

БІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК 57:612:636

Н.О. Корчан

Полтавський національний педагогічний університет
імені В.Г. Короленка
вул. Остроградського, 2, Полтава, 36003, Україна
nataly.korchan@gmail.com

ТЕХНОЛОГІЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ФАКТОРІВ РОЗВИТКУ

Усі ланки біотехнологічного процесу отримання ембріонів in vitro поступають ефективністю перед такими, що мають місце in vivo. Як відомо, розвиток ембріону обумовлений формуванням ооцит-кумулясного комплексу – яйцеклітини (ооциту), оточеної кількома шарами спеціалізованих зернистих (кумулясних) клітин, які знаходяться і дозрівають у фолікулі яєчника. Аналіз літературних даних свідчить про те, що біотехнологію отримання ембріонів in vitro можна значно покращити, якщо хоча б деякі умови середовища культивування ооцит-кумулясних комплексів і ембріонів, які повсюдно надмірно стабілізують, замінити на примусово осцилюючі з відомими біоритмами.

Щодо середовища культивування ооцит-кумулясних комплексів in vitro нами застосовано осциляцію рН в діапазоні від 7,2 од. до 8,1 од. із періодом в одну добу та розроблено й використано осциляцію температури в діапазоні від 37°C до 39°C із 40-хвилинним періодом. За розробленими технологіями проводилося безперервне культивування in vitro, яке включало культивування ооцит-кумулясних комплексів. Усього було проведено вирошування 22 культур, в яких прокультивовано 1249 ооцит-кумулясних комплексів.

Уперше у світовій практиці показано, що застосування біоритмічно осцилюючих параметрів культивування ооцит-кумулясних комплексів in vitro не зменшує приріст їх діаметра порівняно з використанням постійних умов. Хоча експериментально нами показано, що осцилюючі умови культивування майже рівнозначні постійним, наведені літературні дані й наше відповідне обґрунтування свідчать про перспективність використання саме осцилюючих умов у якості неспецифічних факторів, що стимулюють ріст і розвиток ооцит-кумулясних комплексів у лабораторних умовах. Отримані нами результати є лише першим кроком на шляху перспективного упровадження біоритмічно осцилюючих параметрів культивування біологічних мікрооб'єктів у біотехнології.

Ключові слова: біотехнологія, осциляція, рН, температура, ооцит-кумулясний комплекс, in vitro, парадигма постійності.

Дана робота є фрагментом наукової теми «Визначити закономірності впливу біоритмічних змін умов середовища на дозрівання ооцитів свині *in vitro*», № державної реєстрації 0111U004038.

Вступ. Теорія й практика біології, біотехнології та медицини свідчать про те, що дію специфічних факторів росту-розвитку живого можна деякою мірою замінити та доповнити дією неспецифічних факторів [1, 2], зокрема, зміною температури та концентрацій різних іонів, особливо катіонів водню [7, 8, 16, 17]. Вивчення впливу на процеси дозрівання та запліднення ооцитів ссавців *in vitro* з боку осциляцій концентрації кальцію, які виникають в яйцеклітині після входження в неї спермія [15], показало, що такі осциляції тривають зовсім недовго порівняно з тривалістю культури доімплантаційних ембріонів *in vitro*. У зиготах миші вони тривають лише 4 год. й зупиняються на стадії утворення пронуклеусів [11]. Виявляється, що, якщо такі осциляції концентрації кальцію підтримувати й протягом розвитку доімплантаційних ембріонів, останній значно покращується [12, 13]. А тому є всі підстави очікувати, що можливе успішне застосування біоритмічної осциляції рН і температури в якості факторів, що стимулюють ріст і розвиток ооцит-кумулясного комплексу та ембріонів. Це – наша робоча гіпотеза, яку ми намагалися перевірити. Наше завдання й полягало саме у спробі розробити такі технології культивування ооцитів *in vitro*, в яких стимуляція росту-розвитку такими факторами стала б можливою.

Метою дослідження було розробити технологію культивування *in vitro* ОКК із застосуванням біоритмічної осциляції рН і температури в якості факторів, що стимулюють ріст і розвиток ооцит-кумулясного комплексу та ембріонів.

Об'єкт і методи дослідження. Ооцит-кумулясний комплекс (ОКК) являє собою яйцеклітину (ооцит), оточену кількома шарами спеціалізованих зернистих (кумулясних) клітин, які знаходяться і дозрівають у фолікулі яєчника та забезпечують живлення яйцеклітини і розвиток ембріону. ОКК культивували з метою оцінки їх розвитку за приростом діаметра протягом перших 24 год., а також із метою отримання зрілих ооцитів, придатних до запліднення. Елементи цієї й наступних технологій викладені у роботах [9, 10]. Яєчники свиней отримували на м'ясокомбінаті із убитих на м'ясокомбінаті свиней незалежно від породи останніх. Транспортували їх у термосі при температурі, не нижчій за 20°C. Час від узяття останнього яєчника до початку виділення ОКК становив від 2 до 3 год. У лабораторії, в універсальній настільній бактерицидній камері УНБК-1, в яку вмонтовано бінокулярний мікроскоп, яєчник обмивали стерильним фізіологічним розчином (ФР) із температурою від 25°C до 39°C. ОКК разом із ФР вилучали з фолікулів за допомогою піпетки із металевою голкою.

Використовували фолікули з діаметром не менше 2 мм. Відсмоктану піпеткою ФР з ОКК виприскували у флакончик об'ємом 20 мл. Зібраній у такий спосіб ФР з ОКК давали відстоятися 5 хв., щоб останні осіли на дно. ФР відбирали, залишаючи ОКК на дні флакона, й центрифугували протягом 5 хв. зі швидкістю 3 тис. об./хв. Центрифуговану ФР додавали в кількості 10% або 20% до середовища IV МОКК. Залишок ФР з ОКК знову збовтували й виливали у велику чашку Петрі, в якій ОКК відшукували й переносили в аналогічне середовище, де їх збиралися культивувати із метою дозрівання.

Зібрані ОКК переносили ще через дві чашки з таким же поживним середовищем, щоб відмити їх від ФР та щоб отримати середовище культивування ОКК саме із 10% або 20% ФР. ОКК розсаджували наосліп у дослідні та контрольні скляні чашки з поживним середовищем. Скляні чашки культивування власноручно виготовляли із флаконів з-під інсуліну. Діаметр чашки – 15 мм, її висота – 10 мм. Ці чашки вкладали у газові камери, в яких їх продували газовою сумішшю із вуглекислого газу й повітря. Флакони вкладали у термостат та термоосцилятор.

Для дозрівання ОКК використовували середовище NCSU, яке готували самостійно згідно інструкції [14]. Його склад такий: хлорид натрію – 108,7 мМ, хлорид калію – 4,78 мМ, лактат кальцію п'ятиводний – 1,71 мМ, калій фосфорнокислий однозаміщений – 1,19 мМ, сульфат магнію семиводний – 1,19 мМ, глутамін – 1,0 мМ, глюкоза – 5,55 мМ, таурин – 7,0 мМ, гіпотаурин – 5,0 мМ, піруват натрію – 0,33 мМ, гідрокарбонат натрію – 25,07 мМ, гентаміцину сульфат – 20 мкг/мл, цистеамін – 0,57 мМ. Отримане середовище стерилізували фільтруванням за допомогою власноручно зібраної установки. Вакуум створювали вакуумним компресором. Приготоване середовище продували газовою сумішшю, що забезпечувала рН від 7,3 од. до 7,4 од., й зберігали в холодильнику. Напередодні культивування середовище розливали по скляних камерах, по 0,7 мл, й нашаровували на нього вазелінову олію, теж по 0,7 мл. Скляні камери з середовищем вкладали у газові камери або витягували з них за допомогою пристосованого для цієї мети пінцета. Стерильне середовище доповнювали 10% або 20% ФР, 10 МО/мл ХГЛ, 10 МО/мл хоріонічним гонадотропіном коня. Перші 22 год. ОКК культивували у середовищі дозрівання з цими гормонами, а наступні 22-24 год. культивування продовжували без них.

Після закінчення культивування ОКК ооцити позбавляли кумулюсних клітин багатократним піпетуванням скляними піпетками із діаметром отвору, трохи меншим за такий дозрілого ОКК, а в кінці цього процесу – піпеткою з діаметром отвору, трохи більшим за такий в ооциту. Ооцити без кумулюсних клітин відмивали трикратно у середовищі запліднення й залишали в такому ж середовищі у термостаті або термоосциляторі до моменту введення у чашку з ооцитами ще й сперміїв.

Осциляцію температури із 40-хвилинним періодом у термостаті ТС-80 створювали у такий спосіб [5]. Укладали в термостат закриті ємності з водою об'ємом від 1 л до 3 л, із загальним об'ємом, який доходив іноді до 35 л.

Термостат приєднували до електричної мережі через декілька послідовно з'єднаних таймерів фірм «Brilux» та «Feron». Розробили графік почергового, через кожні 20 хв., включення-виключення термостату й відповідно запрограмували на умикання-вимикання таймери.

Амплітуду осциляції температури регулювали шляхом зміни в термостаті об'єму води. Чим менший об'єм води містився у термостаті, тим більшою була амплітуда осциляції температури. Температура повітря в термостаті осцилювала в цей час у діапазоні від 35°C до 41°C. Робота термостата в такому режимі перетворює його на термоосцилятор. Температуру в камері культивування вимірювали ртутним термометром.

На рис. 1 наведено графік зміни температури середовища культивування із 40-хвилинним періодом у термоосциляторі; вона відбувалася за (ко)синусоїдою. Величину амплітуди осциляції температури вимірювали вранці.



Рис. 1. Графік зміни температури середовища культивування із 40-хвилинним періодом у термоосциляторі (на прикладі однієї з культур).

В якості газової фази середовища культивування використовували суміш, яку створювали шляхом змішування потоків CO_2 із балону і повітря, котре подавали за допомогою акваріумного компресора. Змішування потоків газів проводили в апараті Боброва, заповненому бідистильованою водою. Потрібної для культивування величини постійного рН досягали шляхом збільшення чи зменшення одного з газових потоків за безперервного контролю цього показника середовища культивування рН-метром [2, 3, 4].

Осциляцію рН середовища культивування із добовим періодом створювали за методом Денисюка [3, 4] за новим призначенням [6]. Для цього використовували спеціально сконструйовані газові камери – алюмінієві бокси з напівпроникними для газів трубками із силіконової гуми [4]. ОКК переносили у скляні камери із середовищем дозрівання, на яке попередньо нашарували вазелінову олію. Ці камери вкладали у газові камери. Останні продували сумішшю CO_2 з повітрям, яка надавала середовищу мінімальний рН на рівні 7,2 од. й поміщали у термостат або термоосцилятор залежно від того, який варіант культивування здійснювали (лише осциляцію рН, чи й осциляцію температури). Через добу реакція середовища ставала значно більш лужною завдяки виходу CO_2 у простір газової камери, а потім із нього у повітряний простір термостату чи термоосцилятора за градієнтом його концентрації. За умов досягнення максимального рН середовища скляні камери витягували із газових, ОКК міряли, ОКК, яйцеклітини та ембріони розглядали, фотографували, пересаджували в інше середовище. Діапазони осциляції рН середовища культивування вимірювали окремо для

термоосцилятора й термостата. Продування газової камери наступного дня знову закислювало середовище, яке через деякий час знову починало залужнюватися.

Результати досліджень та їх обговорення. Розроблено технологію культивування *in vitro* ОКК із застосуванням біоритмічної осциляції рН і температури у якості фактора, що стимулює ріст і розвиток ОКК та ембріонів. За розробленими технологіями проводилося безперервне культивування *in vitro*, яке включало культивування ОКК. Усього було проведено 22 культури, в яких прокультивовано 1249 ОКК. Усі дослідження проведені у лабораторії фізіології Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН України. Об'єм і схема досліджень представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Загальна схема та об'єм досліджень

Назва досліджень	Кількість прокультивованих ОКК	Досліджувані показники
Приріст діаметра ОКК за постійних та осцилюючих умов середовища дозрівання, приготованого на основі середовища NCSU, з 10% ФР:	697	<ul style="list-style-type: none"> • початковий та кінцевий розміри діаметра ОКК; • процент приросту діаметра ОКК; • температура та рН середовища дозрівання ОКК; • діапазон осциляції • температури середовища дозрівання ОКК; • діапазон осциляції; • рН середовища дозрівання ОКК
1) постійні умови	185	
2) осциляція температури	177	
3) осциляція рН	173	
4) осциляція і температури, і рН	162	
Приріст діаметра ОКК за постійних та осцилюючих умов середовища дозрівання, приготованого на основі середовища 199, з 10% ФР за першої та 20% ФР за другої умови культивування:	320	
1) постійні умови	135	
2) осциляція температури	139	
3) осциляція рН	46	
Приріст діаметра ОКК за постійних та осцилюючих умов середовища дозрівання, приготованого на основі середовища NCSU, з 10% ФР за першої, та 20% ФР за другої умови культивування:	232	
1) постійні умови	75	
2) осциляція температури	77	
3) осциляція рН	80	

Порівняння проценту приросту діаметра ОКК за постійної та осцилюючої температури, незалежно від інших умов культивування (культури №№ 1-22, табл. 2), показує відсутність достовірної різниці між цими величинами. Так само, відсутня достовірна різниця й між процентом приросту діаметра ОКК за постійного та осцилюючого рН, незалежно від інших умов культивування (культури №№ 1-13 та 17-22, табл. 3).

Таблиця 2

**Порівняння розвитку ОКК
за постійної та осцилюючої температури
незалежно від інших умов культивування (культури №№ 1-22)**

	Температура культивування					
	постійна, n = 395			осцилююча, n = 393		
	Діаметр, М±m од.		Приріст, %	Діаметр, М±m од.		Приріст, %
	початковий	кінцевий		початковий	кінцевий	
М±m	15,21±0,17	23,32±0,43	43,75±3,68	14,57±0,18	23,18±0,48	44,61±3,13
Cv	22,36	36,79	38,54	24,20	41,15	32,10

Примітка. Різниця між відповідними значеннями М±m недостовірна.

Таблиця 3

**Порівняння розвитку ОКК
за постійного та осцилюючого рН
незалежно від інших умов культивування (культури №№ 1-13 та 17-22)**

	рН культивування					
	постійний, n = 293			осцилюючий, n = 268		
	Діаметр, М±m од.		Приріст, %	Діаметр, М±m од.		Приріст, %
	початковий	кінцевий		початковий	кінцевий	
М±m	15,51±0,19	25,16±0,51	47,04±3,69	14,82±0,19	23,29±0,47	43,12±2,90
Cv	21,15	34,86	33,27	21,93	35,04	28,55

Примітка. Різниця між відповідними значеннями М±m недостовірна.

Висновки:

1. Розроблено технологію культивування *in vitro* ОКК у середовищі, температуру якого піддають осциляції у діапазоні від 37°C до 39°C із 40-хвилинним періодом.

2. Розроблено технологію культивування *in vitro* ОКК у середовищі, рН якого піддають осциляції у діапазоні від 7,2 од. до 8,1 од. із періодом в одну добу.

3. Немає достовірної різниці між процентами приросту діаметра ОКК за постійної та осцилюючої температури, незалежно від проценту вмісту ФР в тому чи іншому середовищі культивування.

4. Немає достовірної різниці між процентами приросту діаметра ОКК за постійного та осцилюючого рН, незалежно від проценту вмісту ФР в тому чи іншому середовищі культивування.

5. Хоча експериментально нами показано, що осцилюючі умови культивування майже рівнозначні постійним, приведені літературні дані й наше відповідне обґрунтування незаперечно свідчать про перспективність використання саме осцилюючих умов у якості неспецифічних факторів, що стимулюють ріст і розвиток ОКК та ембріонів.

6. Неспецифічний фактор розвитку у вигляді осциляції температури й рН, який ми використали у розроблених технологіях культивування *in vitro* ОКК, є більш адекватним природі живого, фізіолого-біохімічним процесам у ньому, ніж такий у вигляді застосування температури культивування, значно більшої за ту, якою характеризуються фолікули на завершальній стадії дозрівання ОКК, і який використовують зараз більшість учених у своїх дослідженнях.

Список використаної літератури:

1. Денисюк П.В. Принципиально новый метод культивирования доимплантационных эмбрионов млекопитающих / П.В. Денисюк, Н.А. Мартыненко // Доповіді НАН України. – 1995. – № 11. – С. 148–149.
2. Денисюк П.В. Вплив рН середовища на розвиток *in vitro* доімплантаційних ембріонів свині : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.13. «Фізіологія людини і тварин» / П.В. Денисюк. – Харків, 1997. – 25 с.
3. Пат. 10067 А, Україна, клас 5 С12 N5/00 Спосіб культивування доімплантаційних ембріонів ссавців поза організмом / Денисюк П. В.; заявник і патентоутримувач Інститут свинарства УААН. – № 93111621; заявл. 23.04.1993; опубл. 30.09.1996, Бюл. № 3.
4. Пат. 46186 А, Україна, клас 6 А61М1/14, С/12N5/06. Спосіб примусової осциляції рН середовища культивування біологічних мікрооб'єктів / Денисюк П.В.; заявник і власник патенту Інститут свинарства УААН. - № 98094883; заявл. 17.09.1998; опубл. 15.05.2002, Бюл. № 5.
5. Пат. 62419 Україна, МПК (2011.01) А01 63/00. Спосіб культивування поза організмом ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) за температури, осцилюючої з одногодинним періодом / Корчан Н.О., Денисюк П.В.; заявник і власник патенту Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького НААН України. – № u201101851; заявл. 17/02/2011; опубл. 25.08.2011. Бюл. № 16.
6. Пат. 68013 Україна, МПК (2012.01), С12N 5/00, А61М 1/00. Застосування примусової біоритмічної осциляції рН середовища культивування поза організмом як способу,

- призначеного для збільшення міри розростання ооцит-кумуляюсних комплексів (ОКК) / Корчан Н.О., Денисюк П.В.; заявник і власник патенту Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України. – № у 2011 10439; заявл. 29.08.2011; опубл. 12.03.2012, Бюл. № 5.
7. Cooke S. Objective assessment of temperature maintenance using in vitro culture techniques / S. Cooke, J.P. P. Tyler, G. Driscoll // J. of Assisted Reprod. and Genetics. – 2002. – Vol. 19, № 8. – P. 368–375.
 8. Ju J.C. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia / J.C. Ju, J.K. Tseng // Mol. Reprod. and Dev. – 2004. – Vol. 68. – Is. 1. – P. 125–133.
 9. Koo D.B. Effects of in vitro fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos / D.B. Koo, Y.J. Kim, I. Yu et al. // Anim. Reprod. Sci. – 2005. – Vol. 90. – Is. 12. – P. 101–110.
 10. Krisher R.L. Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals / R.L. Krisher. – John Wiley & Sons, 2013. – 248 с.
 11. Marangos P. Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei / P. Marangos, G. Fitzharris, J. Carroll // Development. – 2003. – Vol. 130. – P. 1461–1472.
 12. Ozil J.P. Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach / J.P. Ozil // Biophys. Chem. – 1998. – Vol. 72, №1–2. – P. 141–152.
 13. Ozil J.P. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained [Ca(2+)](cyt.) signal in the mouse / J.P. Ozil, S. Markoulaki, S. Toth et al. // Dev. Biol. – 2005. – Vol. 282. – P. 39–54.
 14. Petters R.M. Culture of pig embryos / R.M. Petters, K.D. Wells // J. Reprod. Fertil. – 1993. – Suppl. 48. – P. 61–73.
 15. Saunders C.M. PLC zeta: a sperm – specific trigger of Ca (2+) oscillations in eggs and embryo development / C.M. Saunders, M.G. Larman, J. Parrington et al. // Development. – 2002. – Vol. 129, № 15. – P. 3533–3544.
 16. Shi D.S. Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes / D.S. Shi, B. Avery, T. Greve // Theriogenology. – 1998. – Vol. 50, №4. – P. 667–674.
 17. Suzuki H. Influence of incubation temperature on meiotic progression of porcine oocytes matured in vitro / H. Suzuki, Y. Takashima, K. Toyokawa // J. Mamm. Ova Res. – 2001. – Vol. 18. – P. 8–13.

Рекомендує до друку С.М. Білаш

Отримано 02.06.2016

Н.А. Корчан

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленко

ПРИМЕНЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РАЗВИТИЯ В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Все звенья биотехнологического процесса получения эмбрионов *in vitro* уступают по эффективности перед теми, что имеют место *in vivo*. Как известно, развитие эмбриона обусловлено формированием ооцит-кумуляюсного комплекса – яйцеклетки (ооцита), окруженной несколькими слоями специализированных зернистых (кумуляюсных) клеток, которые находятся и созревают в фолликуле яичника. Анализ литературных данных убедительно свидетельствует о том, что биотехнологию получения эмбрионов *in vitro* можно

значительно улучшить, если хотя бы некоторые условия среды культивирования ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) и эмбрионов, которые всюду чрезмерно стабилизируют, заменить на принудительно осциллирующие с известными биоритмами.

Относительно среды культивирования ОКК *in vitro* нами применена осцилляция pH в диапазоне от 7,2 ед. до 8,1 ед. с суточным биоритмом, а так же разработана и использовалась осцилляция температуры в диапазоне от 37°C до 39°C с 40-минутным периодом. Согласно разработанных технологий проводилось непрерывное культивирование *in vitro*, которое включало культивирование ооцит-кумулясных комплексов. Всего было проведено выращивание 22 культур, в которых прокультивировано 1249 ооцит-кумулясных комплексов.

Впервые в мировой практике показано, что использование биоритмично осциллирующих параметров культивирования ОКК *in vitro* не уменьшает прирост их диаметра по сравнению с использованием стабильных условий. Хотя экспериментально нами показано, что осциллирующие условия культивирования практически равнозначны стабильным, приведенные литературные данные и наше соответствующее обоснование свидетельствует о перспективности использования именно осциллирующих условий в качестве неспецифических факторов, которые стимулируют рост и развитие ооцит-кумулясных комплексов в лабораторных условиях. Полученные результаты являются лишь первым шагом на пути перспективного внедрения биоритмично осциллирующих параметров культивирования биологических микрообъектов в биотехнологии.

Ключевые слова: биотехнология, осцилляция, pH, температура, ооцит-кумулясный комплекс (ОКК), *in vitro*, парадигма постоянства.

N.O. Korchan

Poltava V.G. Korolenko National Pedagogical University

USING OF NONSPECIFIC FACTORS AS ACTIVATORS OF TECHNOLOGY OF CULTIVATION THE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES

Every step of biotechnology process for embryo obtaining *in vitro* is less effective than those is *in vivo*. As it is known, development of embryo caused by formation of oocyte cumulus complex – the oocyte surrounded by several layers of specialized granular (cumulus) cells, which are maturing in the ovarian follicle. Literature data analysis convincingly indicate that biotechnology for embryo obtaining may be significantly improved if some culture conditions for cumulus oocyte complexes and embryos, which are everywhere over stabilized, were forced to be oscillating with known biorhythms.

Concerning medium for cumulus-oocyte complexes cultivation *in vitro*, we applied the pH oscillation in the range from 7,2 to 8,1 units with circadian period and it was worked out and used the temperature oscillation in the range from 37 to 39°C with a 40-minute period. With the developed technologies it was conducted the continuous cultivation *in vitro*, which included cultivation of cumulus oocyte complexes. In total there were grown 22 cultures, in which 1249 oocyte-cumulus complexes where received.

For the first time in the world practice we have shown, that applying of biorhythmically oscillating parameters for oocyte-cumulus complexes cultivation *in vitro* does not decrease diameter gain when compared with use of constant conditions. Though we have shown that oscillating culture conditions are not worse than constant ones, the literature data and our theoretical ground convincingly give evidence about great perspectives namely oscillatory culture conditions as nonspecific factors of stimulating growth and development of oocyte-cumulus complexes *in vitro*. This is only the first step on the way of perspective introduction the biorhythmically oscillating parameters for cultivation of biological microobjects in biotechnology.

Key words: biotechnology, oscillation, pH, temperature, cumulus-oocyte complexes (COCs), *in vitro*, paradigm of constancy.