

Оптимизация системы для проведения генетико-эмбриологических исследований на инбредных линиях мышей.

3. Условия гормональной стимуляции самок и культивирования *in vitro* зародышей на доимплантационной стадии развития у мышей инбредных линий ICR, CBA/Lac и C₅₇Bl/6j

И. Н. Вагина, Т. Г. Титок, Н. А. Сарапина, И. В. Кириченко, С. В. Евсиков, А. П. Соломко

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

*Подобраны наиболее благоприятные условия гормональной стимуляции самок мышей инбредных линий ICR, CBA/Lac, C₅₇Bl/6j. Определен спектр оптимальных концентраций гормонов для каждой из исследованных линий мышей. Отработаны условия культивирования зигот различной линейной принадлежности в системе *in vitro*. Отмечено, что важным моментом, в значительной степени обеспечивающим успех культивирования зигот в системе *in vitro*, является стадия развития оплодотворенных яйцеклеток, характеризующаяся временем появления и морфологическими особенностями мужского и женского пронуклеусов.*

Введение. Инбредные линии мышей представляют собой удобный модельный объект для изучения доимплантационного эмбриогенеза млекопитающих. Однако эмбриологический материал, полученный после естественной овуляции, обладает рядом недостатков, обусловленных асинхронностью оплодотворения и отсутствием достаточного количества эмбрионов на доимплантационной стадии развития. Во избежание указанных недостатков разработана система гормональной стимуляции самок мышей, провоцирующая у них повышенный выход яйцеклеток — суперовуляцию [1]. Это удобный прием получения большого числа зародышей, находящихся на одной и той же стадии развития. Успешная индукция суперовуляции зависит от ря-

да факторов — возраста, массы, линии животных, дозы и времени инъекции гонадотропинов [1—3].

Для изучения развития зародышей, полученных после суперовуляции или естественной овуляции, на доимплантационной стадии используют метод культивирования эмбрионов *in vitro*, позволяющий поддерживать их нормальное развитие в течение всего этого периода.

В сообщениях [4, 5] уже указано на необходимость выполнения ряда условий для проведения современных генетических и молекулярно-биологических исследований на линейных мышах. В этой статье представлены результаты подбора оптимальных доз гормонов для эффективной суперовуляции у самок мышей инбредных линий ICR, CBA/Lac, C₅₇Bl/6j, а также созданы и изучены условия для успешного поддержания развития зародышей мышей разных генотипов в системе *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использованы мыши линий ICR, CBA/Lac, C₅₇Bl/6j, содержащиеся при инвертированном световом режиме — 14 ч день:10 ч ночь. Гормональную стимуляцию самок осуществляли внутривбрюшинным введением гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК), а через 48 ч овуляцию индуцировали инъекцией хорионического гонадотропина человека (чХГ). Далее самок скрещивали с самцами той же линейной принадлежности. Факт покрытия устанавливали по наличию вагинальной пробки.

При естественной овуляции спаривание мышей обычно происходит в середине темного периода, при индуцированной овуляции — в первые часы после инъекции чХГ и подсадки к самцам. Поэтому покрытые самок забивали через разные промежутки времени — после середины темного периода при естественной овуляции и через различные интервалы времени после введения чХГ — при индуцированной. Зиготы на стадии двух пронуклеусов вымывали из яйцеводов раствором культуральной среды. Для освобождения от клеток кумулюса зиготы обрабатывали раствором гиалуронидазы (100 ед/мл) в среде M2. Для культивирования зародыши переносили по 5—10 штук в микрокапли различных культуральных сред: Виттена [6], Эрла с добавлением пирувата и лактата Na, CAT-535. Микрокапли с зародышами покрывали слоем вазелинового масла; чашки с зародышами помещали в СО₂-инкубатор при 37 °С и продували газовой смесью, состоящей из 5 % СО₂ и 95 % воздуха. Эмбрионы культивировали до стадии бластоцисты, при этом учитывали долю зародышей, остановившихся на ранних стадиях дробления, а также число зародышей, не вступивших в развитие по каким-то причинам. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Особенности проведения экспериментов, связанных с изучением ряда проблем биологии развития, заключаются в том, чтобы на стадии двух пронуклеусов имелось одновременно достаточно большое количество оплодотворенных яйцеклеток. Однако при естественной овуляции временной разброс этой стадии у мышей достигает 6—10 ч. Все это повлекло за собой необходимость проведения экспериментов по определению оптимальных условий синхронизированной овуляции путем создания инвертированного светового периода суток и гормональной стимуляции самок-доноров. Результаты исследований по подбору оптимальных доз гонадотропинов свидетельствуют о линейных различиях реакции на вводимые гормональные препараты. Полученные нами данные согласуются с таковыми других авто-

ров [7—9]. Введение самкам CBA/Lac от 10 и более единиц ГСЖК на особь снижает количество овулирующих яйцеклеток, и повышает число аномальных — до 89 %. У самок ICR аналогичные результаты достигались при дозировках ГСЖК, превышающих вышеуказанные в 2,5—3 раза. В свою очередь, дозы чХГ менее 3 единиц на мышью ведут к существенному падению количества овулирующих яйцеклеток почти в 3 раза как у самок CBA/Lac, так и C₅₇Bl/6j, а у самок ICR даже к прекращению овуляции.

Таким образом, удалось подобрать оптимальные дозы ГСЖК (сухая, Покровский завод биопрепаратов, партия 13) для различных линий мышей: ICR — 10—12 ед.; CBA/Lac — 5—6 ед.; C₅₇Bl/6j — 6—8 ед. на одну самку. Также подобраны оптимальные дозы чХГ (Московский эндокринный завод): ICR — 6 ед., CBA/Lac — 4 ед., C₅₇Bl/6j — 5 ед. на одно животное. Кроме того, выяснилось, что наибольший эффект достигается при введении чХГ за 12—13 ч до середины темного периода инвертированных суток, когда индуцированная овуляция совпадает с периодом естественной овуляции у мышей. Введение гормонов раньше и позже этого срока ведет к увеличению количества неоплодотворенных и аномальных яйцеклеток. Наиболее оптимальный возраст самок, при котором достигаются наивысшие показатели синхронизации овуляции, лежит в интервале 4—7 недель. При соблюдении перечисленных условий получено не только большее количество яйцеклеток на самку, но также увеличилось число зигот по сравнению с контролем (рис. 1).

Для создания условий успешного поддержания развития зародышей мышей в системе *in vitro* были

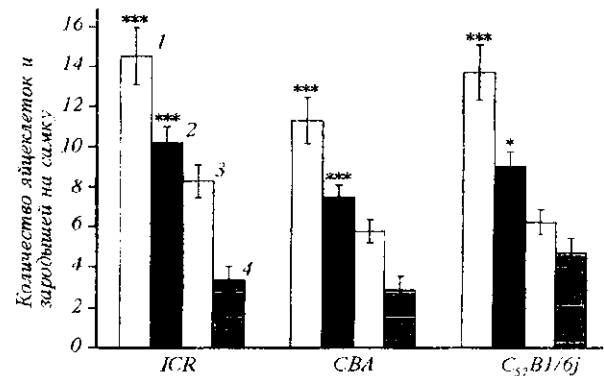


Рис. 1. Результаты овуляции у гормонально стимулированных самок трех линий: 1, 2 — суперовуляция яйцеклетки и зиготы соответственно; 3, 4 — контроль яйцеклетки и зиготы. Достоверность различий между контролем и опытом: * $p > 0,95$; *** $p > 0,999$

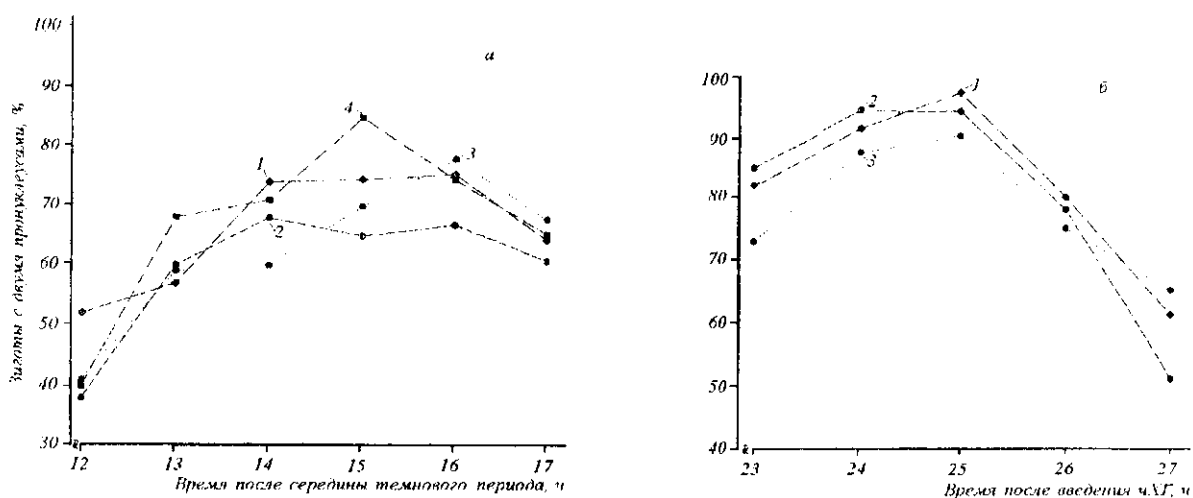


Рис. 2. Сезонная динамика развития пронуклеусов в зиготах мышей линии ICR при естественной овуляции (а) и после суперовуляции (б): 1 — зима; 2 — весна; 3 — лето; 4 — осень

испытаны различные культуральные среды. Лучшей по результатам испытаний была признана среда Виттена [6], для приготовления которой использовали реактивы особой чистоты. Внесение в культуральную среду Na-соли ЭДТА [10] повысило выход морул и бластоцист при культивировании *in vitro*. Нами были испытаны три концентрации ЭДТА — 10, 100 и 200 мкМ. Оказалось, что для зигот линии ICR и C₅₇Bl/6j оптимальной является концентрация 100 мкМ, а для линии SWA/Lac — 200 мкМ. Концентрация ЭДТА 10 мкМ была малоэффективной. Эти результаты могут указывать на генотипические различия в чувствительности зигот ранних стадий к наличию в культуральной среде ионов тяжелых металлов.

Параллельно с налаживанием культуры зародышей мышей решали вторую задачу — определение временных параметров четкого проявления пронуклеусов как одного из критериев оплодотворяемости яйцеклеток. Весь период от проникновения спермия в яйцеклетку и до профазы первого деления подразделяется на три стадии, каждая из которых охарактеризована по морфологическим особенностям пронуклеусов [11]. Первая стадия — начало формирования пронуклеусов (происходит уплотнение хроматина, формирование оболочек пронуклеусов); вторая — завершение их формиро-

вания (происходит увеличение их объема); третья — стадия зрелых пронуклеусов (пронуклеусы перемещаются к центру и сближаются).

Затем отбирали и анализировали зиготы с двумя четко выраженными пронуклеусами. Динамика развития пронуклеусов в условиях естественной овуляции и после суперовуляции представлена на рис. 2 а, б, на примере зигот линии ICR.

Сравнение временных параметров развития пронуклеусов при естественной и индуцированной овуляции свидетельствует о существенных различиях. Так, при индуцированной овуляции к 23-му ч после введения чХГ свыше 80 % зигот были с четко видимыми пронуклеусами, в течение последующих 2—3 ч количество их достигало максимума, а затем резко снижалось к 26-му ч. При этом оба пронуклеуса, объединяясь, вступали в метафазную стадию развития. После суперовуляции у самок наблюдалась синхронизация по времени развития пронуклеусов, а динамика оплодотворяемости яйцеклеток была однонаправленной независимо от времени года (см. рис. 2, б). В то же время у самок с естественной овуляцией обнаружен большой разброс по времени развития пронуклеусов. Это также подтверждается появлением до 5 % зигот, прошедших первое деление дробления, чего не наблюдалось у самок с индуцированной овуля-

цией. У самок с естественной овуляцией отмечены колебания по времени развития пронуклеусов в зиготах в зависимости от времени года. Так, осенью и зимой пик приходился на 14—15 ч после середины темного периода, весной этот пик смещался и приходился на 13—14 ч, а летом растягивался с 14 до 16 ч (см. рис. 2, а). Эти результаты свидетельствуют о неравномерности созревания и овуляции яйцеклеток у половозрелых самок при естественном течении этого процесса, так как гормональный фон у них находится в зависимости от времени года. Обнаружено также, что для самок исследуемых линий характерны свои особенности по скорости оплодотворения и формирования пронуклеусов. Так, у самок C₅₇Bl/6j этот процесс происходил на 1,5—2 ч быстрее, чем у самок ICR и CBA/Lac. У последних через 13 ч после середины темного периода пронуклеусы выявлялись только у 40 % зигот. Существование линейных различий по скорости формирования пронуклеусов у мышей отмечалось ранее [12—14]. Результаты культивирования зигот мышей трех линий, полученных в один временной и сезонный периоды, также свидетельствуют о существовании определенных межлинейных различий в их способности эффективно проходить стадии развития до бластоцист в условиях *in vitro* (табл. 1). Несмотря на одинаковый возраст, успешнее всего развивались зиготы мышей линии C₅₇Bl/6j — 60 % бластоцист, затем CBA/Lac — 42 %, а зиготы линии ICR в преобладающем количестве останавливались на двухклеточной стадии. Весьма вероятно, что в основе межлинейных различий развития зигот в системе *in vitro* лежат их генотипические особенности, выражающиеся в неравномерных темпах созревания оплодотворенных яйцеклеток. Известно, что при культивировании зигот мышей некоторых линий их развитие блокируется на двубластомерной стадии [15—18]. Одноклеточные зародыши мышей крайне чувствительны к ряду агентов и, в частности, к солям тяжелых металлов. Поэтому при добавлении к культуральной среде агентов, связывающих тяжелые металлы (в том числе ЭДТА), можно культивировать *in vitro* одноклеточные зародыши от некоторых линий мышей, у которых наблюдался блок в развитии на двухклеточной стадии [10]. По-видимому, в цитоплазме таких зародышей отсутствуют факторы, необходимые для преодоления блока на двухклеточной стадии, т. е. для успешного продолжения развития *in vitro* [17, 19]. Наличие этих факторов зависит от генетических особенностей яйцеклетки и определяется активностью материнских генов еще в оогенезе [20, 21].

Возможно, это обусловлено разным запасом

mРНК, различной активностью ряда ферментов, различной структурой и особенностями функции митохондрий и отличиями в проницаемости плазматической мембраны яйцеклетки, способствующими развитию зигот *in vitro* до более поздних стадий.

Однако природа этих цитоплазматических факторов до сих пор остается невыясненной.

Результаты культивирования зигот линии ICR (табл. 2) свидетельствуют о том, что их развитие блокируется на двухклеточной стадии. В то же время успех развития зигот этой линии, полученных на 3—4 ч позже, повышался до 37 % (см. табл. 2). Видно, что 92 % таких зигот (полученных через 16—18 ч после середины темного периода) продолжали развиваться и 37 % из них достигли стадии бластоцисты. Но только 4 % зигот, полученных от самок через 12—13 ч после середины темного периода, развивались до бластоцист и почти половина из них не вступала в развитие. Такая же зависимость успеха развития зигот *in vitro* от их биологического возраста (стадии развития) наблюдалась и в случае гормональной стимуляции самок (табл. 3). При этом эта зависимость выявлена у мышей всех трех линий. Наиболее успешно развивались зиготы, полученные от самок мышей через 26—28 ч после введения чХГ. При этом число зигот линий ICR и C57Bl/6j, развившихся до стадии бластоцисты, было значительно больше, чем бластоцист, развившихся из зигот, полученных через 23—25 ч после введения чХГ (различия достоверны при $p > 0,999$).

Мы также культивировали двухклеточные зародыши мышей линии ICR, находящиеся на разных стадиях развития (табл. 4). Ранние двухклеточные зародыши (полученные от самок с естественной овуляцией через 16—18 ч после середины темного периода) почти все останавливались в своем развитии и только единицы достигали стадии бластоцисты. Следовательно, среди зародышей мышей, развивавшихся в материнском организме, также можно найти заблокированные на двухклеточной стадии. Не исключено, что и в этом случае проявляется отсутствие в цитоплазме зигот факторов, необходимых для начальных и дальнейших стадий деления. Напротив, более 80 % поздних (полученных через 37—40 ч после середины темного периода) двухклеточных зародышей вступали в развитие и 45 % из них достигали стадии бластоцисты. Возможно, это связано с тем, что в поздних двухклеточных зародышах происходит активация своего генома. Двухклеточная стадия является уникальной не только вследствие того, что в это время активируется геном зародыша, но и потому, что только у двухклеточных зародышей одновременно

Таблица 1

Результаты культивирования зигот линий ICR, CBA/Lac, C57Bl/6j, полученных от самок через 14—15 ч после середины темного периода суток в летний период

Линия мышей	Количество проанализированных зигот	Успех культивирования зигот, %		
		Достигших стадии бластоцисты	Остановившихся на ранних стадиях	Не вступивших в развитие
ICR ¹	125	7,2±2,3	76,8±3,8	16,0±3,3
CBA ²	56	42,9±6,7***	48,2±6,7	8,9±3,8
C57Bl/6j ³	35	60,0±8,4***	—	40,0±8,4***

Примечание. Различия достоверны между 1 и 2; 1 и 3 (**p > 0,999).

Таблица 2

Результаты культивирования зигот линии ICR, полученных от самок через различные интервалы времени после середины темного периода суток

Интервал после середины темного периода, ч	Количество проанализированных зигот	Успех культивирования зигот, %		
		Достигших стадии бластоцисты	Остановившихся на ранних стадиях	Не вступивших в развитие
12—13 ¹	403	4,2±1,0	50,6±2,5	45,2±2,5
14—15 ²	238	8,4±1,8*	66,4±3,1	25,2±2,8
16—18 ³	266	37,2±2,9***	54,1С3,1	8,6±1,7***

Примечание. Различия достоверны между 1 и 2 (*p > 0,95); 1 и 3 (**p > 0,999).

Таблица 3

Результаты развития зигот линий ICR, CBA/Lac, C57Bl/6j in vitro, полученных от самок после суперовуляции через разные интервалы времени после введения чХГ

Интервал после введения чХГ, ч	Линия мышей	Количество проанализированных зигот	Успех культивирования зигот, %		
			Достигших стадии бластоцисты	Остановившихся на ранних стадиях	Не вступивших в развитие
23—25 ¹	ICR	118	5,1±2,0	64,4±4,4	30,5±4,3
	CBA	49	30,6±6,7	24,5±6,2	44,9±7,2
	C57Bl/6j	95	31,6±4,8	10,5±3,2	57,9±5,1
26—28 ²	ICR	283	21,6±2,4***	59,4±2,9	19,1±2,3*
	CBA	169	33,1±3,6	61,5±3,8***	5,3±1,7***
	C57Bl/6j	156	66,0±3,9***	28,8±3,6***	5,1±1,8***

Примечание. Различия достоверны между 1 и 2 (*p > 0,95; ***p > 0,999).

Таблица 4

Результаты культивирования двухклеточных зародышей линии ICR, полученных через разные интервалы времени после середины темного периода суток

Интервал после середины темного периода, ч	Количество проанализированных зигот	Успех культивирования двухклеточных зародышей, %		
		Достигших стадии бластоцисты	Остановившихся на ранних стадиях	Не вступивших в развитие
16—18 ¹	42	7,1±4,2	—	92,9±4,0
37—40 ²	175	45,7±3,8***	41,7±3,7	12,6±2,5***

Примечание. Различия достоверны между 1 и 2 (***p > 0.999).

транслируются как материнские мРНК, так и мРНК зародыша. Изменения спектра белков выражены во время двухклеточной стадии сильнее, чем на любой другой стадии дробления [22—24]. Все изменения на двухклеточной стадии, включая активацию генов зародыша и характерные паттерны белкового синтеза, а также разрушение материнской мРНК, осуществляются согласно запрограммированному в оогенезе ритму, т. е. наступают тогда, когда бластомеры достигнут определенного биологического возраста [23].

Таким образом, результаты наших экспериментов по культивированию зародышей мышей ранних стадий свидетельствуют о том, что успех развития таких зародышей *in vitro* зависит от их генотипических особенностей и биологического возраста. Следует обратить внимание, что для мышей линии ICR нормальное развитие до стадии бластоцисты *in vitro* обеспечивается при культивировании поздних зигот и поздних двухклеточных зародышей, а успех культивирования таких зародышей можно повысить при использовании специальных культуральных сред [25—27].

I. M. Vasina, T. G. Titok, N. A. Sarapina, Y. V. Kirichenko, S. V. Evsikov, A. P. Solomko

Оптимізація системи для проведення генетико-ембріологічних досліджень на інбредних лініях мишей. 3. Умови гормональної стимуляції самок і культивування *in vitro* зародків на доімплантаційній стадії розвитку у мишей інбредних ліній ICR, CBA/Lac та C₅₇Bl/6j

Резюме

Підбрано найсприятливіші умови гормональної стимуляції самок мишей інбредних ліній ICR, CBA/Lac, C₅₇Bl/6j. Визначено спектр оптимальних концентрацій гормонів для кожної з ліній мишей, що вивчалася. Відпрацьовано умови культивуван-

ня зигот різної лінійної належності в системі *in vitro*. Відмічено, що важливим моментом, який в значній мірі забезпечує успіх культивування зигот в системі *in vitro*, є стадія розвитку запліднених яйцеклітин, що характеризується часом появи та морфологічними особливостями чоловічого та жіночого пронуклеусів.

I. N. Vagyna, T. G. Titok, N. A. Sarapina, Y. V. Kirichenko, S. V. Evsikov, A. P. Solomko

Optimization of the system for embryogenetic studies on inbred strains of mice. 3. Conditions of hormonal stimulation of females and *in vitro* culture of preimplantation embryos of ICR, CBA/Lac and C₅₇Bl/6j mouse strains

Summary

Optimal conditions for hormonal stimulation of females of ICR, CBA/Lac and C₅₇Bl/6j have been worked out. The optimal concentration and spectrum of hormones for each strain was determined. Conditions for *in vitro* culture of zygotes of different strains were elaborated. It was determined that the important thing for successive *in vitro* culture of zygotes is the stage of development of fertilized ova, which is characterized by the time of appearance of maternal and paternal pronuclei.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gates A. H. Methods in mammalian embryology / Ed. J. Daniel.—San Francisco: Freeman Co., 1971.—P. 64—75.
2. Дыбан А. П. Опыты на зародышах млекопитающих // Методы биологии развития / Под ред. Б. Л. Астауров.—М.: Наука, 1974.—С. 220—221.
3. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы.—М.: Мир, 1990.—393 с.
4. Столина М. Р., Морозова Л. М., Соломко А. П. Оптимизация системы для проведения генетико-эмбриологических исследований на инбредных линиях мышей. 1. Сравнительная оценка сезонной плодовитости самок мышей линий BALB/cLac, C57Bl/6j и ICR // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 2.—С. 49—52
5. Морозова Л. М., Столина М. Р., Соломко А. П. Оптимизация системы для проведения генетико-эмбриологических исследований на инбредных линиях мышей. 2. Сравнение способности к оплодотворению *in vitro* у ин-

- бредных линий мышей C₅₇Bl/6J и BALB/cLac // Там же.—№ 3.—С. 33—36.
6. *Whitten W. K.* Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro* // *Adv. Biosci.*—1971.—6.—P. 129—139.
 7. *Hogan B., Constantini F., Lacy E. et al.* Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—332 p.
 8. *Spearow J. L.* Characterization of genetic differences in hormone-induced ovulation rate in mice // *J. Reprod. Fert.*—1988.—82.—P. 799—806.
 9. *Голубица А. Н., Амстиславский С. Я., Файзулин Р. З. и др.* Суперовуляторная реакция у разных линий мышей в ответ на введение гонадотропных препаратов // Проблемы сохранения и поддержания генетических коллекций лабораторных животных. Консервация генетических ресурсов: Сб. науч. тр.—Пуццино, 1991.—С. 93—97.
 10. *Abramczuk J., Solter D., Koprowski H.* The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium // *Develop. Biol.*—1977.—61, N 2.—P. 378—383.
 11. *Пониашвили Е. М., Дыбан А. П.* Партеногенетическое развитие яйцеклеток мышей, индуцированное этиловым спиртом и тепловым шоком *in vitro* и *in situ* // Общ. закономерности и контрол. механизмы раннего эмбриогенеза млекопитающих в норме и патологии.—Ленинград: Наука, 1985.—С. 22—30.
 12. *Luthardt F. W., Donahue R.* Pronuclear DNA synthesis in mouse eggs // *Exp. Cell Res.*—1973.—82.—P. 143—145.
 13. *Krishna M., Generoso W. M.* Timing of sperm penetration, pronuclear formation, pronuclear DNA synthesis and first cleavage in naturally ovulated mouse eggs // *J. Exp. Zool.*—1977.—202.—P. 245—255.
 14. *Howlett S. K., Bolton V. N.* Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis // *J. Embryol. Exp. Morphol.*—1985.—87.—P. 175—206.
 15. *Kaufman M. H., Sachs L.* Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos // *Ibid.*—1976.—35.—P. 179—190.
 16. *Graham C. F., Lehtonen F.* Formation and consequences of cell patterns in preimplantation mouse development // *Ibid.*—1979.—49.—P. 277—294.
 17. *Goddard M. J., Pratt H. P. M.* Control of events during early cleavage of the mouse embryo: An analysis of the «2-cell block» // *Ibid.*—1983.—73.—P. 11—133.
 18. *Дыбан А. П.* Раннее развитие млекопитающих.—Л.: Наука, 1988.—228 с.
 19. *Gulyas B., Wood M., Whittingham D.* Fusion on oocytes and development of oocyte fusion products in the mouse // *Develop. Biol.*—1984.—101.—P. 246—250.
 20. *Muggleton-Harris A. L., Whittingham D. G., Wilson L.* Cytoplasmic control of preimplantation development *in vivo* in the mouse // *Nature.*—1982.—229.—P. 460—462.
 21. *Pratt H. P. M., Muggleton-Harris A. L.* Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryo // *Development.*—1988.—104.—P. 115—120.
 22. *Van Blerkom J.* Protein synthesis during oogenesis // *Biology of Fertilization* / Eds A. Monroy, C. Metz.—New York, 1983.—P. 289—320.
 23. *Bolton V. N., Oades P. J., Johnson M. M.* The relationship between cleavage, DNA replication and gene expression in the mouse 2-cell embryo // *J. Embryol. Exp. Morphol.*—1984.—79.—P. 139—163.
 24. *Johnson M. H., Mc Connel G., Van Blerkom J.* Programmed development in the mouse embryo // *Ibid.*—1984.—83.—P. 197—231.
 25. *Chatot C. L., Liomek 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.
 26. *Lawitts J. A., Biggers J. D.* Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods // *Ibid.*—1991.—91.—P. 543—556.
 27. *Lawitts J. A., Biggers J. D.* Overcoming the 2-cell block by modifying components in a mouse embryo culture medium // *Biol. Reprod.*—1991.—45.—P. 245—251.

УДК 577.218

Поступила в редакцию 14.11.96