



УДК 591

С. В. Евсиков, Л. М. Морозова, А. П. Соломко

РОЛЬ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СООТНОШЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. РАЗВИТИЕ ЗИГОТ С УМЕНЬШЕННЫМ ОБЪЕМОМ ЦИТОПЛАЗМЫ *

Более 90% мышечных зигот, у которых микрохирургически удалили треть цитоплазмы, развились в культуре до морфологически нормальных морул и бластоцист. Наблюдалось значительное замедление скоростей дробления и морфогенеза оперированных зародышей по сравнению с контрольными. Оперированные зародыши начинали образование бластоцели при меньшем числе клеток, чем контрольные, что соответствует гипотезе о влиянии ядерно-цитоплазматического соотношения на запуск кавитации. Сравнение преимплантационных эмбрионов, развивающихся в различных условиях (*in vivo*, *in vitro*, с 2-клеточной, 1-клеточной стадий), указывает на то, что запуск кавитации зависит от абсолютного времени, прошедшего с начала развития. Это позволяет предположить, что морфогенез определяется в первую очередь «генетическими часами», запускающими кавитацию относительно независимо от внешних (по отношению к геному) воздействий. Жизнеспособность морул и бластоцист, развившихся в культуре, показана при их пересадках псевдобеременным самкам.

Введение. Один из предложенных методов клонирования млекопитающих — пересадка ядер в энуклеированные зиготы. При этом полагается, что цитоплазма зиготы способна изменить дифференцированное состояние генома, запустить программу развития. Но такие надежды кажутся обоснованными лишь в случае, если цитоплазма играет сколько-либо значительную регуляторную роль в раннем эмбриогенезе млекопитающих.

На первых этапах развития зародыша каждое деление дробления уменьшает объем цитоплазмы, приходящейся на диплоидный геном, вдвое. То есть параллельно репликации ДНК и цитокинезу увеличивается и ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС). Если механизм «онтогенетических часов» включает в себя системы взаимодействия ядра и цитоплазмы, то ЯЦС вполне может оказаться фактором, влияющим на программу развития зародыша.

Правильность предположения о том, что запуск процессов морфогенеза осуществляется по достижении определенного ЯЦС, показана в настоящее время для земноводных [1, 2]. Для млекопитающих установлено, что уменьшение ЯЦС отрицательно сказывается на развитии реконструированных зародышей мыши [3]. Выяснение роли цитоплазмы и ЯЦС в раннем эмбриогенезе млекопитающих возможно при анализе развития зародышей, у которых экспериментальное изменение этого соотношения не связано с изменениями на уровне генома. Подобное изменение может быть достигнуто путем микрохирургического удаления части цитоплазмы зиготы.

Развитие преимплантационных зародышей в культуре идет медленнее, чем *in vivo* [4]. Это делает возможным изучение временных параметров реализации программы развития, сравнивая скорости клеточных делений и морфогенеза зародышей, развивающихся *in vivo* и *in vitro*.

* Представлена членом редколлегии В. М. Кавсаном.

Поскольку основные выводы сделаны нами на основании данных, полученных в системе *in vitro*, было необходимо подтвердить применимость морфологического критерия к оценке жизнеспособности зародышей. Для этого морулы и бластоцисты, развившиеся в культуре, пересаживали псевдобеременным самкам.

Материалы и методы. Выделение и культивирование зародышей. Для синхронизации по времени появления зигот на стадии двух пронуклеусов мышей линий C57BL/6J и BALB/c содержали при следующем световом режиме: ночь с 19 до 03 ч для C57BL/6J и с 16 до 24 ч для BALB/c. К самцам на ночь подсаживали по 5 самок. Зиготы на стадии двух пронуклеусов вымывали между 10 и 13 ч. Для освобождения от клеток кумулюса зиготы обрабатывали раствором гиалуронидазы (200 МЕ/мл), приготовленным на среде Виттена [5], забуференной HEPES. Примерно 20 зародышей оставляли в качестве контроля, остальных использовали для экспериментов.

Зародыши культивировали до стадии морул и бластоцист при 37 °С на пластиковых чашках Петри (Ø40 мм) в каплях среды Виттена с добавлением 100 мкМ Na₂-ЭДТА [6] под вазелиновым маслом, при повышенном содержании CO₂ (7%) в воздухе.

Число клеток у морфологически нормальных морул и бластоцист определяли по методу Тарковского [7]. Достоверность различий между зародышами по скорости клеточных делений и стадии начала кавитации вычисляли с использованием критерия Стьюдента (*t*-тест).

Микроманипуляции. Часть цитоплазмы удаляли при помощи микроманипуляторов КМ-2 под микроскопом «Amplival». Микроскоп снабжен системой, позволяющей получать стереоизображение зародыша, что значительно облегчает работу по микрохирургии (оптическая схема стереомикроскопа была предложена А. Д. Груздевым). Рабочее увеличение микроскопа 180х. Заготовки для микроинструментов вытягивали на микрокузнице МК-1. Присоски для фиксации зародышей имели наружный диаметр до 100 мкм, внутренний диаметр игл для удаления цитоплазмы — 15—20 мкм. Цитоплазму удаляли по методу, предложенному МакГратом и Солтером для энуклеации зародышей [8]. После операции зародыши фотографировали и объем цитоплазмы оценивали по фотографиям. Удалялось от 20 до 50 % цитоплазмы, в среднем — 35 %.

Морулы и бластоцисты, развившиеся в культуре, пересаживали в правый рог матки самок BALB/c второго дня псевдобеременности, согласно методике [9].

Результаты и обсуждение. В табл. I представлены результаты культивирования и пересадок зародышей двух линий мышей. Процент морфологически нормальных морул и бластоцист дан без вычисления ошибок, поскольку нас интересует не морфология зародышей как таковая, а их жизнеспособность. В этом случае ошибка может быть весьма значительной, но определению не поддается. Например, куда следует

Таблица I
Развитие зародышей мышей, культивируемых на преимплантационной стадии
Development of mouse embryos that were cultured and then transferred to pseudopregnant females

Линия зародышей, стадия начала культивирования	Развившиеся зародыши		
	<i>in vitro</i> до морул и бластоцист, %	<i>in vivo</i> после пересадок культивированных морул и бластоцист псевдобеременным самкам BALB/c	
		Беременные самки, %	Родилось мышат, %
C57BL/6J			
1-клеточные	90(1171/1306)	31(16/52)	28(30*/109)
2-клеточные	91(206/227)	91(10/11)	36(24/67)
BALB/c			
1-клеточные	74(690/938)	50(13/26)	32(30/95)
2-клеточные	88(130/147)	1/2	4/8

* Плюс пять мертворожденных.

отнести морулу с (еще пока?) не включенным бластомером, бластоцисту с двумя бластоцелями и т. д.?

Лишь 74 % зигот линии *BALB/c* за три дня в культуре со стадии двух пронуклеусов доходят до морул и бластоцист. При культивировании зародышей с двухклеточной стадии уже 88 % зародышей развиваются до этих стадий.

Зародыши линии *C57BL/6J* развиваются в культуре успешнее — с 1-клеточной стадии 90 % доходят до морул и бластоцист. Однако, как и у линии *BALB/c*, зародыши развиваются *in vitro* все же хуже, чем *in vivo*: не более 5 % бластоцист, развившихся *in vitro* с 1-клеточной стадии, вылупляются из зона *pellucida*. Зародыши, развивающиеся в культуре с двухклеточной стадии, вылупляются почти все.

При пересадках морул и бластоцист псевдобеременным самкам линии *BALB/c* учитывали процент забеременевших самок и родившихся мышат у них. Лучший результат получен при пересадках зародышей линии *C57BL/6J*, культивированных с двухклеточной стадии: 24 мышонка из 67 зародышей, перенесенных 10 забеременевшим самкам-реципиентам.

Всю последующую работу мы вели в основном на зародышах линии *C57BL/6J*. Поэтому в дальнейшем, если линия зародышей особо не оговаривается, имеются в виду зародыши линии *C57BL/6J*.

Таблица 2

Развитие зародышей мышей линии *C57BL/6J* к 90-му ч (*in vivo* — к 80-му ч) после овуляции

The development of mouse embryos by the 90 h (*in vivo* — by the 80 h) after ovulation

Условия развития зародышей, стадия начала культивирования	Среднее число клеток		Бластоцисты, % (скорость морфогенеза)
	Морулы и бластоцисты (скорость деления)	Ранние бластоцисты (стадия начала кавитации)	
<i>In vivo</i>	32,0±0,5(211)	33,6±0,5(116)	65±3
<i>In vitro</i>			
2-клеточные	29,8±0,7(127)	30,0±0,5(78)	71±4
1-клеточные	26,1±0,4(326)	28,2±0,2(198)	72±2
Зиготы с уменьшенным объемом цитоплазмы	21,1±0,6(131)	23,0±0,6(72)	59±4
2-клеточные <i>BALB/c</i>	27,2±0,7(145)	31,2±0,7(76)	54±4

Примечание. В скобках приведены количества зародышей.

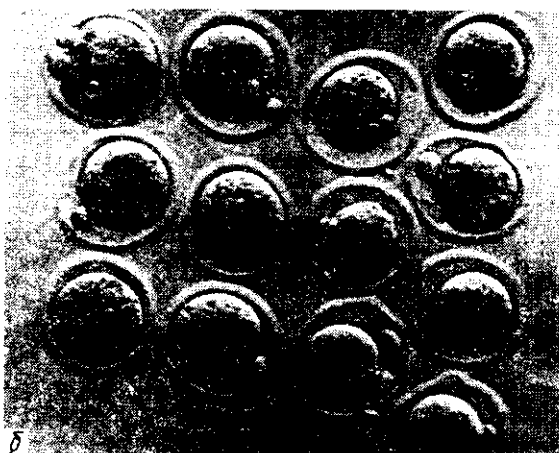
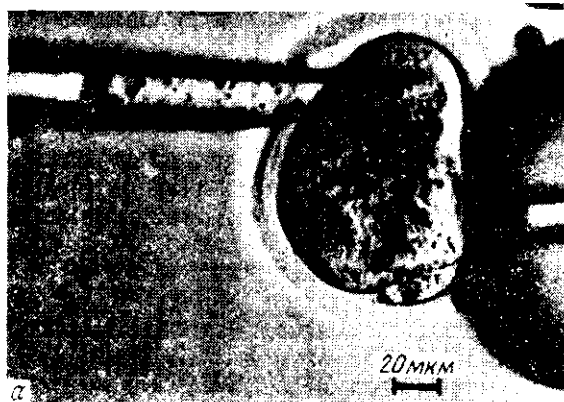
В табл. 2 приведены результаты подсчета клеток у зародышей на третий день развития. Среднее число клеток, сосчитанное по всем зародышам данного типа, отражает скорость дробления. В культуре скорость клеточных делений замедляется (табл. 2, [4]). Зародыши, развивающиеся 3 дня *in vitro* с 1-клеточной стадии, имеют на 20 % меньше клеток, чем зародыши, развивающиеся *in vivo*. То есть в культуре около половины клеток зародыша к 90-му ч развития еще не проходит пятого деления.

Показано, что зародыши линии *BALB/c in vivo* отстают в развитии от зародышей линии *C57BL/6J* [10—12]. Межлинейные различия мы наблюдали и в культуре: скорость клеточных делений у *BALB/c* достоверно ниже ($P > 0,99$), чем у *C57BL/6J*. Но это может быть связано и с тем, что зародыши *BALB/c* более чувствительны к изменению условий развития, чем *C57BL/6J*.

Зависимость морфогенеза от числа клеточных делений (или циклов репликации ДНК, ЯЦС) неочевидна. Если запуск кавитации определяется «биологическими часами», отсчитывающими время по клеточным делениям [13], условия развития не должны влиять на число клеток у зародышей, начинающих образование бластоцели. Замедление развития *in vitro* будет сказываться на времени появления ранних бластоцист, но не на числе клеток у них. Из табл. 2 видно, что при разви-

тии *in vitro* количество клеток у ранних бластоцист заметно уменьшается ($P > 0,999$). Предположение о том, что уменьшение числа клеток у ранних бластоцист, развившихся в культуре, связано с повышенной клеточной смертностью [13], наши результаты не подтверждают. Ни в одном случае число пикнотических ядер не превышало 0,2 на зародыш.

Результаты, представленные в табл. 1 и 2, подтверждают гипотезу



о том, что уменьшение числа клеток отрицательно сказывается на постимплантационном развитии зародышей. Но при этом следует иметь в виду, что нормальное развитие мышат возможно даже из бластоцист, развившихся из отдельных blastomerov 2-клеточных зародышей и имеющих клеток в два раза меньше нормы [14--16].

Развитие зигот с уменьшенным количеством цитоплазмы. После микрохирургического удаления части цитоплазмы (ри-

Получение зигот с увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением: а — микрохирургическое удаление части цитоплазмы; б — зиготы до (слева) и после операции

A method to increase the nucleocytoplasmic ratio in mouse zygotes: а — microsurgical removal of cytoplasm; б — zygotes before (on the left) and after manipulation.

сунок) 93 % зигот (236 из 253) развились в культуре до морфологически нормальных морул и бластоцист. Результаты подсчета клеток представлены в табл. 2.

Поскольку зиготы до и во время операции обрабатывали ингибиторами цитоскелета, мы проверили, как влияет двухчасовая обработка цитохалазином В и колцемидом на развитие зародышей. Обработка этими препаратами не влияла на скорость развития и стадию начала кавитации зародышей, что соответствует результатам, полученным ранее для двухклеточных зародышей [17].

Скорость дробления эмбрионов с уменьшенным на треть объемом цитоплазмы достоверно ниже, чем контрольных ($P > 0,999$). Показано, что зиготы с уменьшенным объемом цитоплазмы проходят первое деление одновременно с контрольными [18], очевидно, замедление развития происходит на втором — четвертом делениях дробления.

Следует обратить внимание на то, что удаление цитоплазмы по методу МакГрата — Солтера происходит без прокалывания плазматической мембраны. При этом в тот момент, когда 35 % цитоплазмы оказывается засосанными в иглу, площадь поверхности образовавшейся структуры в 2,3 раза больше поверхности зиготы. То есть в результате операции получается зигота с уменьшенным на треть объемом и растянутой в 2,3 раза мембраной (при первом делении мембрана растягивается в 1,2 раза [19]). Поскольку морфогенез зародыша, по-видимому,

во многом определяется состоянием плазматической мембраны (поляризация мембран бластомеров, взаимодействие клеток при компактизации, образование плотных контактов перед кавитацией [20—24]), можно предположить, что на развитие оперированной зиготы будет влиять не только отсасывание трети цитоплазмы, но и удаление половины мембраны.

Результаты нашего эксперимента по удалению части цитоплазмы допускают интерпретацию с точки зрения регуляторной роли цитоплазмы. В самом деле, ЯЦС, соответствующее стадии запуска кавитации, при уменьшении объема цитоплазмы будет достигаться после меньшего числа клеточных делений.

Действуя по принципу *reductio ad absurdum*, мы увеличили ЯЦС до максимума, оставив на культивирование кариопласт зиготы. Некоторые кариопласты через сутки были двуклеточными, но дальше развитие не пошло. Этот эксперимент, по нашему мнению, особенно наглядно показывает, что основная роль цитоплазмы — это поддержание жизнедеятельности ядра.

Заключение. К настоящему времени проверены практически все эпигенетические факторы, предложенные на роль регуляторов развития. Показано, что ни один из них, взятый в отдельности, не определяет морфогенез преимплантационного эмбриона млекопитающего. В частности, сообщалось, что образование бластоцели не зависит ни от абсолютного времени, прошедшего с начала развития, ни от числа клеток, цитокинеза [13, 25], ни от количества циклов репликации ДНК [26], ни от межклеточных взаимодействий [25, 27], а стадийспецифическая экспрессия генов не зависит от ЯЦС [28].

Наши результаты позволяют предположить, что морфогенез преимплантационных эмбрионов млекопитающих зависит как от абсолютного времени, прошедшего с начала развития, так и от ЯЦС.

Для объяснения полученных результатов мы предлагаем следующую схему взаимодействия ядра и цитоплазмы в развитии. Не подлежит сомнению, что онтогенез является реализацией программы, записанной в геноме зиготы. Для того чтобы оставаться стабильным, развертывание программы развития должно не зависеть от внешних по отношению к геному воздействий, идти прежде всего по «генетическим часам», запускаемым при оплодотворении. Репликация ДНК, кариокинез, цитокинез, морфогенез — это прежде всего **результаты** реализации программы развития. Данные, полученные на сегодняшний день, не противоречат гипотезе о том, что в основе изменений экспрессии генов, определяющих развитие, лежат программируемые изменения на уровне ДНК [29].

Но для того чтобы оставаться устойчивой, гомеостатическая система должна иметь канал обратной связи. На доимплантационной стадии развития обратная связь может осуществляться через механизмы ядерно-цитоплазматического взаимодействия. Чем более изменчива среда, в которой развивается эмбрион, тем большая роль отводится цитоплазме как механизму приведения ядра в состояние, соответствующее данной стадии развития эмбриона. Полученные на сегодняшний день результаты позволяют предположить, что у зародышей млекопитающих, развивающихся в среде, стабильность которой является максимально возможной, цитоплазма частично утрачивает регуляторные функции и выступает в первую очередь как система поддержания жизнедеятельности ядра.

Понятно, что любое изменение условий развития зародыша млекопитающего может быть только ухудшением. Замедление развития зародышей в культуре связано, скорее всего, с неспецифическим понижением скоростей метаболизма. В первую очередь будут замедляться процессы, запуск которых в меньшей степени зависит от ядра, поскольку цитоплазма играет роль «буфера» между средой и ядром. Наличие автономной кортикальной активности указывает на существование «цитоплазматических часов» [30], регулирующих цитокинез. Вероятно,

поэтому наиболее заметное влияние экспериментальные воздействия оказывают на скорость дробления зародышей (см. табл. 2). Транскрипция и трансляция для запуска кавитации заканчиваются лишь за несколько часов до начала образования бластоцели [31]. В таком случае роль ядра в запуске этого процесса может быть значительно бо́льшая, чем в случае деления, — будет наблюдаться относительная независимость кавитации от условий развития.

Тот факт, что зародыши, развивающиеся *in vitro*, начинают образовывать бластоцель при меньшем числе клеток, чем *in vivo*, указывает на независимость запуска кавитации ни от количества циклов репликации ДНК, ни от ЯЦС. То есть механизмы морфогенеза и цитокинеза относительно независимы друг от друга. Результаты, полученные при изучении развития зародышей с увеличенным ЯЦС, не опровергают эту гипотезу. После удаления части цитоплазмы условия наиболее неблагоприятны для развития зародышей: на факт культивирования с 1-клеточной стадии накладывается отсутствие трети систем жизнеобеспечения. В результате, к 90-му ч развития число клеток у зародыша на треть ниже, чем *in vivo*. Поэтому неудивительно, что на столько же уменьшается и число клеток у ранних бластоцист.

Для проверки гипотезы о независимости морфогенеза от ЯЦС мы предполагаем изучить развитие зародышей с удвоенным объемом цитоплазмы.

Авторы выражают глубокую признательность А. Д. Груздеву (Ин-т цитологии и генетики СО АН СССР) за идею оптической схемы и соавты по изготовлению стереомикроскопа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II. Control of the onset of transcription // *Cell*.— 1982.—30, N 3.— P. 687—696.
2. Kobayakawa Y., Kubota H. Temporal pattern of changes and the onset of gastrulation in amphibian embryos developed from eggs with reduced cytoplasm // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*— 1981.—62.— P. 83—94.
3. Howlett S. K., Barton S. C., Surani M. A. Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos // *Development*.— 1987.—101, N 4.— P. 915—925.
4. Bavister B. D. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro* // *Theriogenology*.— 1988.—29, N 1.— P. 143—154.
5. Whitten W. K. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro* // *Adv. Biosci.*— 1971.—6.— P. 129—139.
6. 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.
7. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs // *Cytogenetics*.— 1966.—5, N 6.— P. 394—400.
8. McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion // *Science*.— 1983.—220, N 4603.— P. 1300—1302.
9. Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—332 p.
10. Титенко Н. В. Цитогенетические нарушения и смертность зародышей мышей до имплантации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1977.—26 с.
11. Морозова Л. М. Роль генетико-физиологических отношений мать — потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1978.—22 с.
12. Goldbard S. B., Warner C. M. Genes affect the timing of early mouse embryo development // *Biol. Reprod.*— 1982.—27, N 2.— P. 419—424.
13. Smith R., McLaren A. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*— 1977.—41.— P. 79—92.
14. Tarkowski A. K. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs // *Acta theriol.*— 1959.—3, N 11.— P. 191—267.
15. Rands G. F. Cell allocation in half- and quadruple-sized preimplantation mouse embryos // *J. Exp. Zool.*— 1985.—236, N 1.— P. 67—70.
16. Rands G. F. Size regulation in the mouse embryo. II. The development of half embryos // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*— 1986.—98.— P. 209—217.
17. Siracusa G., Whittingham D. G., De Felici M. The effect of microtubule- and microfilament-disrupting drugs on preimplantation mouse embryos // *Ibid.*— 1980.—60.— P. 71—82.
18. Barton S. H., Surani M. A. H. Microdissection of mouse egg // *Exp. Cell Res.*— 1983.—146, N 1.— P. 187—191.

19. *Lehtonen E.* Changes in cell dimensions and intercellular contacts during cleavage-stage cell cycles in mouse embryonic cells // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1980.—58.— P. 231—249.
20. *Handyside A. H., Edidin M., Wolf D. E.* Polarized distribution of membrane components on two-cell mouse embryos // *Roux Arch. Develop. Biol.*—1987.—196, N 5.— P. 273—279.
21. *McClay D., Eitensohn C. A.* Cell adhesion in morphogenesis // *Annu Rev. Cell Biol.*—1987.—3.— P. 319—347.
22. *Calarco-Gillam P.* Cell-cell interactions in mammalian preimplantation development // *Developmental biology: a comprehensive synthesis* / Ed L. W. Browder.— New York: Plenum press, 1986.— P. 329—371.
23. *Takeichi M.* Cadherins: a molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis // *Trends Genet.*—1987.—3, N 8.— P. 213—217.
24. *Hadjilka M., Hillman H.* Ultrastructural studies of the mouse blastocyst substages // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1975.—32.— P. 675—695.
25. *Surani M. A. H., Barton S. C., Burling A.* Differentiation of 2-cell and 8-cell mouse embryos arrested by cytoskeletal inhibitors // *Exp. Cell Res.*—1980.—125, N 2.— P. 275—286.
26. *Dean W. L., Rossant J.* Effect of delaying DNA replication on blastocyst formation in the mouse // *Differentiation.*—1984.—26, N 2.— P. 134—137.
27. *Prather R. S., First N. L.* Reprogramming of murine blastocoele formation // *J. Exp. Zool.*—1986.—237, N 3.— P. 347—350.
28. *Peizoldt U., Muggleton-Harris A.* The effect of the nucleocytoplasmic ratio on protein synthesis and expression of a stage-specific antigen in early cleaving mouse embryos // *Development.*—1987.—99, N 4.— P. 481—493.
29. *Bolton V. N., Oades P. J., Johnson M. H.* The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*—1984.—79.— P. 139—163.
30. *Autonomous* cortical activity in mouse eggs controlled by a cytoplasmic clock / *M. Waksmundzka, E. Krysiak, J. Karasiewicz et al.* // *Ibid.*— P. 77—96.
31. *Kidder G. M., McLachlin J. R.* Timing of transcription and protein synthesis underlying morphogenesis in preimplantation mouse embryos // *Develop. Biol.*—1985.—112, N 2.— P. 265—275.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 17.04.89

ROLE OF THE NUCLEOCYTOPLASMIC RATIO
IN THE REGULATION OF THE MAMMAL DEVELOPMENT.
DEVELOPMENT OF ZYGOTES WITH A DECREASED
CYTOPLASM VOLUME

S. V. Evsykov, L. M. Morozova, A. P. Solomko
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

S u m m a r y

Following 3 days after microsurgical removal of 1/3 of the cytoplasm volume, more than 90 % of mouse zygotes developed in vitro into morulae and blastocysts. Development of such embryos was considerably delayed. The mean cell number of nascent blastocysts was significantly lower than in control, thus revealing that the start of cavitation somewhat depends upon the nucleocytoplasmic ratio. Comparison of preimplantation embryos developing under different conditions in vivo, in vitro from two-cell or one-cell stages indicates that start cavitation depends on the absolute time passed from the beginning of the development. These results suggest that the «biological clock» works at the genomic level, while the nucleocytoplasmic ratio can be considered as a feedback mechanism operating during the preimplantation development. The viability of morulae and blastocysts developed in vitro has been proved by their transplantations to pseudo-pregnant females.