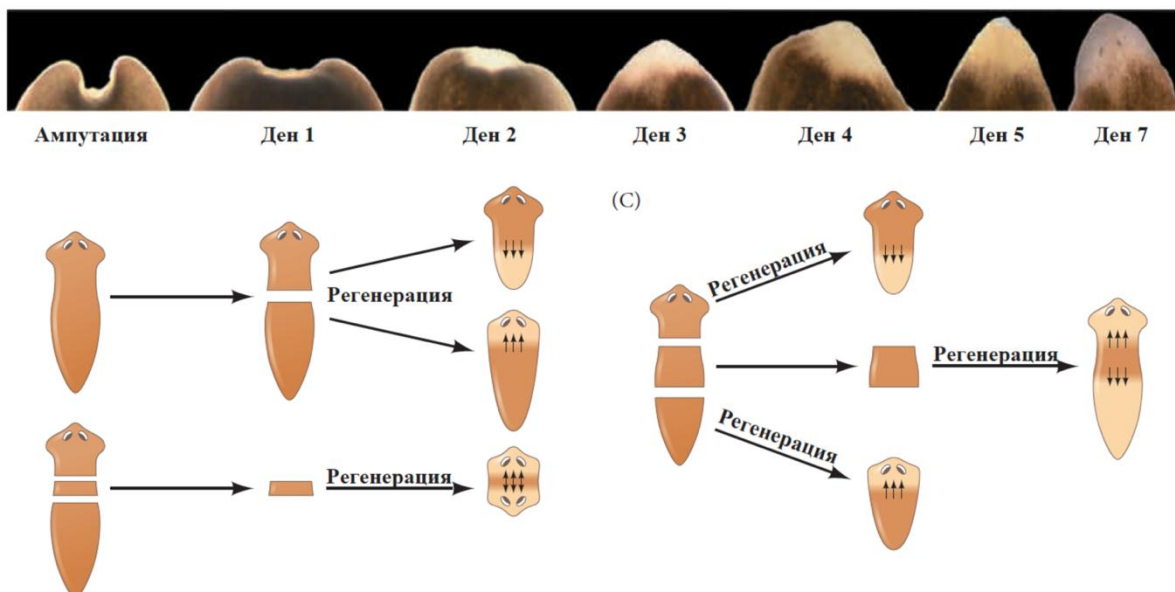
Регенерацията се подчинява на строги биологични принципи, които гарантират правилното формиране на структурите в пространството и времето. Два от най-важните принципи са установяването на полярност и прецизната регулация на клетъчните процеси. Регенериращата тъкан винаги възстановява само структурите, които са дистално (по-далеч от центъра на тялото) разположени спрямо мястото на ампутация. Например, ако крайник на саламандър бъде отрязан през рамото (проксимално), ще регенерира цялата липсваща част до върха на пръстите (дистално). Ако обаче бъде отрязан през китката, ще регенерира само дланта и пръстите, но никога лакът или рамо. Тази проксимално-дистална ос е строго спазвана. Единствените известни изключения са при организми с огромен регенеративен капацитет, като сладководните планарии. Успешната регенерация зависи от множество предварителни условия и стимули, които инициират и контролират процеса. Ампутацията или увреждането на тъканта е първият сигнал за стартиране на регенеративните механизми. За да се осъществи регенерация, е необходимо в остатъка от оригиналната структура да присъстват клетки с регенеративен потенциал. При епиморфозата, това са клетки, които могат да дедиференцират и да образуват бластема – маса от недиференцирани клетки, която ще се развие в новата структура. При регенерацията, медирана от стволони клетки, това са клетките, които се намират в специални ниши. Регенерацията често е стимулирана от външни за самите клетки фактори. Един от най-важните такива стимули е нервната система.

ОБХВАТ НА РЕГЕНЕРАТИВНАТА СПОСОБНОСТ

Няма известна група живи организми, която напълно да е загубила способността за регенерация на определени свои структури. Въпреки това, мащабът, скоростта и пълнотата на регенеративния процес варират значително между различните таксономични групи.

- **Планария**

Планариите са сред най-известните модели за изучаване на регенеративни процеси поради изключителната си способност да възстановяват изгубени части от тялото, включително главата и опашката (**Фигура 3**). Техният регенеративен капацитет се дължи на наличието на необласти – популация от плурипотентни стволони клетки, които са разпределени в цялото тяло. Процесът на регенерация при планариите се осъществява чрез епиморфоза, при която необластите се активират на мястото на ампутацията, за да образуват бластема. В случай на регенерация на глава, бластемните клетки се диференцират в нервна тъкан и формират нов мозък, други се специализират в сензорни структури като очи, а трети изграждат мускулни и съединителни тъкани. В рамките на приблизително една седмица новообразуваната глава придобива почти пълна функционалност, сравнима с тази на оригиналната. Регенерацията при планариите следва строго организирана последователност от процеси. Освен това, съществува механизъм на обратна връзка, при който вече формираната структура инхибира производството на самата себе си, като по този начин се предотвратява свръхрастеж.



Фигура 3. Регенерация на плосък червей (планария)

- **Риби**

Рибите са една от най-древните и най-разнообразни групи гръбначни животни, които демонстрират забележителни регенеративни способности. Техният регенеративен потенциал обхваща множество структури, което им позволява ефективно да се възстановяват от наранявания. Откъснатите люспи се заменят бързо с нови, обикновено в рамките на няколко дни. Ампутирани хриле и чувствителни придатъци, като мустаци при сомовите риби, също регенерират сравнително лесно. Най-забележителната способност при рибите е регенерацията на перките. При някои хрущялни риби, например леопардовата акула (*Triakis semifasciata*), е развита уникалната способност за непрекъсната подмяна на зъбите.

- **Земноводни**

Земноводните са група гръбначни, които притежават изключителни регенеративни способности, особено в ранните етапи на своя живот. Тези способности обаче варират значително между различните видове и дори между различните етапи на развитие на един и същи организъм. Саламандрите са едни от най-известните примери за животни, способни да регенерират големи и сложни структури като крайници, опашки, челюсти и дори части от сърцето и очите. Поповите лъжички също притежават висок регенеративен потенциал. Те могат да възстановяват не само опашките си, но и частично крайници. С метаморфозата обаче способността за регенерация на крайници напълно изчезва, а причините за това остават неизяснени.

- **Гущери**

Множество видове гущери притежават способността да регенерират опашките си, като това често е свързано с еволюционния механизъм на автотомия. Автотомията се осъществява в предварително определени зони на слабост между прешлените, където тъканите могат бързо да се разкъсат при минимално увреждане на останалата част от

тялото. Регенерацията на опашката при гущерите обаче не води до възстановяване на оригиналната анатомична структура. Вместо нови сегментирани прешлени, се образува непрекъсната хрущялна тръба, която функционално замества гръбначния стълб в тази област. Около тази хрущялна ос се формират мускулни влакна, кръвоносни съдове, нерви и кожа, възстановяващи до известна степен подвижността и защитните функции на опашката.

- **Птици**

Птиците демонстрират ограничен регенеративен потенциал, който е характерен за повечето топлокръвни животни. За разлика от земноводните и рибите, при тях не е наблюдавана регенерация на цели крайници или сложни органи след ампутация. Една от най-важните регенеративни способности при птиците е способността им да сменят перата си. Този процес се случва периодично и позволява подмяната на износени или увредени пера.

- **Бозайници**

Бозайниците като цяло притежават ограничена способност за регенерация в сравнение с много безгръбначни и някои гръбначни животни, като земноводните. Въпреки че пълната регенерация на крайници или опашки не се наблюдава, редица тъкани и органи могат да възстановяват своята структура и функция след частична загуба. Един от най-забележителните примери е годишната смяна на рогата при елените. Рогата се отделят и напълно регенерират всяка година, като това се счита за една от най-бързите форми на костен растеж в животинското царство. Други примери за регенерация при бозайници включват ушите на зайците, които могат да възстановяват кожа и хрущял след частично увреждане, както и мембраните на крилата при прилепите. Особено впечатляваща е регенеративната способност на черния дроб. При хора и други бозайници, ако до 70 – 75% от органа бъде хирургично отстранен, той може да възстанови първоначалната си маса и функционален капацитет. Това не е просто хипертрофия на остатъчната тъкан, а сложен процес, включващ пролиферация на хепатоцити и ремоделиране на съдовата мрежа. Подобни, макар и по-ограничени, регенеративни реакции се наблюдават и в бъбреците, панкреаса, щитовидната жлеза и някои други органи. В основата на тези процеси стои прецизно координирано взаимодействие между стволови клетки, растежни фактори, хормонални сигнали и имунни механизми.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Проучване на възможността за регенерация при свободноживеещи плоски червеи (планарии).

Цел на изследването: Сладководните планарии са класическа моделна система в областта на регенеративната биология. Те притежават изключителен регенеративен капацитет, обусловен от наличието на популация от плурипотентни стволови клетки,

наречени необласти, които са разпределени из цялото тяло. Те представляват около 20 – 30% от клетките в тялото и позволяват асексуално възпроизвеждане чрез фрагментация. Регенерацията стриктно следва съществуващата в тялото предно-задна (антеро-постериорна) ос. Фрагмент, взет от предната част, ще регенерира опашка, докато фрагмент от задната част ще регенерира глава. Целта на настоящия експеримент е да се демонстрира този феномен чрез хирургична ампутация (трансекция) на планарии и да се проследят ключови морфологични събития в процеса на регенерация.

Материали и апаратура

- Планарии (*Dugesia* spp.)
- Малки пластмасови петрита
- Големи пластмасови петрита
- Покривни и предметни стъкла
- Скалпел
- Лупа или дисекционен микроскоп
- Капкомер/пипета за прехвърляне
- Изворна или дехлорирана чешмяна вода (оставена да престои 24 часа).
- Филтърна хартия
- Маркер

Методика

1. Подготовка на експериментални групи

- Надпишете малките петрита, като за всяко се отбележи: тип на фрагмента („Глава“, „Средна част“, „Опашка“), група и дата на започване на експеримента.

2. Подготовка на средата

- Във всяко петри добавете изворна вода до приблизително половината от обема на съда.

3. Прехвърляне на планариите

- С помощта на капкомер внимателно прехвърлете планариите в голямото петри без вода.

4. Ограничаване на подвижността

- Абсорбирайте излишната вода с филтърна хартия, за да се намали подвижността, без директен контакт с червеите (за да се избегне увреждане или прикрепване).

5. Дисекция

- Под лупа или дисекционен микроскоп използвайте покривно стъкло или скалпел, за да нарежете планариите на фрагменти (напр. преден, среден и заден, Фигура 3). Кратко охлаждане върху лед може да редуцира движенията и да улесни манипулацията.

6. Прехвърляне на фрагментите

- С пипета прехвърете всеки фрагмент в предварително подготвеното и надписано петри.

7. Повторение

- Повторете стъпки 3 – 6 с останалите планарии, докато получите поне 3 – 4 фрагмента на тип (напр. 3 предни, 3 задни)

8. Регистрация на условията

- Запишете в протокола датата на фрагментиране, стайната температура (оптимално 20 – 22°C) и начални наблюдения (напр. размер на фрагментите).

9. Проследяване на регенерацията

- Продължителността на регенеративния процес за главата се отчита чрез появата на фоторецептори, които първо се наблюдават като черни точки в очните петна. Очите се формират приблизително до 4-тия ден, а фоторецепторите – около 6-тия ден.

10. Наблюдение и документиране

- Продължете мониторинга за 14 дни, сменяйки водата на всеки 2 – 3 дни, за да се избегне замърсяване. Отбележете броя на оцелелите и загинали фрагменти във всяка експериментална група. Резултатите могат да бъдат представени като процент на успешна регенерация.

Задача 2. Изследване на регенерационния потенциал при земния червей (*Lumbricus terrestris*).

Цел на изследването: Земният червей (*Lumbricus terrestris*), притежава добре изразен, макар и ограничен, регенеративен капацитет. За разлика от планариите, при които всеки фрагмент може да възстанови цял организъм, при земните червеи регенерацията е силно поляризирана по антеро-постериорната (предно-задна) ос. Ключова структура в тялото на възрастния червей е клителумът (clitellum) – удебелен, жлезист пръстен, който играе основна роля в размножаването. Смята се, че тази зона е метаболитно активна и богата на специализирани клетки, която може да повлияе на регенеративния потенциал на съседните тъкани.

Целта на настоящия експеримент е да се изследват две основни хипотези:

1. Да се потвърди регенеративната полярност при *Lumbricus terrestris*, като се сравни способността за оцеляване и регенерация на предни и задни фрагменти.
2. Да се оцени потенциалната роля на клителума в процеса на регенерация, като се сравнят фрагменти, съдържащи или несъдържащи тази структура.

Материали и оборудване

- Живи екземпляри *Lumbricus terrestris* – 10 – 12 индивида
- Малки пластмасови кутии с капак – 4 бр.
- Почва (хомогенна градинска почва без химикали)
- Скалпел с фино острие (стерилен)
- Пинсети (с меки краища)
- Чиста вода (за овлажняване на почвата)
- Филтърна хартия

- Маркер за надписване
- Пипета или спринцовка
- Ръкавици и защитни очила

Методика

1. Предварителна подготовка

- С помощта на маркер надпишете четирите кутии според типа на фрагмента:
 - Група А: главов сегмент с *clitellum*
 - Група В: главов сегмент без *clitellum*
 - Група С: опашен сегмент с *clitellum*
 - Група D: опашен сегмент без *clitellum*

2. Подготовка на субстрата

- Напълнете всяка кутия до половината с влажна, но не прекалено мокра почва. Излишната влага може да доведе до хипоксия и загниване на тъканите.

3. Подготовка на индивидите

- С помощта на пинсети прехвърлете 10 здрави екземпляра върху филтърна хартия. Избягвайте силно притискане, за да не увредите тъканите.

4. Хирургична процедура

- С остър скалпел извършете разрези при различни позиции:
 - 5 индивида се разрязват **преди *clitellum*** (за отделяне на предна и задна част)
 - 5 индивида се разрязват **след *clitellum***. След разреза внимателно отделете сегментите и ги прехвърлете в съответните надписани кутии.

5. Поддържане на експерименталните групи

- Кутиите се държат при постоянна температура (~20°C) и влажност на почвата.
- Проверявайте ежедневно влагата и при нужда добавяйте вода с пипета.
- Избягвайте директна слънчева светлина и резки температурни промени.

6. Наблюдение

- В продължение на 14 дни наблюдавайте индивидите за признаци на регенерация (формиране на нови сегменти) или смърт.

7. Оценка на резултатите

- Запишете в кои групи е настъпила пълна или частична регенерация и в кои – смърт.
- Документирайте с фотографии за по-точно сравнение.

Влияние на химични и физични тератогени върху ранното ембрионално развитие на *Danio rerio*

Danio rerio (Фигура 1), позната още като зебровата рибка, е един от най-широко използваните моделни организми в съвременната биология на развитието, генетиката и молекулярната биология. Възрастните индивиди достигат дължина 4 – 5 cm, като характерната им окраска включва редуващи се светли и тъмни хоризонтални ивици, напомнящи шарката на зебра. *Danio rerio* е сладководен вид, произхождащ от бавнотечащи и стоящи водоеми в Южна Азия, предимно Индия, Бангладеш и Непал. В лабораторни условия видът се отглежда лесно в рециркулиращи аквариумни системи при температура 26 – 28°C и с фотопериод 14:10 (светлина:тъмнина). Чрез химична мутагенеза (напр. ENU – N-етил-N-нитрозоурей) или чрез CRISPR технологии са създадени стотици линии с дефекти в развитието на различни органи (сърце, очи, мускулатура, нервна система). Те служат за функционален анализ на гени и за моделиране на човешки заболявания. Около 70% от гените на *Homo sapiens* имат хомолози в генома на *Danio rerio*, което прави резултатите от изследванията пряко релевантни за изучаване на молекулярните механизми на човешките заболявания и генетични нарушения.



Фигура 1. *Danio rerio* (*Brachydanio rerio*) (Balaram Mahalder, 2017)

ЖИЗНЕН ЦИКЪЛ

Жизненият цикъл на зебровата риба е относително кратък и преминава през ясно разграничени етапи, което я прави изключително удобен модел за изследвания в биологията на развитието. При оптимални условия (28.5°C, добро хранене и качествена вода) целият цикъл от оплождането до половата зрялост се осъществява за приблизително 3 – 4 месеца (Фигура 2).

Оплождането е външно и настъпва непосредствено след хвърляне на яйцата, когато мъжкият отделя сперма във водата. Зиготата притежава ясно изразена анимална и вегетативна половина. Клетъчните деления започват около 40 минути след оплождането. Първите деления са синхронни и без значителен растеж между циклите, водейки до формиране на купол от бластомери върху жълтърчната маса. До третия час след оплождането ембрионът навлиза в стадий бластула, характеризиращ се с формиране на бластодиск. Следва гаструлация (5 – 10 часа след оплождането), по време

на която настъпва интензивно клетъчно преместване и установяване на трите зародишни слоя – ектодерма, мезодерма и ендодерма. Появява се зародишният пръстен (germ ring) и ембрионалният щит (embryonic shield), който функционира като основен организационен център. Към края на гаструлацията се оформя основният план на тялото по предно-задната и гръбно-коремната ос. Около 10-ия час започва сегментацията на ембриона, изразена чрез формирането на сомити – метамерни блокове мезодермална тъкан, които ще дадат начало на мускулатурата и скелета. До 24-ия час се образуват основните структури: примитивно сърце, очни мехурчета, мозъчни везикули и първична хордомезодерма.



Фигура 2. Жизнен цикъл на *Danio rerio* (Jonathan M.W. Slack, 2013)

Излюпването настъпва обикновено между 48-ия и 72-ия час след оплождането. Ларвата е с дължина около 3 mm, запазва жълтъчната торбичка като източник на хранителни вещества и показва първи спонтанни движения. През този етап се развиват основните сетивни органи и започва функционирането на сърдечно-съдовата система. В рамките на първата седмица след излюпването жълтъчната торбичка се резорбира напълно, а ларвата преминава към активно хранене с външни източници. Наблюдава се удължаване на тялото, развитието на перките и диференциация на хрилните структури. Около третата седмица ларвите достигат дължина 6 – 8 mm и морфологично започват да наподобяват възрастните индивиди, но половите жлези все още са недоразвити. В този

период се оформят вторичните полови белези, като при мъжките се забелязва по-интензивно оцветяване и по-тънко тяло. Половата зрялост настъпва между 3-ия и 4-ия месец след излюпването, като този интервал може да варира в зависимост от хранителните условия и плътността на отглеждане. Възрастните достигат дължина 4 – 5 cm и са способни на редовно възпроизводство. При лабораторни условия *Danio rerio* може да живее между 3 и 5 години, като репродуктивната активност е най-висока през първите 12 – 18 месеца от живота.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Изследване на морфологичните изменения настъпващи при ембриони на *Danio rerio*, третирани с различни концентрации на ретинолова киселина.

Цел на изследването: Ретиноловата киселина (РК) е ендегенен морфоген, произхождащ от Витамин А, който играе важна роля в регулацията на генната експресия по време на ембриогенезата при гръбначните, основно чрез модулиране на транскрипцията на *Нох* гените. Нейният механизъм на действие включва свързване със специфични ядрени рецептори (RAR), които функционират като транскрипционни регулатори. Превишаването на физиологичните концентрации на РК предизвиква тератогенни ефекти, изразяващи се в аномалии на централната нервна система, лицево-челюстния апарат, слуховия апарат и други органи. *Danio rerio* представлява утвърдена моделна система за изследване на подобни ефекти поради бързото си развитие и прозрачност на ембрионите. При хора, експозицията на 13-цис-ретинолова киселина (изотретиноин) по време на бременност води до характерен синдром от малформации (микрогнатия, цепнатина на небцето и невронални дефекти).

Настоящият експеримент има за цел да:

1. Оцени морфологичните изменения в ембриони на *Danio rerio*, третирани с различни концентрации на РК.
2. Установи връзката между степента на наблюдаваните ефекти и концентрацията на приложената РК.

Материали и реагенти

- Възрастни екземпляри *Danio rerio*
- Среда за ембриони на *Danio rerio* (Zebrafish Embryo Medium)
- Ретинолова киселина (all-trans, стоков разтвор 10^{-4} M в DMSO)
- DMSO (диметилсулфоксид)
- Стъклени петрита (\varnothing 60 mm) – 4 броя
- Сифон и мрежест филтър за отделяне на ембриони
- Ембриони на *Danio rerio* в стадий „dome“ (4,3 часа след оплождане) или 30% епиболия

- Трикаин (Tricaine methanesulfonate) за анестезия
- Дисекционен микроскоп с камера
- Инкубатор с контрол на температурата (28°C)
- Автоматични микропипети и стерилни накрайници

Методика

1. Изолиране на ембриони

- Ембрионите се получават от синхронизиран размножителен цикъл на *Danio rerio* и се изолират в стадий „dome“ (30% епиволия, 4,3 hpf – hours post fertilization). Ембрионите се промиват внимателно в свежа ембрионална среда.

2. Приготвяне на работни разтвори на РК

- От изходния (стоковия) разтвор (10^{-4} M в DMSO) се приготвят следните разреждания в Zebrafish Embryo Medium:
 - 10^{-8} M: 1,0 μ L от изходния разтвор се добавя към 10 mL среда за ембриони
 - 10^{-10} M: 100 μ L от 10^{-8} M разтвора се добавя към 10 mL среда за ембриони
 - 10^{-11} M: 10 μ L от 10^{-8} M разтвора се добавя към 10 mL среда за ембриони
- За контролна група се използва само ембрионална среда, съдържаща същото количество DMSO, както в експерименталните варианти.

3. Третиране на ембрионите

- Във всяко стъкло петри (предварително надписано с концентрацията на РК) се добавят по 5 mL от съответния разтвор. Във всяко петри се поставят по 10 – 15 ембриона.

4. Инкубация

- Петритата се инкубират при 28°C за 24 – 26 часа. За да се предотврати фотодеградация на РК, инкубацията се извършва на тъмно.

5. Морфологичен анализ

- След приключване на периода на експозиция, ембрионите се анестезират с разтвор на трикаин и се подлагат на микроскопско наблюдение, като се обръща специално внимание на: цялостна морфология (дължина и извивка на телесната ос); структури на главата (размер на очите, развитие на предния и средния мозък); сомити (брой, форма и подредба). сърдечно-съдова система (наличие на перикарден едем (подуване около сърцето)) и пигментация и общо здравословно състояние. Заснемат се макроскопски изображения с цел документиране на фенотипните изменения. Наблюденията се продължават до етапа на излюпване.

6. Евтаназия

- След финализиране на анализа, експериментът се прекратява. Ембрионите се евтаназират хуманно съгласно установените протоколи, например чрез хипотермичен шок (поставяне върху лед) или свръхдоза анестетик.

Задача 2. Експериментално изследване на етанол-индуцирани морфологични аномалии при ембриони на *Danio rerio*.

Цел на изследването: Етанолът е един от най-разпространените и добре изучени човешки тератогени, чиято консумация по време на бременност води до тежки вродени дефекти, обединени под общото наименование Фетален алкохолен спектър от разстройства (FASD). Най-тежката форма, Фетален алкохолен синдром (FAS), се характеризира с пре- и постнатално забавяне на растежа, специфични черепно-лицеви аномалии и дисфункция на централната нервна система. *Danio rerio* се е утвърдил като подходящ модел за изследване на молекулярните и клетъчни механизми, лежащи в основата на FASD. Ембрионалното развитие при този вид е консервативно спрямо останалите гръбначни животни, а външното оплождане и прозрачността на ембрионите позволяват детайлно наблюдение *in vivo* на процесите на органогенеза. Екзогенното прилагане на етанол върху ембриони на *Danio rerio* индуцира спектър от дефекти, които са силно консервативни и проявяват поразителна прилика с тези при човека. Те включват микрофтальмия (малки очи) или циклопия, редукция на черепно-лицевите структури, дефекти в развитието на нотохордата и сомитите, както и аномалии в неврулацията и сърдечно-съдовата система. Счита се, че етанолът упражнява своя тератогенен ефект чрез интерференция с ключови сигнални пътища, включително тези на ретиноловата киселина и *Sonic hedgehog* (Shh), които са фундаментални за правилното формиране на тялото.

Целта на настоящия експеримент е да се определи влиянието на различни концентрации етанол върху морфогенезата на *Danio rerio*, като се регистрират и анализират настъпилите структурни изменения.

Материали и апаратура

- Сифон
- Мрежест филтър
- Среда за ембриони на *Danio rerio* (Zebrafish Embryo Medium)
- Абсолютен етанол (етилов алкохол, 50 мл за приготвяне на работни разтвори)
- Големи стъклени пипети
- Стъклени петрита (Ø 60 mm) – 8 броя
- Дисекционен микроскоп с камера
- Ембриони на *Danio rerio* в стадий 30% епиволия (n = 40)
- Инкубатор с контролирана температура (28°C)

Методика

1. Подбор на ембриони

- Избират се 40 морфологично нормални ембриона, намиращи се в стадий 30% епиволия (около 4,7 часа след оплождане при 28°C).

2. Подготовка на експериментални групи

- Приготвят се четири експериментални разтвора, всеки в отделно стъклено петри:
 - **Контролна група** – 5 mL стандартна среда за ембриони

- 1% етанол в среда за ембриони
- 2% етанол в среда за ембриони
- 3% етанол в среда за ембриони

3. Третиране (експозиция)

- Във всяко петри се поставят по 10 ембриона, след което петритата се инкубират при 28°C за период от 3 часа.

4. Пост-експозиционно култивиране

- След приключване на експозицията ембрионите се прехвърлят с помощта на пипета в нови петрита, съдържащи само стандартна среда за ембриони. Инкубацията при 28°C продължава до 48 часа след оплождане (hpf).

5. Морфологично наблюдение и документиране

- 24 часа след оплождането: Ембрионите се наблюдават под дисекционен микроскоп и се заснемат за анализ на ранните морфологични изменения. Документират се следните параметри: смъртност във всяка група; развитие на главата и очите (измерване на разстоянието между очите, наличие на микрофталмия/циклопия); форма на тялото и опашката (дължина, извивки); наличие на перикарден едем; цялостна морфология и стадий на развитие спрямо контролата.
- 48 часа след оплождането: Процедурата се повтаря, като се документира прогресията на дефектите и се обръща внимание на по-късни етапи от органогенезата (развитие на перки, челюсти, пигментация).

6. Анализ

- Резултатите се обобщават, като се сравняват морфологичните дефекти между различните концентрации на етанол и контролната група, за да се установи доза-зависим ефект.

Задача 3. Изследване на дозо-зависимите ефекти на ултравиолетова (UV-C) радиация върху процеса на епиволия при ембрионалното развитие на *Danio rerio*.

Цел на изследването: Ембрионът на *Danio rerio* представлява изключително подходяща моделна система за изучаване на гаструлационните движения при гръбначните организми. Важен морфогенетичен процес по време на гаструлацията е епиволията – координирано движение, при което бластодермата се разпростира, за да обгърне изцяло жълтъчната клетка. Докато инволюцията и конвергенцията се задвижват от миграцията на дълбоките бластомери, епиволията е уникален процес, медиран от цитоскелетни пренареждания, основно на микротубули, в специализирана структура, наречена жълтъчен синцитиален слой (Yolk Syncytial Layer, YSL). Молекулярните механизми, контролиращи епиволията, остават частично изяснени. Известно е, че ултравиолетовата радиация, по-специално в UV-C спектъра (около 254 nm), предизвиква увреждане на нуклеинови киселини и може да наруши динамиката на цитоскелета. Предишни изследвания са показали, че облъчването на ембриони на *Danio rerio* с UV-C светлина селективно инхибира епиволията. Това води

до характерен фенотип с незатворен бластопор, докато формирането на предните аксиални структури често остава сравнително незасегнато.

Целта на настоящия експеримент е да се установи количествена връзка между дозата на приложената UV-C радиация и степента на забавяне или спиране на епиболията. Ще се направи опит да се определи критичната доза радиация, която води до видими нарушения в процеса на епиболия, и да се характеризира морфологичният фенотип на облъчените ембриони.

Материали и апаратура

- Прясно оплодени яйца на *Danio rerio*
- Среда за ембриони (Zebrafish Embryo Medium)
- UV крос-линкер CL-1000 (дължина на вълната 254 nm)
- Стъклени петрита (Ø 60 mm) – минимум 3 броя
- Инкубатор с контролирана температура (28°C)
- Дисекционен микроскоп

Методика

1. Подготовка на ембрионите

- Оплождането на яйцата се извършва сутринта.
- Отбират се новооплодени зиготи в пре-2-клетъчен стадий (преди първото делене), с ясно изразена жълтъчна маса и компактен бластодиск.
- Ембрионите остават в техния хорион до момента на експозиция.

2. Експериментални групи и UV експозиция

- **Група I (ниска доза)** – 15 ембриона, облъчени с UV доза 1,8 mJ/cm² (кратко време на експозиция).
- **Група II (средна доза)** – 15 ембриона, облъчени с UV доза 3,6 mJ/cm² (двойно време на експозиция спрямо група I).
- **Контролна група** – 15 ембриона, поддържани в стандартна среда без UV експозиция.
- Ембрионите се поставят в петрита с минимално количество среда, за да се гарантира равномерно облъчване, и се излагат на UV светлина при зададените параметри в CL-1000 крос-линкера.

3. Пост-експозиционно култивиране

- Веднага след облъчването, всички петрита се напълват с достатъчно количество стандартна среда за ембриони.
- Ембрионите се инкубират при 28°C до достигане на стадий гаструлация и по-нататъшно развитие.

4. Наблюдение и документиране

- Мониторира се скоростта и степента на епиболията в различните групи.
- Отбелязват се морфологични отклонения, като непълно затваряне на бластопора, промени във формата на тялото и аномалии в осевото развитие.

Ембрионално развитие при земноводни (*Xenopus laevis*). Изследване на възможността за индукция на партеногенеза при яйца от жаба (*Rana ridibunda*)

Xenopus laevis (Африканска ноктеста жаба) (Фигура 1) е един от основните моделни организми в биологията на развитието и еволюционната биология. Тя е широко използван модел за изследване на процесите на ранната ембриогенеза, клетъчна диференциация и органогенеза, тъй като оплождането и развитието ѝ протичат извън тялото на майката, което позволява директно наблюдение и лесно манипулиране на ембрионите.



Фигура 1. *Xenopus laevis* (Гладка ноктеста жаба) (J. Smith, 2019)

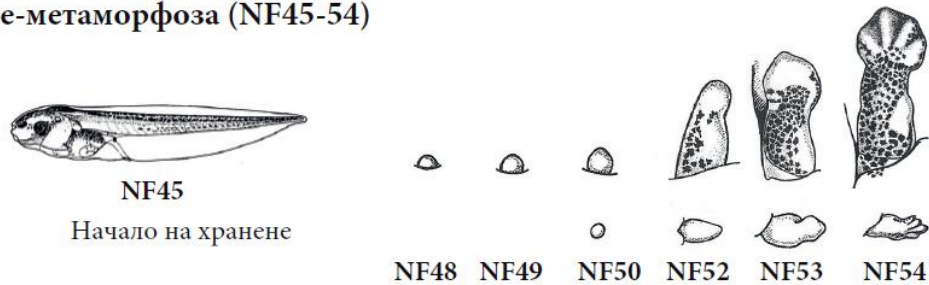
ЖИЗНЕНИЯТ ЦИКЪЛ

Жизненият цикъл на *X. laevis* е типичен за земноводните. Той включва оплождане, ембрионално развитие, ларвен период (попова лъжичка) с метаморфоза и възрастен индивид (Фигура 2). Оплождането е външно: женските индивиди снасят яйцата си във водата, където те биват оплодени от сперматозоиди на мъжките непосредствено след отделянето им. Яйцата се освобождават обикновено поединично, понякога на групи по 3 – 4, като общият им брой може да достигне до 15 000. Към момента на снасяне яйцеклетката е блокирана в метафаза II на мейозата. Проникването на сперматозоида предизвиква завършването на мейозата и образуването на зряла яйцеклетка и полярно телце. Яйцеклетката на *Xenopus* се характеризира с ясно изразена полярност и асиметрично разпределение на клетъчните компоненти. Горната, по-тъмно пигментирана част, бедна на жълтък, се нарича анимална хемисфера, докато долната, по-светла и богата на жълтък, е вегетативната хемисфера. Разпределението на информационни РНК (иРНК) и белтъци също е неравномерно между двете хемисфери, което предопределя съдбата на клетките по време на развитието. Оплождането може да се осъществи навсякъде върху анималната хемисфера, но мястото на проникване на сперматозоида има решаващо значение за установяването на ембрионалната ос. Именно то определя бъдещата дорзално-вентрална полярност на ембриона.

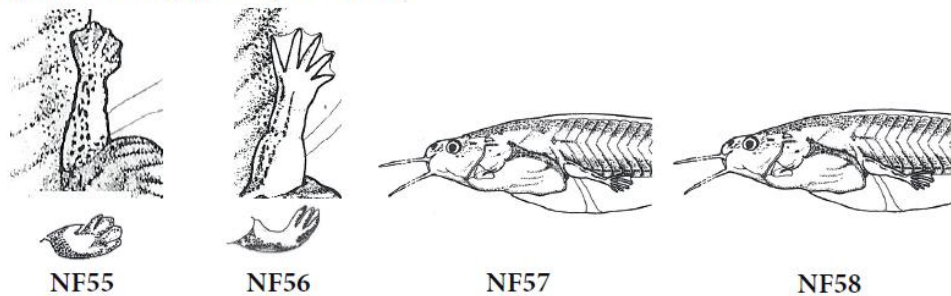
Ранно развитие



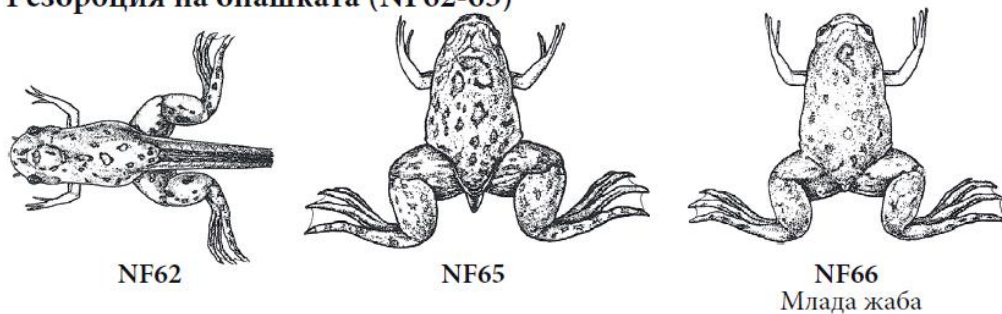
Пре-метаморфоза (NF45-54)



Про-метаморфоза (NF54-58)



Резорбция на опашката (NF62-65)



Фигура 2. Жизнен цикъл на *Xenopus laevis*

ЕМБРИОНАЛНО РАЗВИТИЕ

Това е периодът от формирането на зиготата до излюпването на ларвата. Ембрионите преминават последователно през бластулация, гаструлация, неврлация, органогенеза и формиране на опашка. Първото делене е меридионално и преминава през мястото на навлизане на сперматозоида, разделяйки ембриона на два еднакви бластомера. Второто делене също е меридионално, но перпендикулярно на първото, в резултат на което се формират четири клетки. Третото делене е екваториално, но

изместено към анималния полюс. В резултат на последователните деления се образува многоклетъчна структура, в която клетките са с различни размери и потенциал. След 12 – 13 клетъчни деления се формира бластула – куха сферична структура, съдържаща кухина, наречена бластоцел. Гаструлацията е един от най-важните етапи от ембрионалното развитие на *Xenopus laevis*. Чрез инвагинация, инволюция и епиволия се формират трите зародишни слоя: ектодерма, мезодерма и ендодерма. По време на неврулацията се формира нервната тръба, предшественик на централната нервна система. Паралелно с това се формират неврални гребени, които дават началото на пигментни клетки, периферни нерви и др. След неврулацията трите зародишни пласта започват да се диференцират и да формират зачатъците на всички тъкани и органи. В края на този етап ембрионът придобива удължена форма, развива зачатъци на опашка и мускулатура, които му позволяват да се движи.

ПОСТЕМБРИОНАЛНО РАЗВИТИЕ

След излюпването от яйцето ембрионът преминава в стадий на свободно живееща попова лъжичка. Поповите лъжички се излюпват за 3 – 4 дни (стадии NF22-27) в зависимост от температурата (оптимална температура около 22 – 25°C) и започват да се хранят след 5 – 7 дни (от стадий NF45). Метаморфозата на поповата лъжичка във възрастна жаба е една от най-удивителните трансформации в целия животински свят. В предметаморфната фаза (от стадий NF48) се развиват зачатъци на крайници, като се започва със задните, които формират стави и пръсти по време на метаморфозата. Метаморфозата завършва с резорбция на опашката при NF62-66. След метаморфозата младата жаба продължава да расте, докато достигне полова зрялост (6 – 18 месеца). Процесът се контролира от хормоните на щитовидната жлеза (тироксин).

ПАРТЕНОГЕНЕЗА

В природата, яйцеклетката се активира от навлизането на сперматозоид, който предизвиква освобождаването на калциеви йони и стартира ембрионалното развитие. Партеногенезата (от гръцки: *parthenos* – девствен, и *genesis* – раждане) е форма на безполово размножаване, при която ембрионалното развитие започва от неоплодена яйцеклетка. Този процес имитира оплождането чрез външен стимул, който активира яйцеклетката да се дели. Партеногенезата бива два основни типа: апомиксис и аутомиксис. При апомиксиса диплоидният хромозомен набор се запазва, не се осъществява мейоза. Среща се при някои растения и безгръбначни. При аутомиксиса протича мейоза, след което диплоидността се възстановява, най-често чрез сливане на яйцеклетката с едно от полярните телца или чрез дубликация на хромозомите преди първото делене.

Партеногенезата е широко разпространена в животинския свят, но почти не се среща при бозайниците в естествени условия. В природата се среща често при безгръбначни (напр. пчели, мравки и оси (където от неоплодени яйца се развиват търтеите – мъжки индивиди); листни въшки – циклична партеногенеза; нематоди като *Caenorhabditis elegans* в стресови условия). Партеногенезата е основният метод за размножаване при около 70 вида гръбначни, предимно влечуги (някои гущери като скалните гущери от род *Cnemidophorus*, комодски варан, змии като *Boa constrictor*);

някои риби (напр. акула-чук, зебровата акула, риба-трион); амфибии (редки случаи при жаби като *Rana temporaria*), птици (пуйки, кокошки – спонтанна партеногенеза). Естествената партеногенеза не е възможна при бозайниците поради феномена, наречен геномен импринтинг. Това е епигенетичен механизъм, при който определени гени се експресират само ако са унаследени от бащата, а други – само ако са унаследени от майката. За нормалното развитие на бозайник е абсолютно задължително наличието и на двата родителски генома.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Изследване на възможността за индукция на партеногенеза при яйца от жаба (*Rana ridibunda*)

Биологично, оплождането инициира каскада от събития, включително рязко повишаване на вътреклетъчната концентрация на калциеви йони (Ca^{2+}). Тази промяна в вътреклетъчната концентрация на калциеви йони е основният сигнал, задействащ клетъчното делене и ембрионалното развитие. В лабораторни условия партеногенезата при жаби може да бъде индуцирана от три основни типа стимули (електрофизиологични, химични и физични). Електрофизиологичните включват кратки импулси, водещи до калциев приток. Химичните използват съединения, които модулират калциевата хомеостаза, фосфорилирането на протеини или разграждането на циклин В. Физичните стимули се състоят в контролирани температурни, осмотични или механични въздействия. В зависимост от начина на индукция, полученият индивид може да бъде хаплоиден или диплоиден. Успехът на партеногенезата зависи от качеството на яйцата (свежи, зрели), метода на активация и околната среда (температура 20 – 23°C, рН 7.4).

Необходими материали:

- Биологичен материал: полово зрели женски жаби *Rana ridibunda*
- Човешки хорионгонадотропин (hCG)
- L-цистеин
- Активиращи агенти: калциев йонофор А23187 или йономицин; етанол (96%)
- NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, HEPES, NaHCO₃
- DMSO
- HCl и NaOH
- рН-метър
- Стъклени или пластмасови петрита
- Пипети за пренасяне на яйца
- Спринцовки (1 ml) и игли (27G)
- Дисекционен микроскоп
- Електропоратор: Апарат за прилагане на електрически шок
- Центрофуга

Приготвяне на основни разтвори:

- **10X Модифициран разтвор на Барт (MBS):** Концентриран разтвор. За 1 литър: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 10 mM HEPES. pH се коригира на 7.4. Стерилизира се чрез филтриране и се съхранява в хладилник.
- **1X и 0.1X MBS:** Приготвят се чрез разреждане на 10X MBS с дестилирана вода.
- **2% разтвор на L-цистеин:** Приготвя се непосредствено преди употреба. 2 g L-цистеин се разтварят в 100 ml 0.1X MBS. pH се коригира до 8.0 с NaOH.

Методика

12. Хормонална стимулация

- Инжектирайте женската жаба с 500 – 800 единици hCG в дорзалния лимфен сак.
- Поставете жабата в съд с 1X MBS при температура 16 – 18°C. Овулацията и снасянето на яйца ще започват след около 12 – 16 часа.
- Внимателно съберете прясно снесените яйца (които са слепени в групички) в петри с 1X MBS.
- Прехвърлете яйцата в прясно приготвен 2% разтвор на цистеин (pH 8.0) и разклатете внимателно. След 3 – 5 минути желеподобната обвивка ще се разтвори и яйцата ще се отделят едно от друго.
- Промийте яйцата 4 – 5 пъти с голям обем 0.1X MBS, за да отстраните напълно цистеина, който е токсичен за ембрионите.

13. Активация на яйцеклетките (Индукция на партеногенеза)

- **Метод 1: Химична активация с калциев йонофор** – Пригответе активиращ разтвор като добавете калциев йонофор A23187 или йономицин към 0.1X MBS до крайна концентрация 1 – 5 µM. Потопете обезжелезинените яйца в активиращия разтвор за 1 – 3 минути. Бързо отстранете активиращия разтвор и промийте яйцата 3 – 4 пъти с 0.1X MBS. Прехвърлете яйцата в чисто петри с 0.1X MBS.
- **Метод 2: Физична активация с електрически шок** – Поставете яйцата в камера за електропорация, пълна с 0.1X MBS. Приложете кратък електрически импулс (напр. 40V за 0.2 секунди). Прехвърлете яйцата в чисто петри с 0.1X MBS.

14. Наблюдение на развитието (Хаплоидни ембриони)

- Инкубирайте третираните яйца при 18 – 23°C. Ако активацията е успешна, до около час ще се забележи леко завъртане на тъмния пигмент на върха на яйцето. След около час и половина ще започне и първото клетъчно делене.
- По този начин се получават хаплоидни ембриони – те имат само половината от нужната генетична информация (само тази от майката). Те ще се развиват, но ще проявят дефекти и ще загинат преди или малко след излюпване.

15. Възстановяване на диплоидния набор

- За да се получат жизнеспособни диплоидни ембриони, трябва да се блокира завършването на мейоза II веднага след активацията.
- **Метод с високо налягане:** Поставете активираните яйца в камера за налягане, пълна с 1x MMR. Повишете налягането до 6000 – 7000 psi и го задръжте за 6

минути. Високото налягане деполимеризира микротубулите на делителното вретено и пречи на второто мейотично делене. Бавно освободете налягането и прехвърлете яйцата в петри с културална среда.

- **Метод със студов шок (алтернативен):** Прехвърлете активираните яйца в петри с 0.1X MBS, предварително охладено до 4°C. Инкубирайте на студено за 6 – 7 минути. Върнете яйцата обратно на стайна температура (18 – 22°C) в прясна културална среда.

Задача 2. Проучване влиянието на литиевият хлорид върху развитието на ранни ембриони от *Rana ridibunda*.

Настоящият експеримент има за цел да изследва тератогенните ефекти на литиевия хлорид (LiCl) върху ранното ембрионално развитие на *Rana ridibunda*. Литият е известен със способността си да инхибира ензима гликоген синтаза киназа-3β (GSK-3β), който е важен регулатор в сигналните пътища, определящи дорзално-вентралната ос на ембриона. Третирането на ембриони (преди 64-клетъчен стадий) с литиев хлорид води до дорсализация. Дорсализацията представлява разширяване на дорзалната тъкан за сметка на вентралната, което се изразява в образуването на дорзална устна на бластопора по целия периметър на ембриона. В някои случаи, това може да доведе до формиране на ембриони с радиална симетрия, с множество оси на симетрия и нарушена органогенеза.

Необходими материали:

- Яйца и сперматозоиди от *Rana ridibunda*
- 10% разтвор на Steinberg
- 0.3 M разтвор на литиев хлорид (LiCl) в 0.1x MBS.
- MBS (Modified Barth's Saline) среда
- Пинсети (заточени)
- Две големи стъклени петрита

Методика

1. In vitro оплождане

- Оплодете яйцата на *Rana ridibunda in vitro*, като използвате суспензия от сперматозоиди.

2. Отстраняване на желатиновата обвивка

- Подберете здрави ембриони, които все още не са достигнали 32-клетъчен стадий.
- Премахнете желатиновата обвивка внимателно с помощта на заточени пинсети.
- Поставете ембрионите в 10% разтвор на Steinberg, за да ги предпазите от увреждане.

3. Третиране с литиев хлорид

- Разделете здравите ембриони на две групи.
- Експериментална група: Прехвърлете 3/4 от ембрионите в петри, съдържащо 0.3 М литиев хлорид в 0.1 х МBS.
- Контролна група: Прехвърлете останалите ембриони в петри с 10% разтвор на Steinberg.

4. Инкубация

- Инкубирайте ембрионите при температура 18 – 20°C за 10 минути, като разбърквате разтвора внимателно, за да осигурите равномерно третиране.

5. Промиване и култивиране

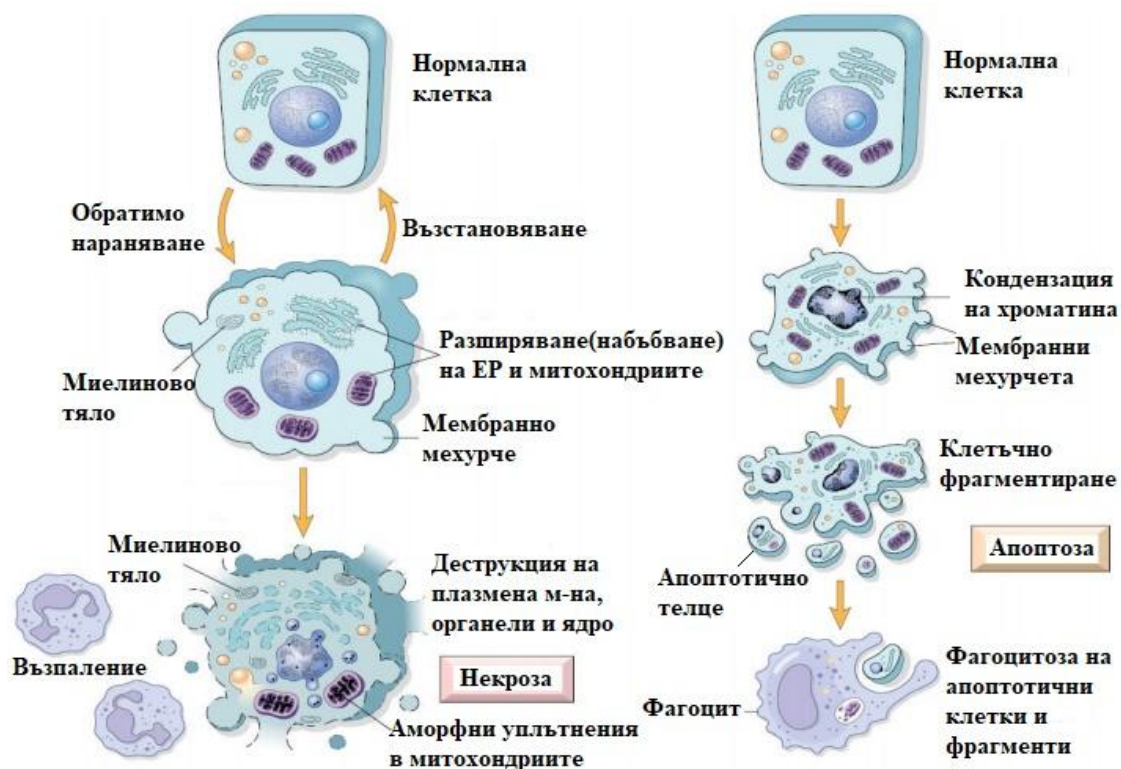
- След инкубацията, промийте добре третираните ембриони и ги прехвърлете в петри със свеж 10% разтвор на Steinberg за по-нататъшно развитие.

6. Наблюдение

- При достигане на стадий ранна гастрюла отчетете настъпилите морфологични промени и ги сравнете с резултатите от контролната група.

Програмирана клетъчна смърт (апоптоза) при развитие на организма. Методи за детекция на апоптоза

Развитието на многоклетъчните организми е изключително сложен и прецизно контролиран процес, включващ клетъчно делене, миграция, диференциация и програмирана клетъчна смърт (апоптоза). При ембриогенезата на бозайниците апоптозата се проявява на много ранен етап – още по време на диференциацията на вътрешната клетъчна маса – и продължава да играе ключова роля през целия ембрионален период. Тя е от съществено значение за морфогенезата и функционалното съзряване на различни органи и тъкани, като допринася за премахването на излишни, неправилно разположени или увредени клетки. Значението на клетъчната смърт е установено първоначално в ембриологията и тератологията (изучаването на вродени аномалии). Днес е известно, че този процес е от голямо значение не само за развитието, но и за стареенето, имунния отговор, защитата от инфекции и патогенезата на злокачествените заболявания. Нарастващият научен интерес е насочен към изясняване на молекулярните механизми, които определят съдбата на клетката (да оцелее или да умре), както и да разграничат формите на клетъчна смърт – апоптоза, некроптоза, пироптоза и автофагия (Фигура 1).



Фигура 1. Схематично представяне на морфологичните изменения при некроза и апоптоза (Saunders, 2010)

КЛАСИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМИ НА КЛЕТЪЧНАТА СМЪРТ

Клетъчната смърт се класифицира в различни типове въз основа на морфологичните характеристики и биохимичните процеси, които я съпътстват. Двата основни типа са некроза (непрограмирана клетъчна смърт) и програмирана клетъчна смърт (апоптоза).

Некрозата (от гръцки: *nekrōsis* – умъртвяване, смърт) е вид клетъчна смърт, която настъпва при тежко и необратимо увреждане на клетката и която се отличава с това, че не е резултат от контролирани вътрешноклетъчни механизми, а представлява пасивен процес, предизвикан от екстремни външни или вътрешни фактори. Процесът е хаотичен, разрушителен и е резултат от загуба на основни структурни и метаболитни функции. Всяко въздействие, което е достатъчно интензивно, за да причини остро метаболитно разстройство и структурна дезинтеграция, може да доведе до некроза. Основните причини за некроза може да са физични (механична травма, изгаряне, измръзване, високо налягане, радиация), химични (киселини, основи, тежки метали, токсини, отрови), биологични (бактерии, вируси, паразити, гъбички и техните токсини), исхемия (прекъсване на кръвоснабдяването, недостиг на кислород и хранителни вещества) или имунологични (автоимунни реакции). В повечето случаи началният момент е липсата на адекватно енергийно производство от митохондриите, което бързо води до нарушаване на всички зависими от АТФ клетъчни механизми. Най-ранната и ключова стъпка в некрозата е спадът на нивата на АТФ в клетката. АТФ-зависимите йонни помпи (Na^+/K^+ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза) спират да функционират. Това води до натрупване на Na^+ в клетката (осмотично навлизане на вода и клетъчно набъбване) и повишаване на Ca^{2+} във вътреклетъчното пространство (активиране на разрушителни ензими – фосфолипази, протеази, ендонуклеази). Фосфолипазите разграждат липидите в мембраната, а активираните протеази разрушават цитоскелета. Митохондриалната мембрана губи своята цялост, което допълнително намалява производството на АТФ. Повишеното ниво на Ca^{2+} и мембранната нестабилност водят до разкъсване на лизозомите и освобождаване на хидролитични ензими, които разграждат протеини, нуклеинови киселини и други клетъчни компоненти. При митохондриална дисфункция и възпаление се отделят големи количества реактивни кислородни видове (ROS), които окисляват липиди, протеини и ДНК, ускорявайки разрушаването. Ядрото също претърпява характерни, необратими изменения, известни като ядрени лезии (пикноза, кариорексис и кариолиза). След като клетките са некротизирали, те предизвикват силна възпалителна реакция.

Програмираната клетъчна смърт (ПКС) е активен, генетично контролиран процес, при който клетките инициират собствената си смърт. Основната ѝ функция е да премахва клетки, които вече не са нужни, които са потенциално опасни или които са претърпели непоправими увреждания. Този механизъм е от изключително значение за ембрионалното развитие (например премахване на междупръстните ципи), поддържане на тъканната хомеостаза, предотвратяване на туморогенеза и имунна регулация. За разлика от некрозата, ПКС не предизвиква възпаление. Тя се разделя на няколко морфологични типа, като най-добре проучени са апоптозата (Тип I) и автофагичната клетъчна смърт (Тип II).

- **Апоптоза (Тип I ПКС):** Апоптозата, често наричана „клетъчно самоубийство“, е най-характерната форма на ПКС. Тя се характеризира с прецизна последователност от морфологични и биохимични събития. Процесът започва със свиване на клетката,

но целостта на плазмената мембрана се запазва. Ядрото се свива, а хроматинът се уплътнява в плътни маси по вътрешната повърхност на ядрената мембрана преди фрагментирането му. Клетката се разделя на апоптотични телца – малки мембранно обвити образувания, съдържащи цитоплазма, органели и ядрени фрагменти. Тези телца бързо се фагоцитират от специализирани клетки (напр. макрофаги) без изтичане на клетъчно съдържание или индуциране на възпалителна реакция. Ключовият елемент в апоптозата е активирането на семейство протеази, наречени каспази. Има два основни пътя за активиране на тези каспази. Външен (екзогенен) път – инициира се от свързването на специфични лиганди (напр. FasL или TNF- α) към клетъчни повърхностни рецептори (Fas/CD95, TNFR), което води до активиране на инициаторни каспази (като каспаза-8). Вътрешен (ендогенен) път – задейства се от вътреклетъчен стресов сигнал (увреждане на ДНК, оксидативен стрес), който предизвиква освобождаване на цитохром с и други проапоптотични фактори от митохондриите. Това води до формиране на апоптозома и активиране на инициаторна каспаза (каспаза-9), която стартира каскада от ефекторни каспази (каспаза-3, -6, -7). Активираните каспази инициират каскада от събития, включително активиране на ендонуклеази, които разграждат ДНК на фрагменти с размер на нуклеозоми.

- **Автофагична клетъчна смърт (Тип II ПКС):** Автофагичната клетъчна смърт е уникален механизъм, при който клетката умира чрез процес на „самоизяждане“. Тя е морфологично и биохимично различима от апоптозата и некрозата, като основният ѝ белег е натрупването на автофагозоми и автофаголизосоми. Автофагията сама по себе си е нормален клетъчен механизъм за рециклиране на повредени или ненужни органели, белтъци и макромолекули, особено в условия на хранителен дефицит или метаболитен стрес. Проблемът възниква, когато автофагичният процес стане свръхактивен или неконтролиран. Процесът започва с промяна в баланса между mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) и AMPK (AMP-activated protein kinase). При изобилие на хранителни вещества, mTOR е активен и инхибира автофагията. При глад или енергиен дефицит, AMPK инхибира mTOR и активира автофагичните комплекси ULK1/2-ATG13-FIP200. Този сигнал стартира формирането на преавтофагозома (фагофор) – плоска мембрана, която постепенно се разраства и обгръща част от цитоплазмата, която включва органели като митохондрии, ендоплазмен ретикулум и други макромолекули. Фагофорът се разширява чрез комплекс от белтъци, включващ Beclin-1 (ATG6), VPS34 (клас III PI3-киназа) и ATG14L. Beclin-1 е ключов регулатор и може да бъде инхибиран от антиапоптотичния белтък Bcl-2. Фагофорът се затваря, образувайки двумембранна везикула, наречена автофагозома. Автофагозомата се транспортира по микротубули и се слива с лизозома (чрез действието на SNARE белтъци и Rab GTPази), образувайки автолизозома. Вътре в автолизозомата, хидролазните ензими от лизозомата разграждат вътреклетъчни компоненти до основни градивни елементи (аминокиселини, мастни киселини, нуклеотиди). Когато автофагията се инициира от прекомерен стрес или е прекалено активна, тя може да доведе до унищожаване на важни органели, което в крайна сметка води до клетъчна смърт. Този процес често се наблюдава при продължителен глад, оксидативен стрес или в отговор на някои медикаменти.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Идентифициране на апоптотична клетъчна смърт в ембрионални тъкани.

1. Въведение

В развиващия се ембрион се наблюдават и трите основни типа клетъчна смърт, но най-лесно се идентифицира апоптотичната клетъчна смърт. Поради тази причина настоящото изследване се фокусира върху методи за откриване на апоптоза в процеса на ембрионално развитие. Описаните подходи могат да се прилагат и за изследване на клетъчна смърт в тъканите на възрастни организми.

Методите, представени тук, позволяват наблюдение на ключови събития, свързани с клетъчната смърт, включително:

- фрагментация на ДНК;
- фагоцитоза на апоптотични клетки от клетки с фагоцитарна активност, съпроводена с активиране на клетъчно-повърхностни маркери;
- активиране на лизозомни ензими, участващи в разпознаването и деградацията на клетъчни молекули;
- промени в генната експресия.

В практическата част е представена методология за идентифициране на апоптоза, комбинирана с анализ на специфични генни продукти. Използваните подходи включват:

- *in situ* изследване на фрагментацията на ДНК;
- анализ на активирането на кисела фосфатаза;
- откриване на фагоцитни клетки чрез антиялото F4/80, разпознаващо зрели макрофаги и моноцити.

По време на клетъчната смърт количеството на определени генни продукти се променя. Например, циклин-зависимата киназа 5 (**CDK5**), е значително повишена в умиращите клетки, като нейната експресия може да бъде колокализирана с клетки, подложени на апоптоза.

2. Материали

2.1. Буфери

1. 1X PBS буфер: 0.85% NaCl, 0.02% KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4.
2. 1X PBST: 0.1% Tween-20 (polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) в 1X PBS.

2.2. Ембрионална фиксация и приготвяне на тъканни проби

2.2.1. 4% параформалдехид

За приготвяне на 50 mL фиксатор се смесват 2 g параформалдехид (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) с 25 mL DEP-H₂O (1 mL диетил пирокарбонат [Sigma] в 1 L H₂O; разтворът престоива 1 час и се автоклавира за 1 час). Добавят се 5 mL 10 M NaOH и 5 mL 10X PBS. Разтворът се разбърква при 55 – 65°C (не повече от 65°C) в продължение на 2 часа, след което се филтрира през 0.45 µm филтър. Регулира се рН до 8.0 и се долива с DEP-H₂O до 50 mL. Съхранява се при 4°C до 1 седмица.

2.2.2. Подготовка на покривни стъкла

Вариант 1 – поли-L-лизин покритие

Чисти предметни стъкла се поставят в автоклавиран метални рамки и се потапят последователно в 0.2 M HCl, DEP-H₂O и ацетон (по 30 секунди всяко). Сушат се в камина 2 часа, след което се потапят в разтвор от 50 mg поли-L-лизин (Sigma) в 1 L 0.01 M Tris, рН 8.0, за 5 минути. Оставят се да се сушат за една нощ в камина. Използват се до 4 седмици.

Вариант 2 – Vectabond покритие

Чисти предметни стъкла се поставят в автоклавиран метални рамки и се потапят в разтвор от 7 mL Vectabond в 350 mL ацетон за 5 минути. Изплакват се с dH₂O или DEP-H₂O (по 30 секунди няколко пъти) и се оставят да изсъхнат на въздух за една нощ. Използват се до 4 седмици.

2.3. Лизозомна активност

1. **Fast Garnet оцветяване:** Смесват се 0.6 mL NaNO₃ и 0.6 mL Fast Garnet stain, оставят се 5 минути, след което се добавят 22.8 mL предварително загрята dH₂O, 3 mL ацетатен разтвор и 3 mL нафтол.
2. **Цитрат-ацетон-формалдехиден разтвор:** Приготвя се смес с рН 3.6 в обемно съотношение 13:33:4.
3. **0.3% водороден пероксид:** 30% v/v H₂O₂ (Sigma) се разрежда с метанол.

2.4. Откриване на фагоцитни клетки

1. **1X PBST-желатинов разтвор:** 0.1% желатин (Fisher Scientific) в 1X PBST.
2. **5% млечен блокиращ разтвор:** 5% сухо мляко в 1X PBST-желатинов разтвор.
3. **F4 първично антитяло:** F4/80 (Serotec, Oxford, UK), разрежено 1:10 в 1X PBST-желатинов разтвор.
4. **Вторично антитяло:** 1:50 разреждане на белязан с пероксидаза F(ab)₂ фрагмент от козе анти-миши IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) в 1X PBST-желатин.

2.5. Нефлуоресцентно отчитане на ДНК фрагментация

1. **TdT разтвор:** Смесват се 76 µL реакционен буфер (S7100-2) с 32 µL TdT ензим (S7100-3), вортексират се и се държат на лед (до 6 часа).

2. **Stop/wash буфер:** 1 mL Stop/wash буфер (S7100-4) се разрежда в 34 mL дестилирана вода. Съхранява се при 4°C до 1 година.
3. **Methyl Green:** 0.5% Methyl Green в 0.1 M натриев ацетат, pH 4.0.

3. Методи

3.1. Ембрионална фиксация и приготвяне на тъканни проби

Миши ембриони могат да бъдат изолирани от бременни женски на различни етапи от бременността, в зависимост от периода на интерес. Ембрионите или отделни ембрионални тъкани се фиксират в 4% параформалдехид за една нощ при 4°C.

След фиксация пробите се прехвърлят в 20% захароза в 1X PBS за една нощ. Излишната течност се отстранява чрез филтърна хартия, след което пробите се поставят в алуминиеви форми, наполовина запълнени с OCT (TissueTek; Miles Inc. [Bayer Corp.], Tarrytown, NY). Замразяването се извършва чрез потапяне на формите в изопентан, охладен в течен азот.

Замразените проби се нарязват с криостат при -20°C, монтират се върху покривни стъкла, обработени с поли-L-лизин или Vectabond, и се съхраняват при -70°C до употреба. Преди всяка процедура пробите се оставят да достигнат стайна температура.

3.2. Детекция на фагоцитни клетки

Замразените срези се размразяват при стайна температура и се рехидратират последователно в 20%, 10% и 5% захароза в 1X PBS (по 5 минути всяка стъпка), след което се промиват с дестилирана вода (5 минути).

Ендогенната пероксидаза се инактивира чрез потапяне в 0.3% водороден пероксид, след което срезовете се промиват с дестилирана вода и 1X PBST (5 минути). Неспецифичното свързване на антителата се блокира с 5% сухо мляко в 1X PBST-желатинов разтвор за 30 минути при 37°C.

Срезите се промиват два пъти с 1X PBST-желатин (по 5 минути) и се инкубират с първично антитяло F4/80 за една нощ при 4°C. След двукратно промиване с 1X PBST-желатин (по 5 минути) се прилага вторично антитяло, белязано с пероксидаза, и се инкубира за 2 часа при стайна температура.

Несвързаните антитела се отстраняват чрез трикратно измиване с 1X PBST-желатин (по 5 минути). Имунореактивността се визуализира с DAB (2 минути), след което се извършва дооцветяване с хематоксилин (30 секунди). Срезове се промиват три пъти с дестилирана вода (по 1 минута) и се монтират с CrystalMount (Fisher). Фагоцитните клетки се оцветяват в тъмнокафяво.

3.3. Измерване на лизозомна активност

Активността на киселата фосфатаза се анализира с подходящ комплект от реактиви (Sigma, 181-A). Срезите се рехидратират чрез последователно потапяне в 20%, 10% и 5% захароза в 1X PBS (по 5 минути), след което се фиксират в цитрат-ацетон-формалдехиден разтвор за 30 секунди и се промиват с дестилирана вода (1 минута).

Обработват се с нафтол AS-BI фосфат и Fast Garnet stain за 1 час при 37°C. След промиване с течаща вода (2 минути) се оставят да изсъхнат на въздух (15 минути) и се оцветяват с метиленово синьо (1:100, за 1 – 2 минути в зависимост от тъканта). Изплакват се два пъти с дестилирана вода (по 1 минута). Активността на киселата фосфатаза се визуализира като червена фокална утайка.

3.4. Тест за фрагментация на ДНК – нефлуоресцентен метод

Фрагментацията на ДНК се открива чрез колориметричен TUNEL тест (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling), използвайки комплекта ApopTag Plus In Situ Apoptosis Detection Kit (Peroxidase, Oncor, S7101-KIT).

Срезите се третират с 0.3% водороден пероксид за инактивиране на ендогенната пероксидаза, след което се промиват с 1X PBS (5 минути) и внимателно се подсушават. Прилага се еквилибриращ буфер (13 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) и препаратите се покриват с пластмасови капачки, инкубирайки се 30 минути при стайна температура.

Буферът се отстранява и срезите се инкубират с TdT разтвор (10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) за минимум 60 минути при 37°C. След това се поставят в предварително загрят stop/wash буфер (37°C) за 30 минути, като на всеки 10 минути препаратите се потапят и изваждат от буфера.

След трикратно промиване с 1X PBS (по 5 минути) се прилага анти-дигоксигенин-пероксидаза (13 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$), покрива се с капачка и се инкубира 30 минути при стайна температура. Промива се четири пъти с 1X PBS (по 5 минути).

За визуализация на пероксидазната активност срезите се потапят в DAB за 20 минути при стайна температура, след което се промиват с дестилирана вода. Допълнително се оцветяват с Methyl Green (5 минути), изплакват се с дестилирана вода (30 секунди) и се дехидратират чрез последователно потапяне в n-бутанол (два пъти по 30 секунди) и толуен (три пъти по 2 минути), без да се допуска изсъхване.

Клетките, съдържащи фрагментирана ДНК, се оцветяват кафяво в ядрото, а в някои случаи – и в части от цитоплазмата.

Създаване на трансгенни моделни организми

Животни, в чийто геном има допълнителен или променен ген (трансген) се означават като трансгенни животни. Трансгенните животни и растения са важни инструменти в биологията на развитието, защото те позволяват гени на развитието да бъдат манипулирани и ефектите от тях да бъдат проучвани в целия организъм. Най-простите начини за изучаване на тези ефекти са чрез свръхекспресия на трансгена (експресия на гена в по-високи нива от обикновено) и ектопична експресия (експресия на гена на нетипично място или в неподходящ етап от развитието).

ТРАНСГЕННИ ТЕХНОЛОГИИ

Трансгенният организъм носи чужда ДНК, обикновено една и съща част от чуждата ДНК (трансгена) във всяка клетка. Чужда ДНК може да означава ДНК от различен вид или ДНК от същия вид, която е била манипулирана *in vitro*. Трансгенните организми се генерират чрез инжектиране на рекомбинантна ДНК в гамети или яйца, или трансформиратки соматичните клетки, които се използват за създаването на нови индивиди, такива индивиди се наричат първични трансформанти и те обикновено са химерни, т.е. трансгенът не присъства във всяка клетка. За да се получи трансгенен индивид, трансгенът трябва да е интегриран в зародишната линия (гаметите) на първичния трансформант. Едва в следващото поколение потомството, което е носител на трансгена, се счита за истински трансгенен организъм. В повечето организми, трансгените се интегрират на случаен принцип и могат да бъдат изследвани само доминиращи ефекти. При моделни организми като мишки, е възможно да се използва генно насочване чрез хомоложна рекомбинация. Този метод позволява целево модифициране на ендогенни (собствени) гени, което е важно за анализиране на рецесивни ефекти и фенотипи, свързани със загуба на функция (т.нар. „knockout“ модели). Чрез използването на сайт-специфични рекомбинантни системи (напр. Cre-loxP), могат да се създават условни мутанти. Тези модели позволяват активиране или инактивиране на даден ген в точно определена тъкан, в конкретен етап от развитието или в отговор на външен стимул. Това преодолява проблема с ембрионалната леталност, като дава възможност да се изследва функцията на гени, чиято загуба би била фатална в ранните етапи на развитието.

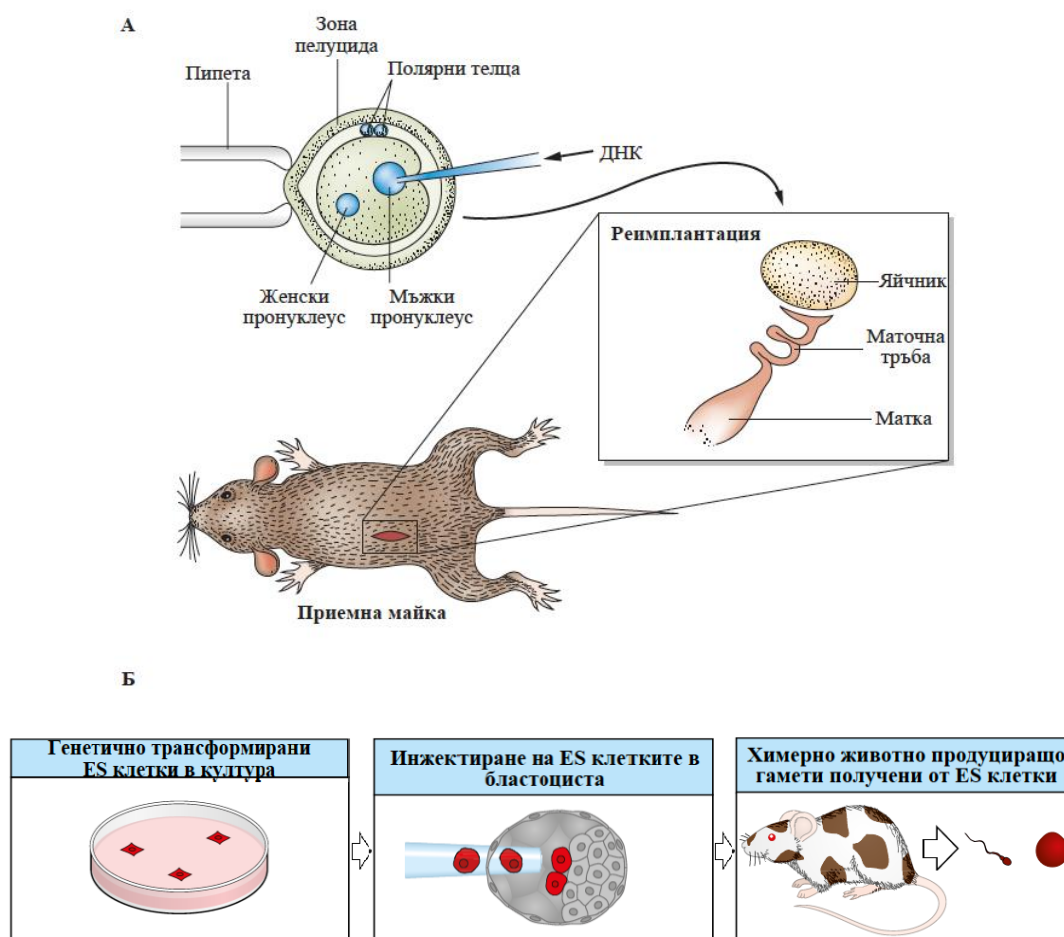
ТЕХНОЛОГИЯ ЗА ЯДРЕН ТРАНСФЕР

Технологията на ядрен трансфер е прецизен метод за създаване на трансгенни животни, осигурявайки хомогенна интеграция на трансгена във всяка клетка. Ядрото, съдържащо генетичния материал на яйцеклетката, се отстранява. Целта е да се създаде „празна“ клетка, чиято цитоплазма ще осигури среда за репрограмиране на новото ядро. Ядрото, което ще бъде донор, се изолира от соматична клетъчна култура. В лабораторни условия, тази клетъчна култура се трансформира с целевия трансген. Това може да стане чрез използване на вирусни вектори или електропорация. След трансформацията, клетките се култивират и селектират тези, които успешно са интегрирали трансгена.

Селектираните, трансгенни клетки се използват като донори на ядра за ядрения трансфер. Донорното ядро се въвежда в еноклеираната яйцеклетка. Това може да стане чрез микроинжектиране или електрофузия, която слива двете клетки. След сливането, получената реконструирана яйцеклетка се активира с електрически импулс или химически стимул, за да започне делене, имитирайки оплождане. Полученият ембрион се култивира *in vitro* до стадий на бластоцист, след което се трансферира в сурогатна майка.

ТРАНСГЕННИ МИШКИ

Трансгенни мишки могат да бъдат получени чрез микроинжектиране на екзогенна ДНК в мъжкия пронуклеус на оплодената яйцеклетка преди да се е осъществило сливането на ядрата (**Фигура 1А**). Чуждата ДНК не се интегрира, докато не се осъществят няколко клетъчни деления, така че първичният трансформант обикновено е химерен за присъствието на трансгена или може да притежава клетки локализирани на определени места съдържащи трансгена. Такива химерни мишки могат да се получат и чрез инфектиране на ранни ембриони с рекомбинантен ретровирусен вектор съдържащ трансгена. И двата метода водят до случайна интеграция.

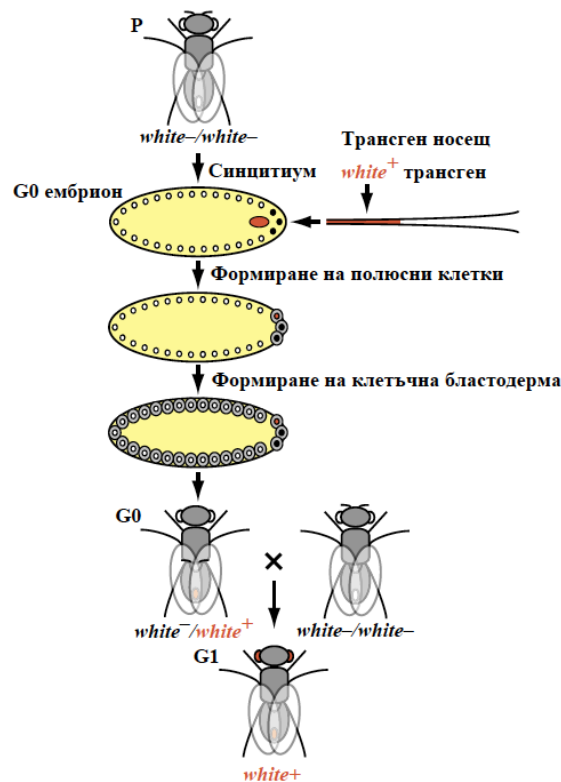


Фигура 1. Създаване на трансгенни мишки. (А) Създаване на трансгенна мишки чрез инжектиране на ДНК в пронуклеус на оплодената яйцеклетка. (Б) Създаване на химерна мишка чрез въвеждане на ембрионални стволови (ES) клетки в бластоцист

Друг често използван метод е чрез генетично трансформирани ембрионални стволови (ES) клетки, които се инжектират в бластоциста на друг миши ембрион. ES клетките стават част от вътрешната клетъчна маса и могат да доведат до всички видове клетки в мишката, включително зародишни клетки и гамети (**Фигура 1Б**). ES клетки позволяват както случайна интеграция, така и хомоложна рекомбинация. За да се получи чиста трансгенна линия, химерните мишки се кръстосват с мишки от див тип. Ако ES клетките са се интегрирали в зародишната линия (т.е. в гаметите), част от потомството ще бъде хетерозиготно трансгенно. Тези индивиди вече не са химерни, а са истински трансгенни мишки. Чрез по-нататъшно кръстосване могат да се получат и хомозиготни трансгенни мишки.

ТРАНСГЕННИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Един от основните методи за интегриране на ДНК в генома на *Drosophila* е транспозонно-медираната трансформация, използваща Р-елементи – естествени транспозони, които могат да се преместват в генома чрез ензима транспозаза. Процедурата включва инжектиране на два плаزمида в ембрионални зародишни клетки. Единият плазмид съдържа Р-елемент, модифициран да носи желанния ген, а другият кодира транспозазата. Ензимът изрязва Р-елемента с трансгена от първия плазмид и го вмъква на случайно място в генома на зародишните клетки. Тъй като модификацията е в зародишната линия, тя се предава на потомството. За идентифициране на успешно интегрираната ДНК често се използва маркерен ген, свързан с трансгена. Този маркер (напр. ген за цвят на очите или тялото) осигурява лесно забележим фенотип, улеснявайки откриването на трансгенните индивиди (**Фигура 2**).

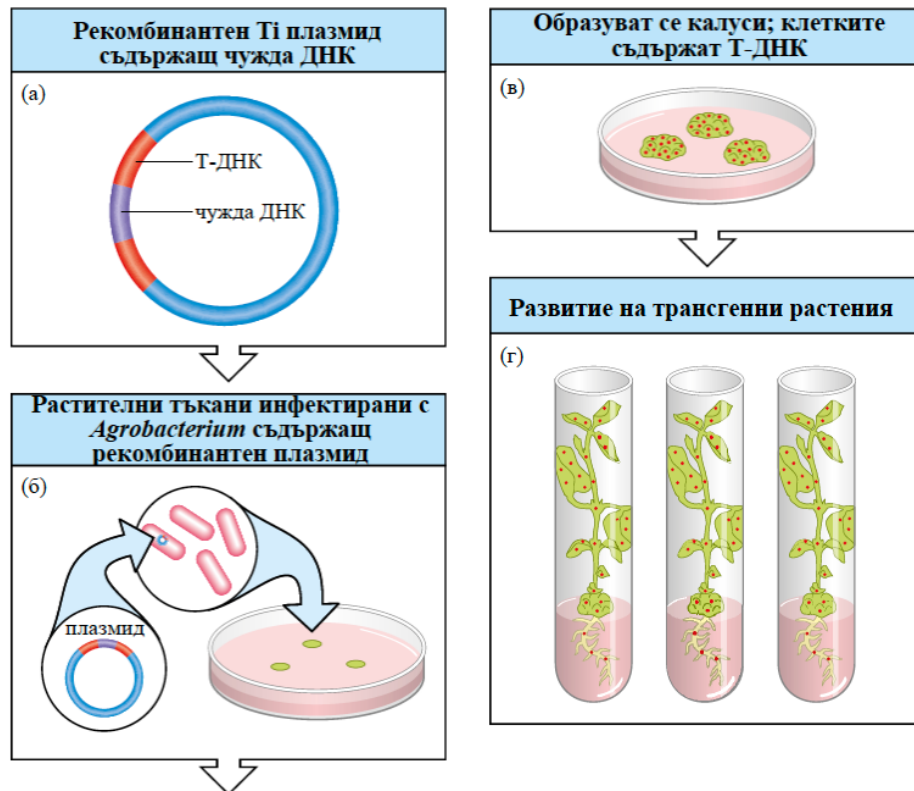


Фигура 2. Създаване на трансгенни дрозофили

Трансгенната ДНК white+ (червено) се инжектира в ембриони на *Drosophila* (G0) под 1 час, получени от родители с генотип white-/white-. За да се предаде на следващото поколение (G1), ДНК трябва да се интегрира в полусните клетки на ембриона, които формират зародишната линия. Ако трансформацията в зародишната линия е била успешна, те ще предадат трансгена на част от своето поколение (G1). Успешната интеграция се идентифицира лесно, тъй като маркерът white+ възстановява тъмния цвят на очите при трансгенните потомци.

ТРАНСГЕННИ РАСТЕНИЯ

Растенията притежават изключителна способност за регенерация. От малки парченца тъкан, култивирани в подходяща среда, може да се формира калус – маса от недиференцирани клетки. Чрез хормонална стимулация този калус може да се развие в напълно ново растение. Тази способност е в основата на създаването на трансгенни растения. Един от основните методи за растителна трансформация, наречен агроинфекция, използва почвената бактерия *Agrobacterium tumefaciens* (Фигура 3). Тази бактерия носи Ti-плазмид. Плазмидът съдържа T-ДНК сегмент, който се интегрира в растителния геном по време на инфекцията. Чрез генетична модификация, от Ti-плазмид се премахват гените, причиняващи тумори, и се вмъкват в T-ДНК желани чужди гени. След това генетично модифицираните клетки се регенерират в цялостно трансгенно растение. Всяка клетка на този нов организъм съдържа въведения ген, който може да бъде предаден на следващото поколение.



Фигура 3. Генериране на трансгенни растения с помощта на Ti плазмид на *Agrobacterium tumefaciens*

Един от утвърдените методи за въвеждане на чужда ДНК в растителни клетки е бомбардирането с частици, известно още като биолистика. При тази техника се използва т.нар. генен пистолет, който изстрелва микрочастици от тежки метали, най-често волфрам или злато, покрити с нуклеинова киселина. Частиците проникват през клетъчната стена и мембрана и доставят ДНК директно в цитоплазмата или ядрото на клетката. Биолистичният метод може да се прилага при почти всички растителни видове, включително такива, които са трудни за трансформация чрез *Agrobacterium tumefaciens*. Един от най-успешните примери за приложението ѝ е създаването на генетично модифицирана царевица, устойчива на вредители като царевичния стъблен пробивач (*Ostrinia nubilalis*).

Основният недостатък на тази технология, както и на други класически методи за растителна трансформация, е случайната интеграция на трансгена в генома на растението. Това може да доведе до вариабилна експресия на трансгена, позиционни ефекти или дори до нарушаване на важни ендогенни гени. През последните десетилетия развитието на прецизни технологии за редактиране на генома (CRISPR/Cas9, TALENs и ZFNs) значително разшири възможностите за целенасочени генетични модификации при растения. Тези нови подходи позволяват контролирана интеграция или редактиране на специфични гени, преодолявайки част от ограниченията на традиционните трансформационни техники.

ПРАКТИЧЕСКИ ЗАДАЧИ

Задача 1. Създаване на трансгенни растения *Arabidopsis thaliana* чрез агроинфекция (метод „floral dip“).

През последните две десетилетия бяха разработени различни методи за трансформация на *Arabidopsis thaliana*, медирана от *Agrobacterium tumefaciens*. Сред тях, методът „потопяне на съцветията“ (*floral dip*) е най-удобният и широко използван протокол за получаване на трансгенни растения *Arabidopsis thaliana*. При този метод, трансформацията на женските гамети се осъществява чрез потопяне на развиващи се съцветия на *Arabidopsis* за няколко секунди в 5% разтвор на захароза, съдържащ 0.01-0.05% (об./об.) Silwet L-77 и ресуспендирани клетки на *Agrobacterium*, носещи гените, които трябва да бъдат трансферирани. Третирани растения се оставят да произведат семена, които след това се засяват върху селективна среда за скрининг на трансформирани растения. Обикновено се постига честота на трансформация от поне 1%, като в рамките на 2 – 3 месеца могат да се генерират минимум няколко независими трансгенни линии само от две саксии с третирани растения (20 – 30 растения в саксия).

3) Материали, реагенти и апаратура

3.1. Бактериални щамове и вектори

- *Agrobacterium tumefaciens* щам(ове): ABI, GV3101, EHA105, LBA4404 или еквивалентен, трансформиран с бинарен вектор, носещ трансгена и селекционен маркер (напр. **nptII**/канамицин, **bar**/Basta, **hpt**/хигромицин).

3.2. Растителни материали

- Семена *A. thaliana* (напр. Col-0, Ws-0, Nd-0, No-0; или Ler-0).

3.3. Микробиологични среди и разтвори

- **LB течна среда**: 10 g триптон, 5 g екстракт от дрожди, 10 g NaCl / 1 L; 28°C инкубация. Антибиотици според вектора.
- **MS твърда среда** (за покълване/селекция): 4.3 g соли на Murashige & Skoog + 10 g захароза + 0.5 g MES + 8 g агар / 1 L; pH 5.7; автоклавирайте, охлаждайте до ~50°C и добавете филтър-стерилизирани селективни агенти. Концентрации за селекция:
 - Канамицин 50 mg/L
 - Хигромицин 25 mg/L
 - Фосфинотрицин (PPT/Basta) 10 mg/L (за селекция **in vitro**)
 - Карбеницилин 100 mg/L (за потискане на остатъчни агробактерии по семената)
- **5% (m/V) захароза** – приготвя се пряко за суспензията за дипинг.
- **Silwet L-77** – работна концентрация: 0.02% (V/V) (диапазон 0.01–0.05%, по-високи могат да са фитотоксични).
- **70% етанол и 50% белина/50% стерилна двукратно дестилирана вода/0.05% Tween-20** – за стерилизация на семена.
- **0.05% агароза** (стерилна) – за равномерно посяване на семена върху плочи.

3.4. Апаратура и консумативи

- Камера/оранжерия с къс ден (8 ч. светло/16 ч. тъмно, 20°C) и дълъг ден (16 ч. /8 ч., 20°C).
- Ламинарен бокс; центрофуга (4000 g); шишета/бекери 500 mL; филтри 0.2 µm; петрита 150 × 150 × 25 mm; мрежа от найлон/марля и ластички за покриване на почвата; пластмасово фолио за влажност; сито/торбички за събиране на семена.

4) Подготовка на растенията (до стадий подходящ за потапяне)

1. **Скарификация/стратификация на семена**: суспендирайте семената в 0.05% агароза и стратифицирайте 3 дни на 4°C в тъмно за равномерно покълване.
2. **Посяване върху почва**: 20 – 30 семена на саксия 4"×4"; покрийте почвата с найлонова мрежа/марля и фиксирайте с ластик (предпазва от разпиляване при обръщане по време на потапянето). Поддържайте висока влажност първите 2 седмици.
3. **Отглеждане**: 3 – 4 седмици на къс ден при 20°C, след което преместете на дълъг ден за индукция на цъфтеж. Избирайте здрави растения с 20 – 30 съцветия/саксия.
4. **Оптимизиране на фенологичния стадий** (по избор): отрежете първите цветоноси (bolts), за да стимулирате множество вторични съцветия; планирайте дипинг б – 8 дни след отрязването. Може да „оберете“ вече формирани шушулки (силики),

за да увеличите относителния дял на новоопрашените цветове и ефективността на трансформацията.

5) Подготовка на *Agrobacterium* и трансформационната суспензия

1. **Стартова култура:** инокулирайте единична колония в 5 mL LB с подходящи антибиотици; 28°C, 2 денонощия.
2. **Фидер култура:** прехвърлете в 500 mL LB + антибиотици; 28°C, 16 – 24 ч. до стационарна фаза ($OD_{600} \approx 1.5 - 2.0$).
3. **Събиране и ресуспендиране:** центрофугирайте при 4000 g, 10 min, стайна T; нежно ресуспендирайте пелетата в свеж 5% разтвор на захароза до първоначалния обем.
4. **Добавяне на Silwet L-77:** непосредствено преди потапянето прибавете до крайна концентрация **0.02% (V/V)** (напр. 100 μ L на 500 mL). По-високи концентрации могат да са токсични. Обем 400 – 500 mL е достатъчен за ≥ 6 саксии; обичайно се потапят ≥ 2 саксии/конструкт. За двойна трансформация смесете равни обеми от два *Agrobacterium* щама (всеки с различен конструкт) в 5% захароза + 0.02% Silwet; препоръчително е ≥ 4 саксии и/или двойно потапяне през 7 дни.

6) Потапяне на съцветията

1. **Потапяне:** обърнете саксията и потопете надземните части (включително розетката с късите аксиларни съцветия) за 10 секунди в суспензията. След изваждане отцедете за 3 – 5 секунди – трябва да остане видим филм от течност по повърхността на пъпките. Внимавайте всички съцветия да се потопят; при нужда наклонете растението. Прекомерното задържане в разтвора уврежда пъпките.
2. **Поддържане на висока влажност:** опаковайте растенията с пластмасово фолио (или покрийте) и ги поставете настрана за 16 – 24 ч. при умерена светлина и без прегряване. Остатъчната бактериална суспензия обеззаразете 1:1 с белина преди изхвърляне.
3. **След третиране:** отстранете покривките, върнете растенията в камера/оранжерия и ги отглеждайте нормално ~ 1 месец до узряване на семената. Прекратете поливането, когато обвивките покафенеят; сушете постепенно (прекалено ранно и/или бързо сушене води до абнормни ембриони/семена). Увийте изсъхващите растения с восъчна торбичка, за да улесните събирането на семена.

7) Събиране, съхранение и стерилизация на семена

1. **Събиране:** изтърсете сухите семена през сито в стерилен контейнер. Семената могат да се съхраняват няколко месеца на стайна температура или ≥ 1 година при 4°C преди селекция.
2. **Стерилизация** (работете само с половината от събраните семена – оставете резерв в случай на проблеми):
 - 70% етанол, 1 min, интензивно разбъркване;
 - 50% белина / 50% стерилна вода / 0.05% Tween-20, 10 min, вихрово разбъркване на всеки 2 min;
 - три измивания със стерилна вода; последната промивка трябва да е напълно бистра (без жълт оттенък).

3. **Посяване за селекция:** ресуспендирайте стерилните семена в 0.05% агароза (40 µL семена на 1 mL агароза) и разпределете 3 – 4 mL смес/петрита 150 × 150 mm с вече налята MS селективна среда + карбеницилин 100 mg/L и съответния селективен агент (виж 3.3). Подсушете плочите в ламинарен бокс, докато семената се фиксират към повърхността. Внимателно проверете селекционния маркер на конструкта, за да използвате правилния антибиотик/хербицид.
4. **Вернализация:** инкубирайте плочите 3 дни при 4°C на тъмно, после преместете в камера при непрекъсната светлина или дълъг ден.

8) Селекция и регенерация на първични трансформанти (T1)

1. Разпознаване на трансформанти (7 – 10 дни):

- На **канамицин + карбеницилин:** нетрансформантите покълват, но котиледоните бързо избледняват/хлоротични; истинските трансформанти имат зелени котиледони, формират истински листа и корени, които проникват в средата.
- На **Basta (PPT) + карбеницилин:** нетрансформантите пожълтяват след 2 – 3 седмици; трансформантите са зелени, жизнени.
- На **хигромицин + карбеницилин:** нетрансформантите могат да останат зелени >1 месец, но са дребни и не развиват нормални корени; истинските трансформанти растат и формират листа/корени. Общ белег: само трансформантите образуват истински листа. Карбеницилинът потиска *Agrobacterium* и може леко да инхибира първичния корен; след прехвърляне на MS без антибиотици/в почва кореновият растеж се възстановява.

2. **Потвърждение на селекцията:** прехвърлете подозрителните трансформанти на свежа селективна плоча за още 1 – 2 седмици, за да потвърдите устойчивия фенотип. След това пикирайте в добре навлажнена почва; покрийте 2 дни за висока влажност, после отглеждайте при светлина до добив на семена T2.

Алтернатива: селекция директно върху почва (само за bar/Basta)

- Посейте нестилизирани семена върху влажна почва; покрийте с прозрачно фолио до развитие на 4 – 6 листа. Започнете пръскане с глуфозинат амониум (търговски продукт, напр. Challenge 60) в разреждане ≈250 mg/L активно вещество, 2 пъти седмично, стартирайте 8 – 10 дни след сеитба, пръскайте от разстояние. Трансформантите ще оцелеят/растат, нетрансформантите ще станат хлоротични и загиват след 3 – 4 седмици. Оставайте малък отвор за въздушен обмен, за да се предотврати гъбна контаминация.

9) Очаквани резултати и времева рамка

- **Ефективност:** ≥1 трансформант на 100 семена е обичайна стойност; от две саксии (≈50 – 60 растения) обикновено се получават стотици независими линии. При Ler-0 ефективността е ~30% от тази при други екотипове.
- **Време:** от посяване до трансгенни растения – приблизително 3 месеца (отглеждане на растения: ~2 месеца; растеж на агробактерии и дипинг: ~3 дни; зреене на семената: ~1 месец; селекция: 10 – 14 дни).

10) Чести проблеми и решения (накратко)

- **Много цветове, малко семена:** често от прекомерно поливане/ниска осветеност; дренирайте тавите, увеличете интензитета на светлината и разрежете саксиите.
- **Липса на трансформанти:** проверете конструкта/щама, правилността на селективния агент и концентрациите.
- **Всички семена оцеляват при пръскане с Basta:** започнато твърде късно; стартирайте по-рано и поливайте отдолу, не директно върху почвата.

ПРИЛОЖЕНИЕ





Маркери на тялото

Black cells

Vc



Flybase ID: FBgn0261382

Хромозома: 2R

Цитогенетично

местоположение: 54F6

Местоположение на

секвенцията: N/A

ОПИСАНИЕ

Наличие на черни клетки при ларвите, какавидите и възрастните индивиди.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

Vc¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

При ларви с генотип *Vc1/+* броят на петната е по-малък, когато се отглеждат при високи температури.

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Най-голям брой черни клетки се наблюдават при ларвите в трети стадий.

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ

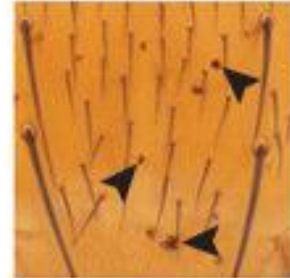


СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Не



Възрастен организъм



Див тип

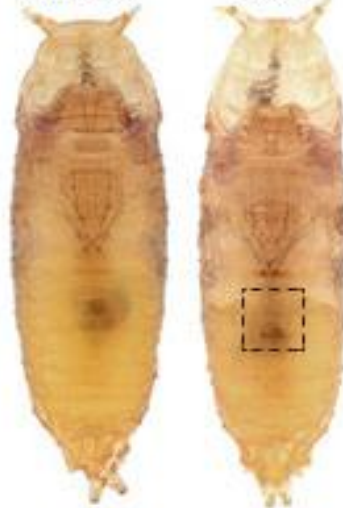
Bc¹/+



3[™] ларвен стадий

Див тип

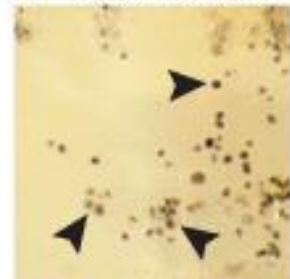
Bc¹/+



Какавида



3[™] ларвен стадий





Flybase ID: FBgn0000527

Хромозома: 3R

Цитогенетично местоположение: 93C7-D1

Рекомбинантна карта: 3-70.7

Местоположение на секвенцията: 3R:17,055,561..17,062,900 [-]

ОПИСАНИЕ

Тялото е много по-тъмно в сравнение с WT (дивия тип). Потъмняването е сравнително хомогенно, но при някои алели се наблюдават пигментни шарки по торакса.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

*e*¹

e^S

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Разликата е забележима още от появата на възрастния организъм и се увеличава с течение на времето. Потъмняването на крилата се увеличава до 72 ч. след излизането на възрастния организъм.

ПЕНЕТРАТНОСТ

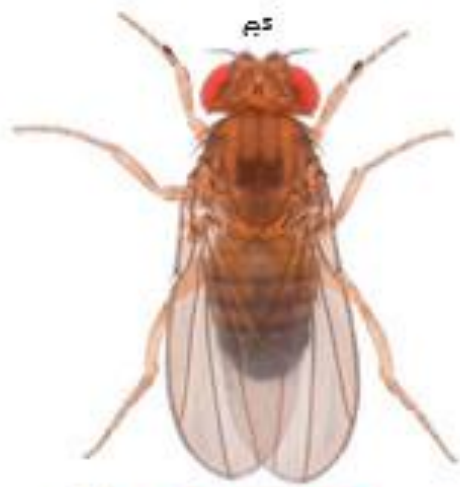
100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Съществуват няколко други мутации свързващи се с по-тъмно тяло.



Ден 3



Ден 2



Ден 1



Див тип



Flybase ID: FBgn0003158

Хромозома: X

Цитогенетично местоположение: 8A1-5

Рекомбинантна карта: 1-23.2

Местоположение на секвенцията: N/A

ОПИСАНИЕ

По-тъмна пигментация върху торакса наподобяваща тризъбец.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

ptg¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

По-силна проява при 19°C.

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

По-трудно се наблюдава при младите мухи, става по-видим с възрастта.

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

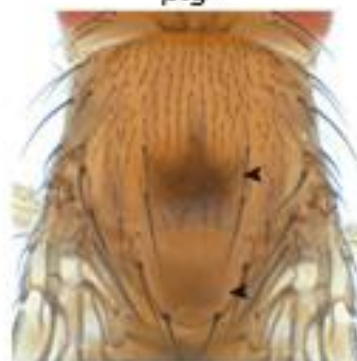
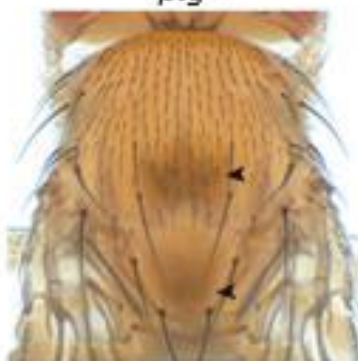
Моделът на тризъбец се появява в някои естествени популации.



Див тип

Ден 1
ptg¹

Ден 3
ptg¹





Flybase ID: FBgn0243586

Хромозома: 3R

Цитогенетично местоположение: 97C3

Рекомбинантна карта: 3-90.6

Местоположение на секвенцията: 3R:22,482,168...22,483,253 [+]

ОПИСАНИЕ

Ларвите, какавиди и възрастни са къси и набити.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

Tb¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Лесно е да се различат като ларви и какавиди, но е трудно при възрастните.



Див тип



Tb^{1/+}



Див тип
3^{тм} ларвен стадий



Tb^{1/+}



Див тип



Tb^{1/+}

Какавида



Flybase ID: FBgn0004034

Хромозома: X

Цитогенетично местоположение: 1A5

Рекомбинантна карта: 1-0.0

Местоположение на секвенцията: X:250,542..255,278 [+]

ОПИСАНИЕ

Пигментацията на кутикулата е много по-светла в сравнение с дивия тип, жълтеникава със светли косми (Тип-1 алели) или с тъмни (Тип-2 алели).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

*y*¹ Тип-1 алел

*y*² Тип-2 алел

y^{31d} Тип-2 алел

y^{93j} Тип-2 алел

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

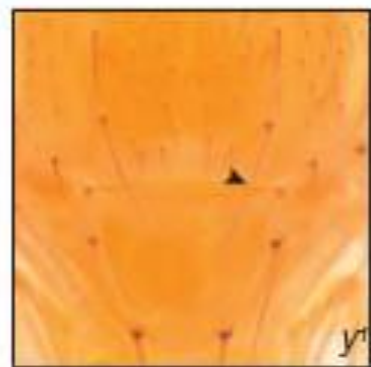
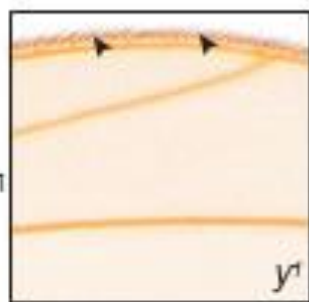
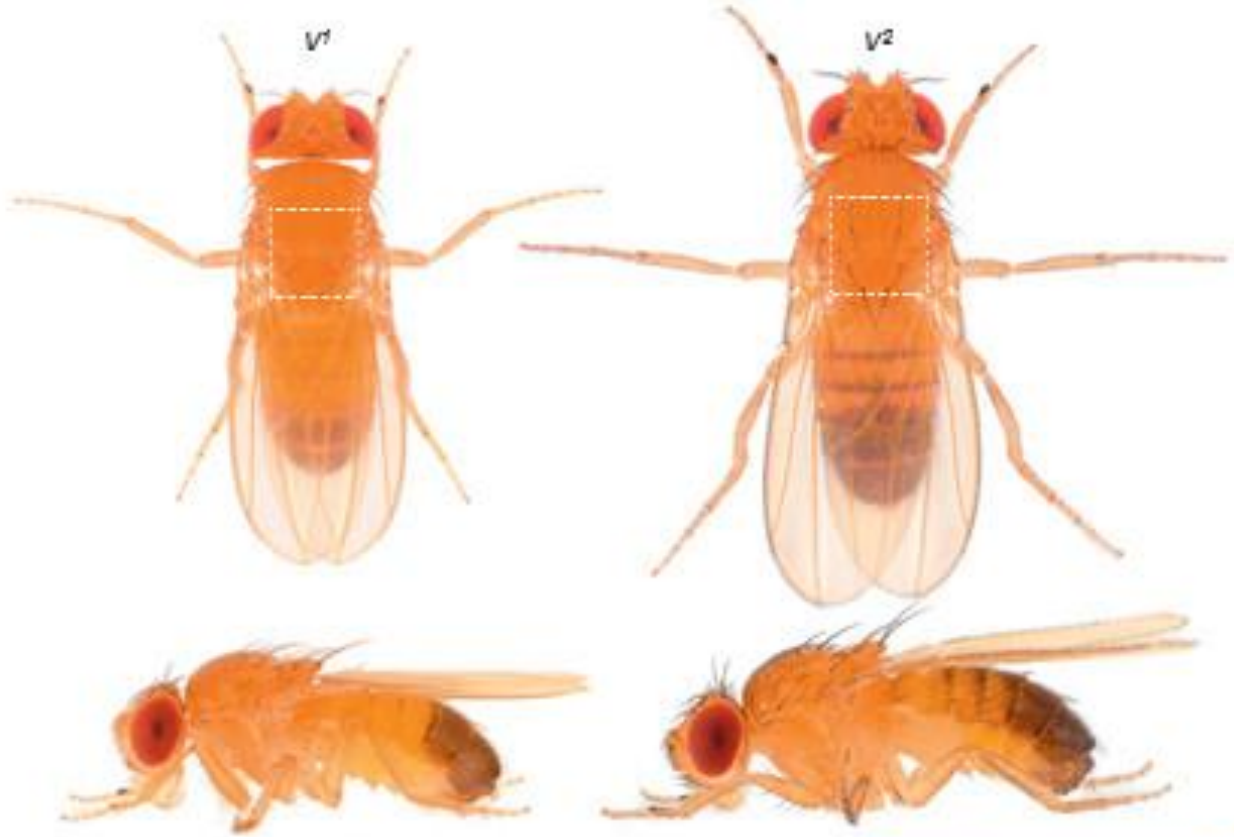
100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Не





Маркери на крилата

cut

ct



Flybase ID: FBgn0004198

Хромозома: X

Цитогенетично

местоположение: 7B4-6

Рекомбинантна карта: 1-20.0

Местоположение на секвенцията: X:7,503,181..7,572,892 [+]

ОПИСАНИЕ

Крилата са по-малки и тесни, със сериозни дефекти в предния край и липса на четинки.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

ct⁶

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

He

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

He

ПЕНЕТРАТНОСТ

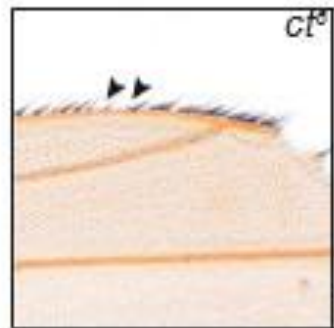
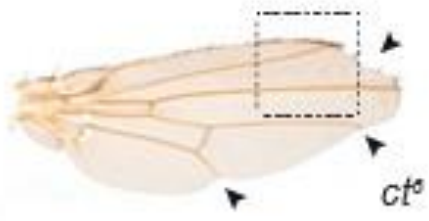
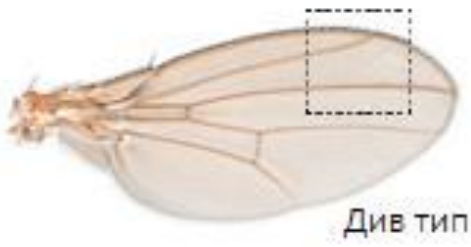
100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Notch – по-големи крила с удебелени вени;
Serrate – по-големи крила с ясно изразени назъбвания (инцизури) по ръба.





Flybase ID: FBgn000403

Хромозома: 2L

Цитогенетично

местоположение: 23A4-23B2

Рекомбинантна карта: 2-6.1

Местоположение на секвенцията: N/A

ОПИСАНИЕ

Крилата са извити нагоре и навън.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

cy¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

При 18°C фенотипът може да се припокрива с WT, с повишаване на температурата експресивността се увеличава.

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

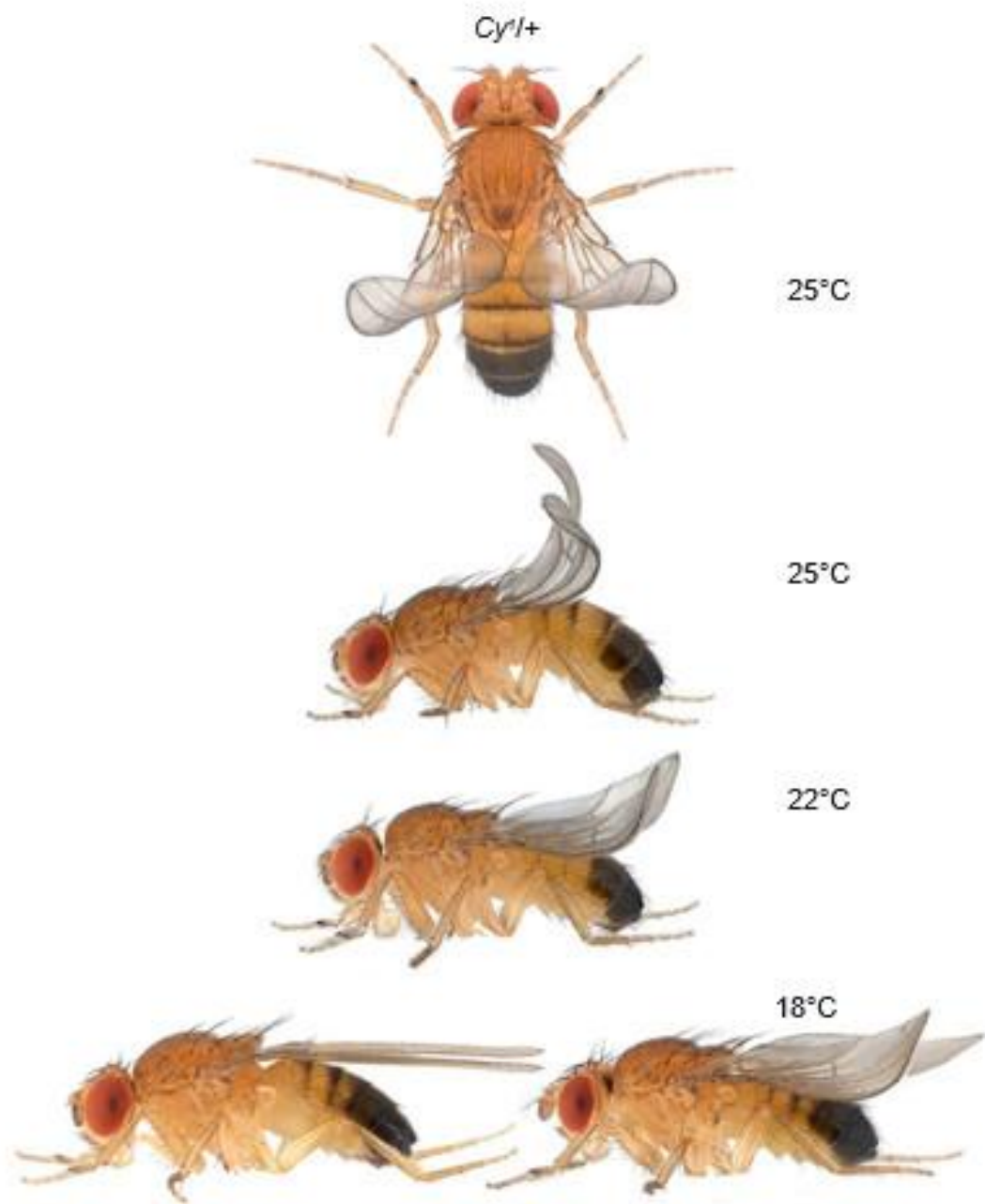
100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Curled (cu): рецесивен маркер; при температура под 20°C крилата са по-слабо извити нагоре и са почти успоредни на оста на тялото, за разлика от дивия тип (WT).



dumpy

dp



Flybase ID: FBgn0053196

Хромозома: 2L

Цитогенетично местоположение: 24F4-25A1

Рекомбинантна карта: 2-13.0

Местоположение на секвенцията: 2L:4,477,462..4,595,054 [-]

ОПИСАНИЕ

Крилата са много по-къси, скъсени са дистално.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

dp^{ov1}

dp^{lv1} рецесивен летален маркер в CyO и SM6

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Повишаването на температурата до 29°C води до допълнително намаляване размера на крилата

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Лесни за различаване от дивия тип.



25°C



29°C



Див тип



25°C



29°C

Див тип



29°C



Flybase ID: FBgn0002573

Хромозома: 3L

Цитогенетично

местоположение: 70A8

Рекомбинантна карта: 3-40.5

Местоположение на секвенцията: 3L:13,389,328..13,394,225 [-]

ОПИСАНИЕ

Липсват дорзални и латерални ръбове на крилото;
крилото придобива характерна тясна правоъгълна форма.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

Ly¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Лесни за различаване от
дивия тип.

Ly/+



Див тип



Ly/+



Flybase ID: FBgn0003975

Хромозома: 2R

Цитогенетично местоположение: 49E1

Рекомбинантна карта: 2-67.0

Местоположение на секвенцията: 2R:8,771,706..8,786,899 [+]

ОПИСАНИЕ

Крилата и халтерите са атрофирани.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

*vg*¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Размерът на крилото намалява с повишаване на температурата; фенотипът е силно модифицируем.

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Лесни за различаване от дивия тип.



25°C



Див тип



29°C



25°C



22°C



18°C



vg^f

Wingless

wg



Flybase ID: FBgn0004009

Хромозома: 2L

Цитогенетично местоположение: 27F1

Рекомбинантна карта: 2-21.9

Местоположение на секвенцията: 2L:7,307,161..7,316,265 [+]

ОПИСАНИЕ

Едно или понякога и двете крила липсват. Гръдният кош е уголемен и в страничен профил изглежда с двойна хълмова форма.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

wg¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

<100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Лесни за различаване от дивия тип





Маркери за форма и цвят на очите

Bar

B



Flybase ID: FBgn0000154

Хромозома: X

Цитогенетично

местоположение: 16A1

Рекомбинантна карта: 157.0

Местоположение на
секвенцията: N/A

ОПИСАНИЕ

Сложно устроените очи с по-малък размер.

Бъбрековидна форма на окоето при хетерозиготните женски.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

B^1 доминантен маркер за FM

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

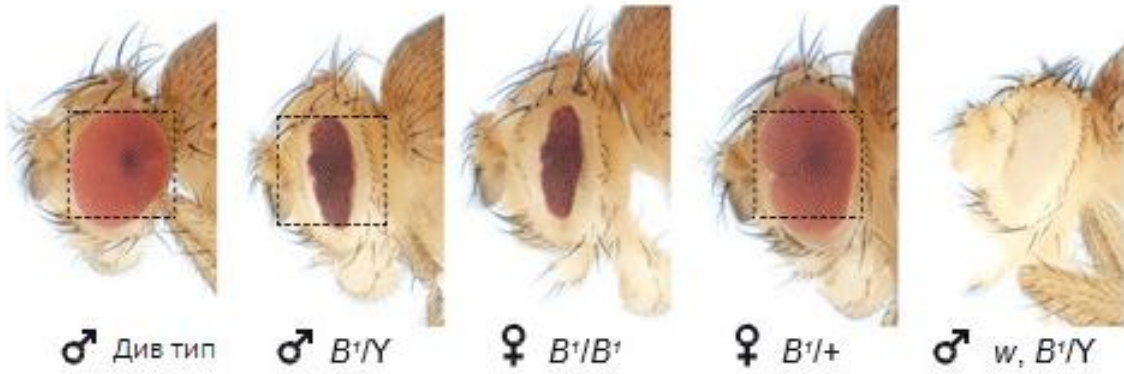
100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Лесни за различаване от дивия тип.



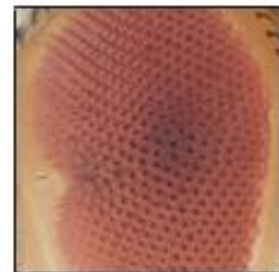
♂ Див тип

♂ B^1/Y

♀ B^1/B^1

♀ $B^1/+$

♂ $w, B^1/Y$





Flybase ID: FBgn0000492
Хромозома: 3R
Цитогенетично
местоположение: 99B3
Рекомбинантна карта: 3-
99.2 **Местоположение на**
секвенцията:
3R:25,382,109..25,391,007 [+]

ОПИСАНИЕ

Очите са редуцирани по размер до 15% от размера на очите при дивия тип.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

Dr¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

He

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

He

ПЕНЕТРАТНОСТ

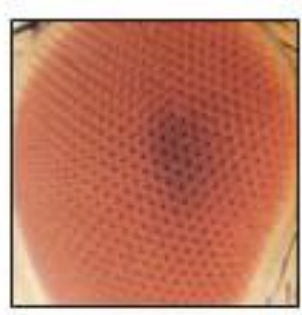
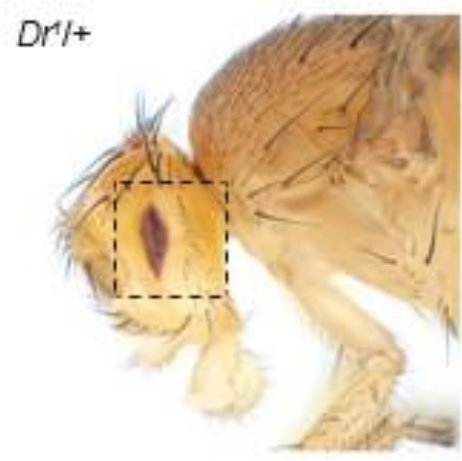
100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Var: Мъжките и хомозиготните женски са с по-големи очи с правоъгълна форма.



eyeless-dominant

ey^D



Flybase ID: FBgn0005558

Хромозома: 4

Цитогенетично

местоположение:102D45

Рекомбинантна карта: 4-2.0

Местоположение на

секвенцията:

4:718,315..741,787 [+]

ОПИСАНИЕ

Очите са по-малки по размер или напълно липсват. Ефектът не е билатерално симетричен. Главата е деформирана.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

ey^D

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Lobe: И двете очи имат подобен дефект.

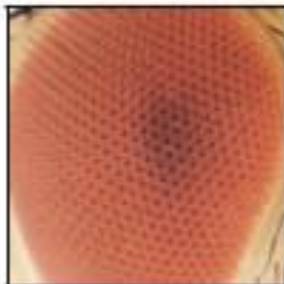
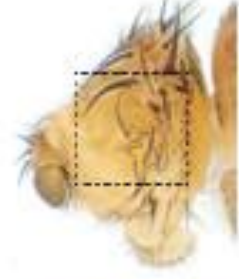


Див тип

ey^{D1+}

ey^{D1+}

ey^{D1+}



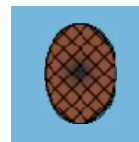
Див тип

ey^{D1+}



Brown

bw



Flybase ID: FBgn0000241

Хромозома: 2R

Цитогенетично местоположение: 59E2-3

Рекомбинантна карта: 2-104.5

Местоположение на секвенцията: 2R:19,415,328..19,426,016 [-]

ОПИСАНИЕ

Очите са светлокафяви при появата на възрастния организъм и потъмняват с течение на времето.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

bw¹

bw² по-тъмен и по-червен от *bw¹*

bw^D доминантен алел с *bw¹* фенотип

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Потъмняват с възрастта

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Claret, garnet, pink и *purple*



Ден 1

Ден 3

Ден 5

Див тип



bw¹





Flybase ID: FBgn0086348

Хромозома: 3L

Цитогенетично местоположение: 66D5

Рекомбинантна карта: 3-26.0

Местоположение на секвенцията: 3L:8,513,652..8,514,589 [+]

ОПИСАНИЕ

Очите са тъмнокафяви до почти черни.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

se¹

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

He

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Потъмняват с възрастта

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Нена: по-светлокафяви очи



Ден 1

Ден 3

Ден 5

Див тип

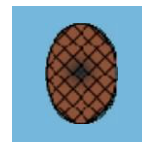


se¹



white

w



Flybase ID: FBgn0003996

Хромозома: X

Цитогенетично местоположение: 3B6

Рекомбинантна карта: 1-1.5

Местоположение на секвенцията: X:2,684,632..2,690,499 [-]

ОПИСАНИЕ

Цвета на очите може да бъде от оранжев до почти бял.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА АЛЕЛА

w¹¹¹⁸

w^a рецесивен маркер за FM7a и FM7c

w¹ рецесивен маркер за FM7i

Модифицирана версия на локуса *white*, наречена *mini-white*, често се използва като маркер за трансформация при трансгенеза при мухи с генотип „white“.

ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА

Не

ВЪЗРАСТОВА ЗАВИСИМОСТ

Не

ПЕНЕТРАТНОСТ

100%

ЕКСПРЕСИВНОСТ



СХОДНИ ФЕНОТИПИ

Бял цвят на очите може да се получи и при взаимодействието на мутацията *brown* с *cinnabar*, *scarlet* или *vermillion*.



Див тип



W¹¹¹⁸



W^e



W¹¹¹⁸, P{w⁺}

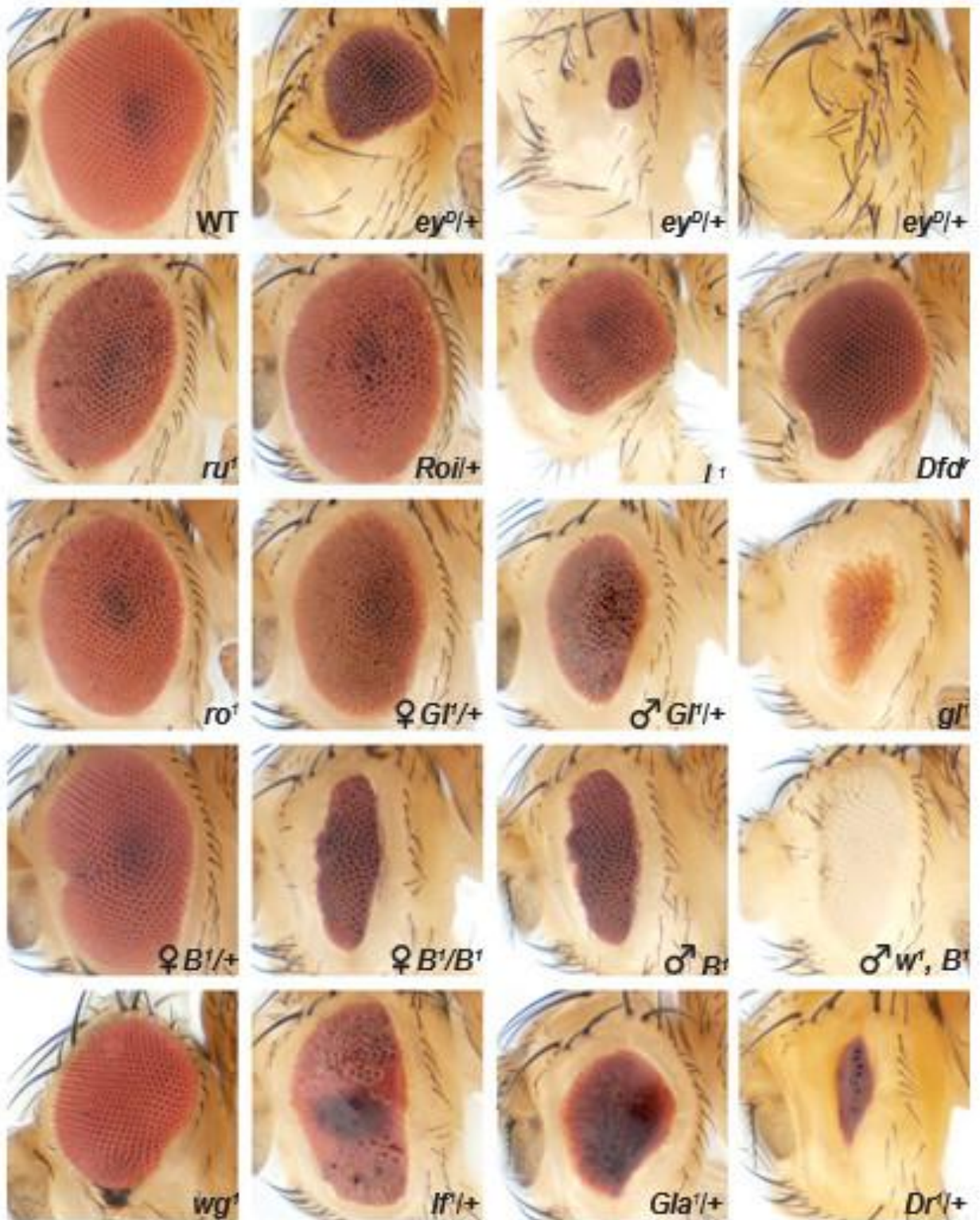


Обобщени маркери

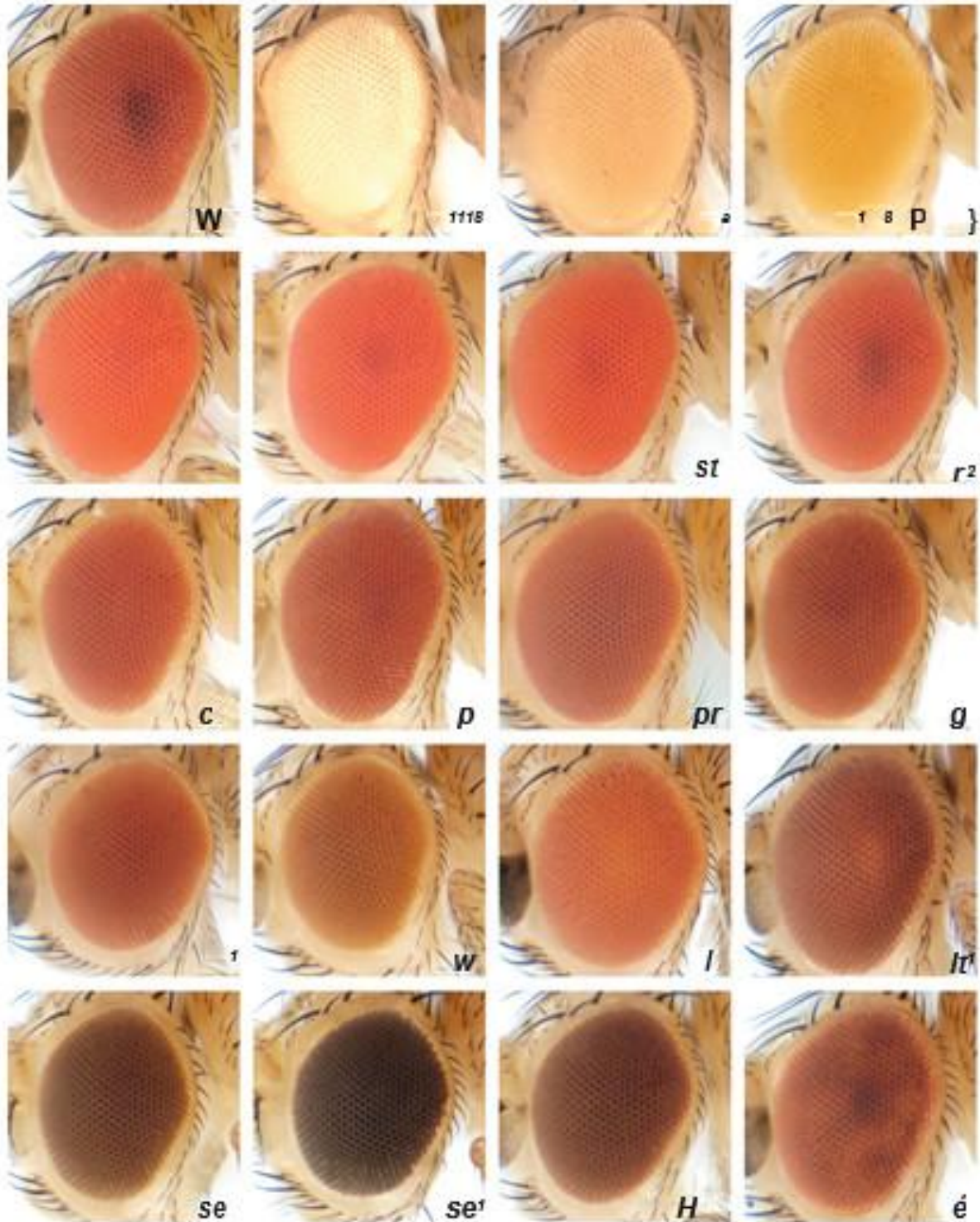
Thorax



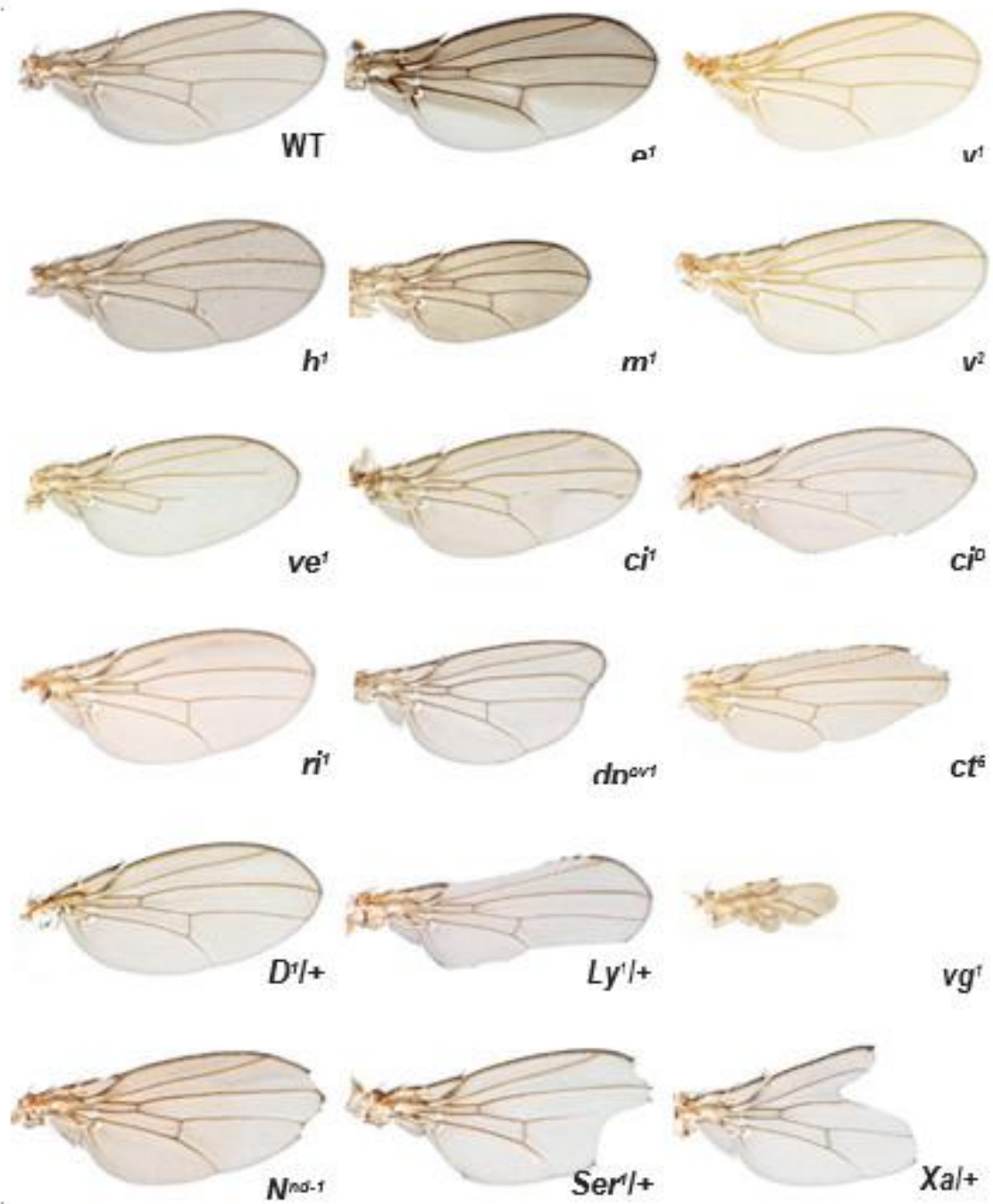
Форма на очите



Цвят на очите



Крила



Литература

- Altun, Z. F., Herndon, L. A., Wolkow, C. A., Crocker, C., Lints, R., & Hall, D. H. (Eds.). (2002 – 2024). *WormAtlas*. Retrieved from <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>
- Cebra-Thomas, M. (2004). *Experiments in Developmental Biology* [Online resource]. Swarthmore College. Retrieved from https://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/DB_lab.html
- Chyb, S., & Gompel, N. (2013). *Atlas of Drosophila Morphology: Wild-type and Classical Mutants*. Academic Press.
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental biology* (11th ed.). Sinauer Associates.
- Girard, L. R., Fiedler, T. J., Harris, T. W., Carvalho, F., Antoshechkin, I., Han, M., Sternberg, P. W., Stein, L. D., & Chalfie, M. (2007). WormBook: The online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D472–D475. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl894>
- Marí-Beffa, M., & Knight, J. (Eds.). (2005). *Key Experiments in Practical Developmental Biology*. Cambridge University Press.
- Parvathi, D. P. V., Amritha, A. S., & Paul, S. F. D. (2009). *Wonder animal model for genetic studies – Drosophila melanogaster: Its life cycle and breeding methods – A review*. Sri Ramachandra Journal of Medicine, 2(2), 33 – 38.
- Slack, J. M. W. (2013). *Essential developmental biology* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Tuan, R. S., & Lo, C. W. (Eds.). (2000). *Developmental biology protocols: Volume II (Methods in Molecular Biology, Vol. 136)*. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-065-9:3>
- Twyman, R. M. (2001). *Instant Notes in Developmental Biology*. BIOS Scientific Publishers.
- Tyler, M. S. (2001). *Developmental biology: A guide for experimental study* (3rd ed.). Sinauer Associates.
- Wolpert, L., Tickle, C., & Martinez Arias, A. (2019). *Principles of Development*. Oxford University Press.

