

Факторы, определяющие готовность бластоцист мышей к имплантации

И. Н. Вагина, С. В. Евсиков, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

*Изучали механизмы регуляции клеточной массы (количества клеток) у бластоцист мышей в условиях задержки имплантации, которую моделировали посредством переноса эмбрионов в яйцеводы самок нулевого дня псевдобеременности. Показано, что эмбрионы, отстающие в развитии после культивирования *in vitro*, в условиях задержки имплантации догоняют зародышей, развившихся *in vivo*, по числу клеток. Наблюдение за накоплением клеточной массы бластоцистами, развившимися из одного бластомера двухклеточного зародыша, и экспериментально полученными тетраплоидами показывают, что начало вхождения бластоцист в состояние покоя происходит в течение восьмого клеточного цикла и не зависит от абсолютного количества клеток или числа цитокинезов. Бластоцисты, развивавшиеся в условиях задержки имплантации из половинок эмбрионов с удвоенным объемом цитоплазмы, имели в среднем $70,5 \pm 2,4$ клеток. Это свидетельствует о том, что вхождение в состояние покоя зависит от достижения определенного ядерноцитоплазматического соотношения (ЯЦС). По-видимому, готовность бластоцист к имплантации определяется, в основном, двумя факторами: количеством клеточных циклов и ЯЦС.*

Введение. Культивированные *in vitro* или подвергшиеся микроманипуляциям доимплантационные эмбрионы обладают пониженной жизнеспособностью, поскольку к моменту имплантации часть бластоцист имеет уменьшенное количество клеток. Удлинение доимплантационного периода позволяет таким зародышам увеличить количество клеток перед имплантацией, а также приводит к тому, что доимплантационные зародыши входят в состояние диапаузы [1, 2]. Эмбриональная диапауза является нормальным состоянием при размножении некоторых видов млекопитающих и может быть индуцирована экспериментально. У мышей доимплантационный период возможно удлинить вследствие переноса бластоцист овариэктомированным [3] или неполовозрелым [4] самкам. В случае задержки имплантации у бластоцист появляется шанс удвоить количество клеток перед имплантацией [2].

Еще со времен первой работы Мак Ларен [5] обычно используется метод переноса трехдневных мышинных бластоцист в матку самок второго дня псевдобеременности («3→2»). Подобный асинхрон-

ный перенос обладает рядом преимуществ по сравнению с синхронным «3→3», (перенос трехдневных мышинных бластоцист в матку самок третьего дня псевдобеременности), поскольку обеспечивает дополнительные 24 ч, необходимые для достижения зародышами стадии готовой к имплантации бластоцисты. Более того, сообщалось о высокой степени выживания половинок эмбрионов при высокоасинхронных трансплантациях бластоцист в яйцевод самок мышей 0-го дня псевдобеременности [6]. Высокоасинхронный перенос моделирует, в некоторой степени, ситуацию задержки имплантации.

Цель нашего исследования состояла, в частности, в изучении влияния асинхронных пересадок на имплантацию и жизнеспособность ранних зародышей. Кроме того, мы попытались прояснить механизмы регуляции клеточной массы на доимплантационной стадии эмбриогенеза.

Также было важно определить, могут ли зародыши с экспериментально уменьшенным количеством клеток компенсировать такое отставание в условиях задержки имплантации. Для этого в эксперименте были использованы половинки зародышей, зародыши с уменьшенным вдвое ядерно-ци-

топлазматическим соотношением (ЯЦС) и зародыша, развивавшиеся в субоптимальных условиях *in vitro*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизмы, определяющие достижение бластоцистами стадии готовности к имплантации, заметно отличаются от действующих на более ранних стадиях эмбриогенеза мышей.

Материалы и методы. В качестве доноров зародышей использовали 1,5—3-месячных самок гибридных мышей B6D2F1 (BALB/c × C57Bl/6j). Самок суперувулировали внутривбрюшинным введением 7,5 МЕ сывороточного гонадотропина (PMSG) и через 48 ч — 7,5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина (hCG) и затем скрещивали с самцами линии C57Bl/6j. Факт покрытия устанавливали по наличию вагинальных пробок. День их обнаружения считали нулевым днем беременности. Зиготы вымывали из яйцеводов через 24 ч после инъекции hCG, освобождали от клеток кумулюса обработкой раствором гиалуронидазы (200 МЕ/мл), приготовленным на среде M2. Зародыши культивировали *in vitro* до стадии морулы и бластоцисты в среде M16 с добавлением 1 мМ L-глутамина и 100 мМ ЭДТА [7—9] под парафиновым маслом при 37 °С и 5 %-м содержанием CO₂ в воздухе.

В работе использованы четыре типа эмбрионов: 1) контрольные эмбрионы, развивавшиеся *in vivo* или *in vitro* с одноклеточной стадии; 2) диплоидные половинки эмбрионов (1/2 эмбриона), полученные прокалыванием плазматической мембраны одного бластомера двуклеточного зародыша; 3) тетраплоидные половинки эмбрионов, полученные при культивировании зигот *in vitro* в присутствии цитохалазина D (0,5 мг/мл) в течение 20 ч (такая обработка полностью блокирует деление зиготы, но не влияет на кариокинез; на двуклеточной стадии каждый обработанный цитохалазином D морфологически одноклеточный эмбрион содержит два диплоидных ядра [10]); 4) диплоидные половинки эмбрионов с удвоенным содержанием цитоплазмы (уменьшенное наполовину ЯЦС), получаемые микрохирургическим удалением одного из ядер у тетраплоидных половинок эмбрионов. Нормальное постимплантационное развитие таких эмбрионов было показано ранее [11].

Все микроманипуляции проводили в стеклянных чашках Петри с использованием микроманипулятора КМ-2 под микроскопом Axiovert 35. В работе применяли микроманипуляционную технику, предложенную Мак Гратом и Солтером [12] и модифицированную Цунодой [13].

Бластоцисты переносили в матку [14] или яйцевод [15] самок-реципиентов мышей линии

ICR, покрытых вазэктомированными или фертильными самцами этой же линии. До 10 эмбрионов переносили в одну псевдобеременную самку и 3—5 — в одну беременную. В случае, когда псевдобеременным реципиентам переносили бластоцисты, развившиеся из одного бластомера двуклеточного зародыша, в противоположный яйцевод переносили контрольные бластоцисты. На 16-й день беременности регистрировали количество резорбированных и живых плодов. Количество имплантированных определяли как сумму резорбированных и живых плодов. Трансплантированные гибридные эмбрионы различали среди линейных белых (ICR) по цвету глаз.

Для учета изменения количества клеток в бластоцистах трехдневные бластоцисты были разделены на две группы: часть использовали для подсчета количества клеток, остальных переносили в яйцевод самок 0-го дня псевдобеременности. Через три дня (перед имплантацией) бластоцисты вымывали из матки и подсчитывали количество клеток по методике Дыбана [16] с последующей окраской Гимза. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента и анализа χ^2 .

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены данные по выживаемости бластоцист мышей, перенесенных приемным матерям. Полученные результаты свидетельствуют о том, что место переноса эмбрионов псевдобеременным самкам («3→2», матка или «3→0», яйцевод) не влияло на выживаемость зародышей после переноса бластоцист, вымытых из маток мышей на третий день беременности. При этом следует отметить, что для полностью жизнеспособных бластоцист ни число имплантаций, ни выживаемость на постимплантационной стадии не могут быть повышены с помощью высокоасинхронных переносов. Повторная трансплантация зародышей, развивавшихся *in vivo*, служила отправной точкой при оценке трансплантированных зародышей после культивирования *in vitro* или зародышей, подвергшихся микроманипуляциям. После переноса бластоцист, развивавшихся *in vitro*, в яйцеводы самок нулевого дня псевдобеременности доля живых эмбрионов на 16-й день развития была такой же, как и при переносе бластоцист, развивавшихся *in vivo* (см. табл. 1). Половинки эмбрионов имели такой же процент имплантаций, как контрольные зародыши, перенесенные в противоположный яйцевод — 62 и 74 % соответственно. Однако доля выживших была значительно ($p < 0,001$) ниже для половинок эмбрионов (15 %), чем для контрольных (52 %). Возможно, пониженная жизнеспособность половинок зародышей вы-

Таблица 1
Выживаемость пересаженных бластоцист у самок-реципиентов

Реципиент, место пересадки	Тип эмбрионов, условия развития	Число беременностей к числу реципиентов (%)	Количество эмбрионов (только у беременных самок)		
			Пересаженных	Имплантировавшихся (%)	Живых на 16-е сут (%)
Псевдобеременные, матка	Бластоцисты, <i>in vivo</i>	17/18 (94)	171	132 (77)	91 (53)
Псевдобеременные, ПЯ и ЛЯ	Бластоцисты, <i>in vivo</i>	12/14 (86)	120	80 (67)	57 (48)
Псевдобеременные*					
ПЯ	Бластоцисты, <i>in vitro</i>		102	75 (74)	53 (52)
ЛЯ	1/2 Бластоцисты, <i>in vitro</i>	15/15 (100)	111	69 (62)	17 (15)
Беременные, ЛЯ	Бластоцисты, <i>in vivo</i>	15**/22 (68)	47	НО	31 (66)
То же	1/2 Бластоцисты, <i>in vitro</i>	7**/14 (50)	35	НО	10 (29)

П р и м е ч а н и е. Пересадку в матку осуществляли на 2-й день, в правый (ПЯ) или левый (ЛЯ) яйцеводы — в 0-й день; *как интактные, так и 1/2 бластоцисты пересаживали одной и той же самке-реципиенту; **число беременных реципиентов, имевших чужеродные эмбрионы; НО — невозможно определить.

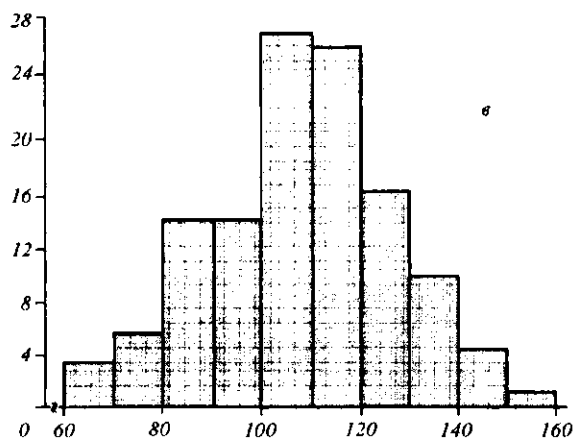
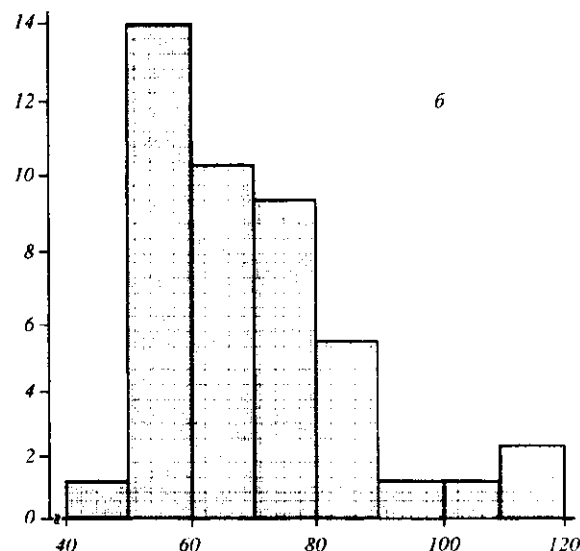
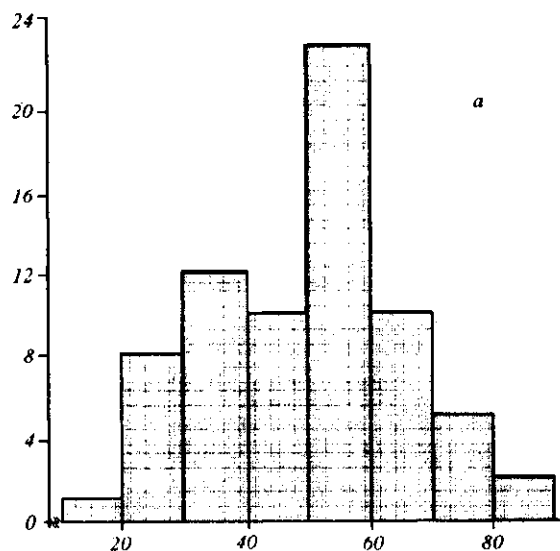
Таблица 2
Количество клеток у бластоцист до и через 3 дня после пересадки в яйцеводы псевдобеременных самок

Условия культивирования, тип эмбрионов	ЯЦС на 2-клеточной стадии	Бластоцисты на 96-й ч после введения hCG, %	Количество клеток у бластоцист на 96-й ч после введения hCG	Количество клеток у бластоцист на 190-й ч после введения hCG
<i>In vivo</i>	{2N/C}×2	90 [151/164]	60,5±1,4 [91] ^a	111,0±3,7 [18] ^d
<i>In vitro</i>	{2N/C}×2	75 [223/298]	38,7±0,9 [101] ^b	109,3±2,5 [58] ^d
<i>In vitro</i> , без ЭДТА	{2N/C}×2	82 [145/177]	28,2±0,7 [34] ^b	107,2±3,5 [35] ^d
<i>In vitro</i> , 1/2 эмбрионов	{2N/C}	73 [288/395]	17,8±0,8 [45] ^г	49,9±2,0 [40] ^e
<i>In vitro</i> , тетраплоиды	{4N/2C}	85 [67/79]	16,8±0,9 [18] ^г	51,9±3,8 [17] ^e
<i>In vitro</i> , 1/2 эмбрионов с уменьшенным ЯЦС	{2N/2C}	27 [64/238]	17,7±1,1 [26] ^г	70,5±2,4 [43] ^{*k}

П р и м е ч а н и е. ЯЦС — ядерно-цитоплазматическое соотношение; 2N — диплоидное ядро; C — объем цитоплазмы одного blastomera двухклеточного зародыша. В каждой колонке группы со статистически достоверным (p < 0.001) различием по числу клеток отмечены разными буквами.

звана несоответствующим ответом восприимчивой матки псевдобеременных самок-реципиентов. Чтобы проверить это предположение контрольные бластоцисты и половинки бластоцист переносили беременным самкам. Асинхронно перенесенные бластоцисты имеют преимущество перед нативными эмбрионами [5, 17], поскольку состояние готовности матки к имплантации определяется на несколько часов раньше, чем нативные (свои) эмбрионы

начнут имплантировать. Наиболее высокий процент выживаемости (p < 0,05) был отмечен при переносе бластоцист, развивавшихся *in vivo*, беременным самкам-реципиентам (см. табл. 1). Повышение уровня выживаемости на постимплантационной стадии происходило также при переносе половинок зародышей (29 % выживших плодов у беременных самок и 15 % у псевдобеременных самок).



Распределение количества клеток среди бластоцист развивавшихся в условиях задержки имплантации, через 190 ч после введения hCG: а — половинки бластоцист; б — половинки бластоцист с удвоенным объемом цитоплазмы; в — контрольные бластоцисты. По оси абсцисс — количество клеток; по оси ординат — количество эмбрионов

Для выяснения механизмов регуляции размеров бластоцист, влияющих на жизнеспособность зародышей, мы определяли количество клеток в бластоцистах приблизительно в то время, когда они могли бы в норме начинать имплантацию, и спустя три дня после высокоасинхронного переноса, когда

в действительности наблюдалась доимплантационная стадия. Результаты представлены в табл. 2. В условиях культивирования *in vitro* значительно замедлялось развитие и уменьшалось количество клеток в бластоцистах через 96 ч после введения hCG. При культивировании зигот в среде без ЭДТА количество клеток на стадии бластоцисты уменьшалось наполовину ($28,2 \pm 0,7$ клеток на бластоцисту по сравнению с $60,5 \pm 1,4$ клеток в контроле у бластоцист, развивавшихся *in vivo*). Однако в последующие три дня развития (после переноса в яйцевод) бластоцисты, развивавшиеся *in vivo* и культивированные *in vitro*, достигали одинакового количества клеток — 110. Зародыши, развивавшиеся из единичных blastomeres двуклеточных эмбрионов, имели на каждой стадии развития половинный набор клеток по сравнению с интактными зародышами. С другой стороны, следует заметить, что в течение трех дней задержки имплантации количество клеток в половинках бластоцист увеличивалось и составляло в среднем $49,9 \pm 2,0$ клеток, что сравнимо с количеством клеток в интактных бластоцистах на день имплантации ($60,5 \pm 1,4$). Чтобы попытаться выявить факторы, запускающие состояние покоя бластоцист, были получены тетраплоидные половинки зародышей и половинки зародышей с уменьшенным наполовину ЯЦС. На рисунке изображены гистограммы распределения числа клеток среди половинок зародышей с уменьшенным наполовину ЯЦС (б) по сравнению с половинками бластоцист (а — комбинированные

диплоиды и тетраплоиды) и интактными бластоцистами (σ — комбинированные, развивавшиеся *in vivo* и *in vitro* культивированные бластоцисты). Исследование параметров, характеризующих бластоцисты мыши в период имплантации, усложнено, так как бластоцисты начинают имплантировать асинхронно, а преимплантационная стадия каждой индивидуальной бластоцисты очень кратковременна.

Различия в возрасте бластоцист всего лишь в несколько часов могут сопровождаться очень значительными морфогенетическими изменениями. Период готовности зародыша к имплантации может быть удлинен более чем на неделю либо естественным путем (у лактирующей мыши), либо экспериментально (в матке) овариэктомированных или неполовозрелых самок [1, 4, 18, 19]. Во время задержки имплантации деление клеток, синтез ДНК и общая метаболическая активность подавлены [1, 20—22]. Бластоцисты, находящиеся в состоянии покоя, можно считать синхронизированной популяцией зародышей, готовых к имплантации [23].

После переноса бластоцист в яйцеводы самок нулевого дня псевдобеременности и их последующего вымывания на третий день получали бластоцисты шестидневного возраста, синхронизированные во время задержки имплантации и реактивированные в матке на день вымывания. Во время задержки имплантации развитие бластоцист не останавливается внезапно — перед вступлением в состояние покоя бластоцисты увеличивают число клеток (см. табл. 2). При использовании традиционного переноса «3→2» попытки получить жизнеспособных мышшей из разделенных или *in vitro* культивированных зародышей были менее чем удовлетворительны: 30 % беременностей, 28 % выживших зародышей после переноса культивированных эмбрионов и 8 % выживших после переноса половинок зародышей [24]. Результаты высокоасинхронных «3→0» переносов бластоцист (см. табл. 1) свидетельствуют о том, что жизнеспособность изначально отстающих в развитии зародышей мышшей частично восстанавливается в течение задержки имплантации, что подтверждается данными, полученными ранее [2, 6]. Наши результаты по переносу зародышей беременным и псевдобеременным реципиентам (см. табл. 1) позволяют предположить, что низкая жизнеспособность половинок зародышей вызвана некоторым эндогенным фактором, а не отсутствием адекватного ответа со стороны восприимчивой матки (процент имплантировавшихся половинок зародышей такой же высокий, как и у контрольных эмбрионов). Поэтому можно

заключить, что увеличение количества клеток в половинках бластоцист с задержанной имплантацией является наиболее возможным объяснением повышения уровня выживания таких зародышей во время высокоасинхронных переносов. Бластоцисты, у которых количество клеток было наполовину меньше при культивировании в условиях *in vitro*, в последующие три дня задержки имплантации догоняли по числу клеток контрольные бластоцисты, развивавшиеся *in vivo* (см. табл. 2). Однако абсолютное количество клеток не является критическим фактором для вхождения бластоцист в состояние покоя.

Хотя задержка имплантации позволяет зародышам увеличивать число клеток, бластоцисты, развивавшиеся как из диплоидных, так и тетраплоидных половинок зародышей, имеют в состоянии покоя в 2 раза меньше клеток по сравнению с контрольными бластоцистами в состоянии покоя ($49,9 \pm 2,0$ и $51,9 \pm 3,8$ по сравнению с $109,3 \pm 2,5$; см. табл. 2). Сходный результат был получен Смит и Мак Ларен [25] во время исследования параметров, определяющих начало образования бластоцист. Как обсуждалось выше, подобные результаты исключают количество цитокинезов как наиболее вероятный фактор, запускающий начало имплантации, однако в качестве возможных кандидатов на эту роль остаются число циклов репликации ДНК либо достижение определенного ЯЦС. Чтобы выбрать между этими двумя возможными вариантами, мы получили половинки зародышей с удвоенным объемом цитоплазмы (уменьшенное в два раза ЯЦС). Гистограммы, представленные на рисунке, демонстрируют, что в условиях задержки имплантации, большая часть бластоцист с уменьшенным ЯЦС имеет такое же количество клеток, как и контрольные половинки бластоцист. Это свидетельствует о том, что первичный механизм для запуска состояния покоя бластоцист объясняется не только достижением определенного ЯЦС, но и существованием некоторого другого фактора, характерного для восьмого клеточного цикла. С другой стороны, возросшее количество клеток в таких бластоцистах ($70,5 \pm 2,4$; см. табл. 2) и тот факт, что распределение зародышей по количеству клеток не подчиняется нормальному распределению (рисунок, б), свидетельствуют в пользу того, что начало восьмого клеточного цикла не является единственным фактором, определяющим состояние покоя бластоцист. Мы полагаем, что уменьшенное ЯЦС также ответственно за такой результат.

Доимплантационное развитие зародышей плацентарных млекопитающих поддерживается, в основном, энергетическими запасами ооциты. Сле-

довательно, общий объем зародышей на доимплантационной стадии не подвергается значительным изменениям и при каждом последующем делении количество цитоплазмы в бластомерах уменьшается вдвое. На стадии 120 клеток ЯЦС достигает уровня соматических клеток [26] и поэтому зародыши не могут больше развиваться за счет внутренних энергетических запасов. В интактных бластоцистах восьмой клеточный цикл совпадает со стадией 120 клеток, т. е. с моментом истощения внутренних источников энергии. Этим объясняется, почему общее количество клеток в бластоцистах, развивавшихся в условиях задержки имплантации, не превышает такового по сравнению с бластоцистами, развивавшимися в нормальных условиях, непосредственно перед имплантацией [27]. Получая зародыши с удвоенным объемом цитоплазмы (гистограмма б, рисунок), мы сняли ограничения, вызванные высоким ЯЦС, и показали, что возможно получить бластоцисты в условиях задержки имплантации с большим количеством клеток на девятом клеточном цикле.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение о том, что состояние покоя бластоцист запускается некоторым фактором, характерным для восьмого клеточного цикла, и в нормальных условиях состояние покоя бластоцист обеспечивается снижением метаболической активности в то время, когда зародыши имеют около 120 клеток и ЯЦС достигает уровня соматических клеток.

I. M. Vagina, S. V. Evsikov, O. P. Solomko

Фактори, що визначають готовність бластоцист мишей до імплантації

Резюме

Вивчали механізми регуляції клітинної маси у бластоцист мишей в умовах затримки імплантації, яку моделювали шляхом перенесення ембріонів до яйцепроводів самиць 0-го дня псевдовагітності. Виявлено, що ембріони, які відстають після культивування *in vitro*, в умовах затримки імплантації наздоганяють зародки, які розвинулися *in vivo*, за кількістю клітин. Спостереження за накопиченням клітинної маси бластоцистами, що розвинулися із одного бластомера двоклітинного зародка, та експериментально одержаними тетраплоїдами свідчать, що початок входження бластоцист до стану спокою відбувається протягом восьмого клітинного циклу та не залежить від абсолютної кількості клітин або числа цитокінезів. Бластоцисти, що розвивалися в умовах затримки імплантації з половинок ембріонів з подвоєним об'ємом цитоплазми, мали в середньому $70,5 \pm 2,4$ клітин. Останнє свідчить про те, що входження в стан спокою залежить від досягнення певного ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ЯЦС). Очевидно, готовність бластоцист до імплантації визначається, в основному, двома факторами: кількістю клітинних циклів та ЯЦС.

I. N. Vagina, S. V. Evsikov, A. P. Solomko

Factors affecting readiness of mouse blastocysts for implantation

Summary

Mechanisms of cell number regulation in mouse blastocysts have been investigated using embryo transfers into the oviducts of pseudopregnant Day 0 females. It was shown that the retarded after in vitro culture embryos are overtaking in their cell number the in vivo developed embryos during the period of implantation delay. Studies on cell numbers of blastocysts developed from one blastomere of 2-cell embryo, and experimentally produced tetraploids, demonstrate that blastocysts are entering the pre-implantation diapause during the 8-th cell cycle. This process does not depend upon absolute cell number or number of cell divisions. Blastocysts, which developed from the half-embryos with doubled cytoplasm content, had on average 70.5 ± 2.4 cells. This observation proves that blastocyst entering to the diapause depend upon reaching of definite nucleo-cytoplasmic ratio. It seems that the readiness of blastocysts for implantation depends on two factors, number of cell cycles and nucleo-cytoplasmic ratio.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. McLaren A. A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice // J. Endocrinol.—1968.—42.—P. 453—463.
2. Kaufman M. H., Barton S. C., Surani M. A. H. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage // Nature—1977.—265.—P. 53—55.
3. Bergstrom S. Experimentally delayed implantation // Methods in Mammalian Reproduction / Ed. J. C. Daniel, Jr.—New York: Acad. press, 1978.—P. 419—435.
4. Papaioannou V. E. Diapause of mouse blastocysts transferred to oviducts of immature mice // J. Reprod. Fertil.—1986.—76.—P. 105—113.
5. McLaren A., Michie D. Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs // J. Exp. Biol.—1956.—33.—P. 394—416.
6. Tsunoda Y., McLaren A. Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres // J. Reprod. Fertil.—1983.—69.—P. 315—322.
7. Whittingham D. G. Culture of mouse ova // Ibid.—1971, Suppl. 14.—P. 7—21.
8. Abramczuk J., Solter D., Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium // Dev. Biol.—1977.—61.—P. 378—383.
9. Chatot C. L., Ziomek C. A., Bavister B. D. et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1 cell mouse embryos *in vitro* // J. Reprod. Fertil.—1989.—86.—P. 679—688.
10. Latham K. E., Solter D., Schultz R. Acquisition of a transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis // Dev. Biol.—1992.—149.—P. 457—462.
11. Barra J., Renard J. P. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term // Development.—1988.—102.—P. 773.
12. McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion // Science.—1983.—220.—P. 1300—1302.
13. Tsunoda Y., Yasui T., Nakamura K. et al. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse // J. Exp. Zool.—1986.—240.—P. 119—125.

14. Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—332 p.
15. Pease S., Schroeder A. C., Schmidt G. H. Production of transgenic mice: Acupuncture needle-facilitated embryo transfer to oviduct ampulla // Trends Genet.—1989.—5.—P. 293.
16. Dyban A. P. An improved method for chromosome preparation from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres // Stain Technol.—1983.—58.—P. 69—72.
17. Marsk L. Developmental precocity after asynchronous egg transfer in mice // J. Embryol. and Exp. Morphol.—1977.—39.—P. 129—137.
18. Mantalenakis S. J., Ketchel M. M. Frequency and extent of delayed implantation in lactating rats and mice // J. Reprod. Fertil.—1966.—12.—P. 391—394.
19. Weitlauf H. M., Greenwald G. S. Survival of blastocysts in the uteri of ovariectomized mice // Ibid.—1968.—17.—P. 515—520.
20. Weitlauf H., Kiessling A., Buschman R. Comparison of DNA polymerase activity and cell division in normal and delayed-implanting mouse embryos // J. Exp. Zool.—1979.—209.—P. 467—472.
21. Weitlauf H. M. Changes in the rate of transcription with reactivation of delayed implanting mouse embryos // Ibid.—1985.—236.—P. 309—312.
22. Mead R. A. Embryonic diapause in vertebrates // Ibid.—1993.—266.—P. 629—641.
23. Gardner R. L., Davies T. J., Carey M. S. Effect of delayed implantation on differentiation of the extra-embryonic endoderm in the mouse blastocyst // Placenta.—1988.—9.—P. 343—359.
24. Evsikov S. V., Morozova L. M., Solomko A. P. The role of the nucleocytoplasmic ratio in development regulation of the early mouse embryo // Development.—1990.—109.—P. 323—328.
25. Smith R., McLaren A. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoel // J. Embryol. and Exp. Morphol.—1977.—41.—P. 79—92.
26. Smith R. K. W., Johnson M. H. Analysis of the third and fourth cell cycles of mouse early development // J. Reprod. Fertil.—1986.—76.—P. 393—399.
27. Copp A. J. Effect of implantation delay on cellular proliferation in the mouse blastocyst // Ibid.—1982.—66.—P. 681—685.

УДК 591

Поступила в редакцию 30.10.96