

---

**ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ**


---

УДК 57.085.1/.2:577.175.3/.7:591.3+599

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.1.5-23

**ОВАРИАЛЬНАЯ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВАЯ СИСТЕМА  
КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (обзор)**

Сметанина И.Г.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФНЦ животноводства –  
ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской обл., Российская Федерация*

Основная причина снижения показателей воспроизводства у высокопродуктивных животных заключается в нарушении эндокринной регуляции функции яичников. Ангиотензин II (АнгII) и его рецепторы, как составляющие ренин-ангиотензиновой системы (РАС), в яичниках млекопитающих участвуют в регуляции синтеза и секреции простагландинов и эстрогенов, роста фолликулов, овуляции и атрезии. Основные разделы обзора: РАС в организме млекопитающих, локальная яичниковая РАС у человека и других видов млекопитающих, локальная яичниковая РАС у коров, рецепторы РАС. Как правило, эффективность созревания ооцитов *in vitro* ниже, чем *in vivo*. Важно идентифицировать факторы, лежащие в основе этого факта, чтобы можно было включать их в системы *in vitro*. Было показано, что уровень АнгII в фолликулярной жидкости человека коррелирует с относительной долей созревших ооцитов, собранных после стимуляции яичников для оплодотворения *in vitro*. Установлено, что у свиней АнгII стимулирует созревание ооцитов *in vitro* из малых и средних фолликулов; он не оказывал влияния на ядерное созревание ооцитов крупного рогатого скота (КРС) при культивировании *in vitro* ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) в отсутствие фолликулярных клеток, но в присутствии текальных клеток аннулировал ингибирующее действие этих клеток. В исследованиях авторов показано, что АнгII в концентрациях  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  М не воздействовал на выделение первого направительного тельца (ПНТ) в безбелковой среде с гормональными добавками, однако при культивировании в среде созревания без гормонов АнгII в концентрации  $10^{-7}$  М существенно ингибировал достижение яйцеклетками стадии метафазы 2 (М2). Это даёт основание предположить, что гормоны нивелируют ингибирующее действие АнгII на созревание ядра яйцеклеток в безбелковой бесклеточной системе (без сокультивирования с клетками кумулюса, гранулёзы, теки или яйцевода). В то же время другими авторами в опытах, проведенных на яйцеклетках свиней и овец, было установлено, что АнгII улучшает созревание яйцеклеток и в бессывороточной среде, и в среде с сывороткой, дополненной гормонами. Одна из причин межвидовых различий по физиологической роли РАС может состоять в различной клеточной локализации рецепторов АнгII в овариальных фолликулах. Антагонисты рецепторов ингибируют овуляцию, и они используются для изучения роли РАС в овуляторном процессе у крыс, кроликов и коров. В целом, физиологическая функция АнгII в яичнике недостаточно исследована, и большие межвидовые различия делают понимание роли РАС ещё более сложной. С другой стороны, разработка культуральных сред для полноценного созревания *in vitro* ооцитов млекопитающих может открыть широкие возможности для экспериментального изучения и мониторинга влияния и внешних и внутренних факторов на воспроизводительную функцию продуктивных животных.

*Ключевые слова:* млекопитающие, коровы, ооциты, созревание *in vitro*, ренин-ангиотензиновая система

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2020, 1: 5-23*

**Введение**

*Используемые сокращения:* Анг I – ангиотензин I; Анг II – ангиотензин II; Анг III- ангиотензин III; Анг IV – ангиотензин IV; Анг (1-7) – ангиотензин (1-7); АПФ – ангиотензин-превращающий фермент; АРТ1 – рецепторы к АнгII первого типа; АРТ2 – рецепторы к АнгII второго типа; АРТ3 – рецепторы к АнгII третьего типа; АРТ4 – рецепторы к АнгII четвертого типа; БСА – бычий сывороточный альбумин; ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребых кобыл; ЗП – зародышевый

пузырек; КРС – крупный рогатый скот; ЛГ – лютеинизирующий гормона; М1 – метафаза 1; М2 – метафаза 2; мРНК – матричная РНК; ОКК-ооцит-кумуляный комплекс; ОВРАС – локальная овариальная РАС; ПНТ – первое направляющее тельце; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РАС – ренин-ангиотензиновая система; СРЗП – стадия разрушения зародышевого пузырька; тРНК – транспортная РНК; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; хГч – хорионический гонадотропин человека; чМг – менопаузальный гонадотропин человека; ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение; AREG – ампирегулин (amphiregulin); EREG – эпирегулин (epiregulin); GnRH – гонадотропин-рилизинг гормон (gonadotropin releasing hormone); IVC – культивирование *in vitro*; IVF – оплодотворение *in vitro*; LO – лозартан, антагонист АРТ1 с низкой аффинностью к АРТ2 рецепторам; PD123319 – антагонист АРТ2; PG человека простагландин; PGE<sub>2</sub> простагландин человека E<sub>2</sub>; PGF<sub>2α</sub> простагландин человека F<sub>2α</sub>; PTGS2 – эндопероксид синтаза 2 (endoperoxid synthase 2).

В последние годы значительно расширился спектр применения клеточных IVC- технологий, в частности системы созревания ооцитов и культивирования эмбрионов млекопитающих вне организма. Помимо изучения фундаментальных механизмов раннего развития млекопитающих, эти системы широко используются в медицине и фармакологии, в т.ч. для разработки новых коммерческих сред для ЭКО в животноводстве, в частности, для воспроизводства генетически ценных продуктивных животных.

Несомненно, что использование IVC-систем и модельных животных может значительно углубить понимание фундаментальных механизмов раннего эмбрионального развития (Krisher, 2012; Wall, Shani, 2008).

Процессы созревания ооцитов у мышей отличается от таковых у коров. Мышь – полиовуляторное животное, у него эмбриональный сигнал нечёткий и поддержание функции жёлтого тела зависит от множества различных регуляторных факторов. Финальные стадии созревания ооцитов более тонко регулируются у коров, у которых определённый размер фолликула необходим для завершения созревания *in vitro*. Преимплантационные эмбрионы КРС и человека схожи с точки зрения биохимических процессов и взаимодействия между эмбрионом и жёлтым телом, хотя механизмы имплантации у мыши и человека имеют некоторые общие черты (Menezo, 2002). Согласно данным, полученным в ряде лабораторий, созревающие ооциты КРС могут быть использованы как модель для скрининга токсичных для эмбрионов метаболических и внешне средовых агентов (Beker van Woudenberg et al., 2012; Santos et al., 2014).

Многие факторы, влияющие на процесс созревания ооцитов млекопитающих *in vivo*, в настоящее время ещё не идентифицированы, и по этой причине эффективность созревания ооцитов в системах IVC ниже, чем *in vivo*. Важно идентифицировать эти факторы, с тем, чтобы можно было включить их в полноценную систему IVC.

АнгII и его рецепторы, как составляющие РАС, в яичниках млекопитающих участвуют в регуляции синтеза и секреции простагландинов и эстрогенов, роста фолликулов, овуляции и атрезии, что позволило ввести концепцию “локальной” или “тканевой” РАС (Schauser et al., 2001). Предшественник АнгII – ангиотензиноген синтезируется в печени расщепляется под действием ренина до декапептида и АнгI. АПФ, широко представленный в эндотелиальных клетках, расщепляет АнгI до АнгII. Установлено, что перед овуляцией уровень АнгII у кроликов повышается в яичниках после введения хГч (Yoshimura, 1994), у коров – ЛГ (Shimizu et al., 2007), у женщин – чМг и хГч (Lightman et al., 1987).

Одной из причин межвидовых различий в физиологической роли РАС может быть разная клеточная локализация рецепторов АнгII в овариальных фолликулах (Yoshimura, 1997). В связи с тем, что роль АнгII в созревании яйцеклеток коров изучена недостаточно, цель наших экспериментальных исследований состояла в оценке влияния разных концентраций АнгII на ядерное созревание яйцеклеток коров *in vitro* в бессывороточной среде МЕМ-альфа с гормональными добавками или без них.

Цель данной работы – систематизация литературных данных и результатов собственных исследований, касающихся влияния АнгII на созревание ооцитов у млекопитающих.

### **Ренин-ангиотензиновая система в организме млекопитающих**

Белок ангиотензиноген кодируется одним геном, который экспрессируется, главным образом, в печени, хотя экспрессия его мРНК детектируется в других тканях, включая яичник (Ohkubo et al., 1986). Его расщепление до декапептида АнгI осуществляется ренином, каталитическая активность ренина проявляется после отщепления сегмента проренина, включающего 43 аминокислоты (Do et al., 1987). Фермент АПФ конвертирует декапептид АнгI в октапептид АнгII посредством специфического расщепления Phe8-His9 связи с освобождением дипептида His-Leu. АнгII представлен в высоких концентрациях в яичниках млекопитающих (Husain et al., 1987; Lightman et al., 1987; Lightman et al., 1988; Palumbo et al., 1989), подтверждая, что он играет важную роль в функционировании яичников.

РАС – филогенетически старая система, которая представлена у всех позвоночных. У большинства видов млекопитающих пятая аминокислота последовательности АнгII – изолейцин (Ile), в то время как у коров и немлекопитающих тетраподов на этой позиции находится валин (именуемый [Val5] - АнгII).

Проренин продуцируется и секретируется, главным образом, почками, но также описаны экстраренальные источники. Концентрация проренина в фолликулярной жидкости в 12 раз выше, чем в системной циркуляции, и он был иммунологически идентифицирован в почках и плазме крови (Glorioso et al., 1986).

Было идентифицировано два подтипа рецептора АнгII (Bottari et al. 1993, De Gasparo et al. 1995, Gallinat et al. 2000). Классические эффекты АнгII касаются мышечного сокращения, секреции альдостерона, и регуляции кровяного давления, и они опосредуются АРТ1. В настоящее время известно, что рецептор АРТ2 является медиатором некоторых репродуктивных функций, включая стероидогенез, созревание ооцитов и овуляцию (Kuji et al., 1996; Yoshimura et al., 1996; Ferreira et al., 2007). У коров АРТ2 представлен в доминантном фолликуле (Schauer et al., 2001), и экспрессия его мРНК положительно коррелирует продукцией эстрадиола (Portela et al., 2006).

Установлено, что перед овуляцией уровень АнгII повышается в яичнике после введения хГч кроликам (Yoshimura et al., 1994), ЛГ коровам (Acosta et al., 2000; Shimizu et al., 2007) и чМг и хГч женщин (Lightman et al., 1987). АнгII и его метаболит, АнгIII положительно коррелируют с уровнем эстрадиола и размером фолликулов у женщин, стимулированных чМг (Jarry et al., 1988).

### **Локальная яичниковая РАС у человека и других видов млекопитающих**

Данные, свидетельствующие в пользу существования овариальной РАС, состоят в следующем: 1) концентрация АнгII в фолликулярной жидкости выше, чем в плазме после обработки хГч (Husain et al., 1987); 2) высокий уровень АнгII в фолликулярной жидкости был найден после билатеральной нефрэктомии (Husain et al., 1987) и 3) перфузируемые кроличьи яичники продуцировали АнгII после введения хГч (Yoshimura et al., 1994). Однако, ренин продуцируется исключительно почками и исчезает из плазмы после билатеральной нефрэктомии (Do et al., 1987). Следовательно, в систему регуляции синтеза и поддержания концентрации АнгII могут быть включены альтернативные локальные пути.

Локальная овариальная РАС (ОВРАС) участвует в регуляции физиологических и патологических кондиций в репродуктивном тракте (Herr et al., 2013). ОВРАС оказывает значительное влияние на развитие и атрезию фолликулов, овуляцию и секрецию стероидных гормонов, что является необходимым условием для нормальной репродукции. Установлено, что активность ОВРАС регулируется гонадотропинами и зависит от активности протеаз в области растущих фолликулов. АнгII и его рецепторы широко представлены в фолликулах млекопитающих, преовуляторной теке, гранулёзных клетках, в постовуляторных пристеночных лютеиновых гранулёзных клетках и участвуют в регуляции стероидогенеза. Молекулярная блокада ОВРАС ингибирует созревание ооцита и овуляцию. Патологически изменённая функция ОВРАС ассоциируется с бесплодием, поликистозным овариальным синдромом, синдромом гиперстимуляции яичников и раком яичников. Блокада рецепторов ангиотензина применяется при лечении данных патологий. Тем не менее, наше понимание функции ОВРАС далеко не полное, и необходимость дальнейших исследований очевидна (Palumbo et al., 2016).

Яичник является источником АнгII в процессе развития фолликулов (Lightman et al., 1987; Derkx et al., 1987). Имеются сведения о выявлении иммуноферментным тестом АнгII в текальных и стромальных клетках яичников у женщин (Palumbo et al., 1989). Эти данные также свидетельствуют о

том, что клетки, чувствительные к ЛГ, являются основным источником AngII в ранней фолликулярной фазе. Было показано, что преовуляторная волна гонадотропинов активирует яичниковую РАС в гранулёзных клетках и активированные гранулёзные клетки преовуляторных фолликулов могут синтезировать ренин и AngII (Palumbo et al., 1989).

В базах данных по *in vitro* оплодотворению у человека имеются сведения о том, что концентрация проренина в фолликулярной жидкости коррелирует с развитием фолликулов, созреванием ооцит-кумулюсного комплекса и жизнеспособностью ооцитов, т.е. с наиболее существенными факторами для успешной беременности (Cornwallis et al., 1990, Itskovitz et al., 1991). Фолликулы, содержащие ооциты на стадии зародышевого пузырька и ассоциированные с компактной кумулюсной массой и незрелыми гранулёзными клетками, имели более низкий уровень фолликулярного проренина, чем фолликулы, содержащие зрелые ооциты (Itskovitz et al., 1991). Недавно показано, что уровень AngII в фолликулярной жидкости человека коррелирует с долей созревших ооцитов, собранных после стимуляции яичников для IVF (Cavallo et al., 2017).

Созревание фолликулов и качество ооцитов связано с внутрифолликулярным влиянием активного ренина и сосудистого эндотелиального ростового фактора в динамике, т.е. в зависимости от времени после введения хГч, в то время как компетенция к развитию связана только с вышеупомянутым ростовым фактором (Vokal et al., 2005). Клиническое использование ингибиторов АПФ у женщин с повышенным давлением крови может ингибировать беременность в нормальном овуляторном процессе (Yoshimura et al., 1997). То есть, если пациентки ЭКО принимают гипотензивные средства на основе ингибиторов АПФ, это может сказываться на созревании яйцеклеток.

Согласно новой концепции локальной РАС, все компоненты РАС продуцируются и регулируются в ткани, где действует AngII. Более того, показано, что AngII секретируется в фолликулярную жидкость даже в перфузируемых яичниках, подтверждая присутствие овариальной РАС.

Присутствие AngII в фолликулярной жидкости у свиней свидетельствует о том, что AngII играет важную роль в регуляции созревания ооцитов и фолликулярном развитии *in vivo*. Показано, что AngII селективно стимулирует секрецию эстрогенов в яичниках крыс без воздействия на секрецию прогестерона (Pucell et al., 1987). Локализация AngII в гранулёзных клетках развивающихся овариальных фолликулов ассоциировалась с AngII-стимулированной секрецией эстрогенов (Pucell et al., 1987). Известно, что концентрация эстрогенов в фолликулярной жидкости имеет первостепенное значение для поддержания доминантного фолликула. Паттерны распределения рецепторов AngII в субпопуляции развивающихся фолликулов схожи с распределением рецепторов ФСГ в яичнике крыс, что свидетельствует об участии AngII в регуляции овариальной функции, возможно через модуляцию концентрации фолликулярных эстрогенов (Yoshimura et al., 1996; Kuij et al., 1996; Shuttleworth et al., 2002).

Инфузия AngII индуцирует овуляцию в перфузируемых кроличьих яичниках, и антагонисты AngII ингибируют овуляцию у кроликов, крыс и коров (Kuji et al., 1996; Yoshimura et al., 1996; Ferreira et al., 2007).

Недавно было обнаружено, что уровень AngII в фолликулярной жидкости человека коррелирует с процентом созревших ооцитов, полученных после стимуляции яичников для ЭКО (Cavallo et al., 2017). Показано, что у свиней AngII напрямую стимулировал созревание яйцеклеток *in vitro* из мелких и средних фолликулов (Li et al., 2004). В тоже время, AngII не воздействовал на созревание ядра яйцеклеток коров *in vitro* при культивировании ОКК в отсутствие фолликулярных клеток, но если яйцеклетки культивировали в присутствии текальных клеток, AngII нивелировал их ингибирующее действие (Giometti et al., 2005).

В порядке демонстрации эффектов AngII на ядерное созревание ооцитов, в качестве модели была использована система IVM (*in vitro* maturation) свиных ооцитов (Li et al., 2004). При адекватных концентрациях AngII стимулировал ядерное созревание ооцитов *in vitro*, однако повышенные концентрации (1000 нг/мл) не оказывали влияния на ядерное созревание.

Хотя некоторые исследователи предполагают, что AngII может индуцировать созревание ооцитов *in vivo* или в перфузируемых яичниках (Yoshimura et al., 1996; Kuji et al., 1996), отсутствуют сообщения, касающиеся действия AngII на цитоплазматическое созревание. Формирование мужского

пронуклеуса после IVF и внутриклеточное содержание глутатиона в ооцитах – это два очень важных фактора, характеризующих цитоплазматическое созревание ооцитов большинства видов животных, особенно свиней (Wang et al., 1997; Li et al., 2002). Процентные доли IVF, MPN (формирование мужского пронуклеуса) и содержание глутатиона в ооцитах, культивированных 44 ч в среде, содержащей AngII в концентрации 100 или 1000 нг/мл, были значительно выше, чем в тех ооцитах, которые созревали в среде, содержащей AngII < 10 нг/мл (Li et al., 2004). То есть, можно заключить, что AngII повышает цитоплазматическое созревание в свиных ооцитах в процессе IVM. Однако, механизмы, посредством которых AngII повышает цитоплазматическое созревание, не выяснены. AngII проявляет активность в отношении клеточного роста и стимулирует фосфорилирование белково-связанного тирозина в различных клетках с участием APT1. AngII, связанный с APT1, ведет к активации фосфолипазы C<sub>β</sub> (PLC<sub>β</sub>), с последующим повышением концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и ингибированием аденилатциклазной активности (Miyazaki et al., 1996). Необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизмов, посредством которых AngII стимулирует созревание ооцитов у млекопитающих.

Показано, что у свиней АнгII напрямую стимулирует созревание ооцитов *in vitro* из маленьких и средних фолликулов (Li et al., 2004). Добавление АнгII к средам созревания и культивирования эмбрионов овец повышает процентную долю бластоцист, полученных из криоконсервированных ооцитов (Naderi et al., 2016a). Добавление АнгII к средам созревания и культивирования эмбрионов овец повышает процент вылупившихся бластоцист на 8-й день, в сравнении с контролем, а также число клеток в бластоцистах в группе с АнгII (Naderi et al., 2016b).

Наличие PAC в ткани яичника было установлено у млекопитающих, однако, её физиологическая роль недостаточно изучена. Были исследованы содержание АнгII в фолликулярной жидкости, локализация АнгII и его рецепторов в яичниках у свиней и влияние АнгII на созревание ооцитов (Li et al., 2004). Концентрация АнгII уменьшалась в ряду мелких, средних, больших и экстрабольших фолликулов, тогда как у коров, напротив, экспрессия АнгII наивысшая в больших фолликулах, что свидетельствует о важности этого фактора в процессе фолликулярного роста и созревания и, возможно, о наличии межвидовых различий. Вдобавок, АнгII был найден в зоне пеллюцида и гранулезных клетках с использованием иммуноферментного теста. Паттерны распределения APT1 и АнгII были схожими, однако, APT2 (другой подтип рецептора АнгII), был, главным образом, представлен в строме и клетках теки фолликулов.

В исследованиях Li et al. (2004), проведенных на свиньях, установлено, что при культивировании ооцитов из фолликулов различного диаметра в безбелковой среде с гормонами, содержащей в разной концентрации АнгII (10, 100 и 1000 ng/ml), существенно более высокая доля ооцитов достигала стадии метафазы 2 (M2) в среде с концентрацией АнгII 100 ng/ml (87%), чем в среде без АнгII (61%). При адекватных концентрациях, АнгII стимулирует ядерное созревание ооцитов *in vitro*, однако, повышенные концентрации (1000 ng/ml) не оказывают влияния на ядерное созревание. При раздельном культивировании ооцитов из фолликулов различного диаметра в среде, содержащей 100 ng/ml АнгII, процент созревания был значительно выше в ооцитах из маленьких (61.5%) и средних (85.1%) фолликулов, чем в контроле (45.1 и 72.6%, соответственно). Однако, добавление АнгII ингибировал ядерное созревание в ооцитах из больших фолликулов (77.8% против 87.3%)

Было показано, что оплодотворяемость и процентная доля формирования мужского пронуклеуса ооцитов, созревших в среде, содержащей 100 или 1000 нг/мл АнгII, были существенно выше, чем у ооцитов, созревших в среде без АнгII или с его концентрацией 10 нг/мл (Li et al., 2004). Содержание глутатиона в ооцитах, культивированных в течение 44 ч в среде с концентрацией АнгII 100 или 1000 нг/мл, было также существенно выше, чем в ооцитах, культивированных в среде без АнгII или с его концентрацией 10 нг/мл. Таким образом, у свиней АнгII в концентрации 100 нг/мл стимулирует ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов, хотя механизм его действия до конца неясен. Можно сделать вывод, что АнгII представлен в яичниках свиней и регулирует рост фолликулов и созревание ооцитов.

Действие АнгII на овуляторный процесс проявляется по-разному у разных видов животных. Показано, что АнгII играет существенную роль в индуцировании продукции простагландинов в процессе овуляции у кроликов (Yoshimura et al., 1993), однако в другой работе при

авторадиографическом исследовании на крысах авторы не нашли ожидаемого распределения АнГII рецепторов в каждом развивающемся фолликуле, т.е. не все преовуляторные фолликулы обязательно реагируют на экзогенный и эндогенный АнГII (Husain et al., 1987). Показано, что активность АнГII связана с созреванием ооцитов, овуляцией и стероидогенезом у кроликов (Yoshimura et al., 1992, 1993; Feral et al., 1995; Tanaka et al., 1995), и она ассоциируется с возобновлением мейоза (Giometti et al., 2005; Stefanello et al., 2006), стероидогенезом (Acosta et al., 1999), и фолликулярным ростом (Nielsen et al., 1994; Portela, 2006) у коров.

Концентрация АнГII в фолликулярной жидкости повышается у человека (Buccione et al., 1990) и коров (Acosta et al., 2000) перед наступлением овуляции (после введения ЛГ или хГч). Имеются также данные, что АнГII участвует в овариальном стероидогенезе у хомяков и кроликов (Kitzman, Hutz, 1992; Feral et al., 1995), в фолликулярной атрезии у крыс и кроликов (Feral et al., 1995; Daud et al., 1988), в созревании ооцитов у кроликов (Yoshimura et al., 1992) и в овуляции у кроликов и крыс (Yoshimura et al., 1993; Peterson et al., 1993; Kuji et al., 1996). В перфузируемых яичниках кроликов АнГII стимулирует овуляцию и мейотическое созревание ооцитов в отсутствие гонадотропинов (Yoshimura et al., 1993). Более того, хГч-индуцированное созревание ооцитов ингибировалось при введении в перфузируемые кроличьи яичники сараласина (антагонист АнГII). С другой стороны, приводились данные об ингибировании овуляции под действием сараласина в перфузируемых кроличьих яичниках на фоне отсутствия влияния на созревание ооцитов (Kuo et al., 1991)

В исследованиях, проведенных на грызунах, показано, что АнГII участвует в регуляции фолликулярной атрезии, вызванной апоптозом гранулезных клеток (Tanaka et al., 1995; Kotani et al., 1999; de Gooyer et al., 2004). Трансгенные крысы, которые экспрессировали ренин и ангиотензин в экстраренальных тканях, включая овариальные клетки, имели сниженное число больших антральных фолликулов и маленький размер потомства (de Gooyer et al., 2004). У свиней концентрация АнГII отрицательно коррелирует с диаметром фолликулов (Li et al., 2004). Эти данные свидетельствуют о существовании выраженных видовых различий в функциональной роли РАС в процессах фолликулярного роста и атрезии.

Производство АнГII в фолликулярных клетках, по-видимому, регулируется гонадотропинами. Концентрация АнГII в фолликулярной жидкости хГч-обработанных грызунов после билатеральной нефрэктомии были выше, (Husain et al., 1987). Ближе к овуляции, уровень АнГII также повышается в яичнике после обработки хГч у кроликов (Yoshimura et al., 1994), ЛГ у коров (Acosta et al., 2000; Shimizu et al., 2007) и чМг и хГч у женщин (Lightman et al., 1987). Аналогично, концентрация АнГI и АнГII положительно коррелировала с уровнем эстрадиола и размером фолликула у женщин, стимулированных чМг (Jarry et al., 1988). В целом, механизмы взаимосвязи между уровнем АнГII и стероидогенезом в фолликулярных клетках пока неясны (Goncalves et al., 2012).

Было показано, что введение сараласина (антагониста рецептора АнГII) блокирует овуляцию у незрелых крыс, обработанных ГСЖК и хГч (Pellicer et al., 1988). Уровень АнГII повышался под действием гонадотропина в перфузируемых кроличьих яичниках (Yoshimura et al., 1996), а сопутствующее добавление сараласина дозозависимо ингибировало хГч-индуцированную овуляцию (Yoshimura et al., 1992; Yoshimura et al., 1993).

### **Локальная яичниковая РАС у коров**

Многие исследования по проблеме созревания *in vitro* ооцитов КРС направлены на модификацию культуральных сред и условий культивирования с целью повысить продукцию полноценных эмбрионов. Тем не менее, процент формирующихся бластоцист, беременностей и успешных криоконсерваций для ооцитов, созревших и оплодотворённых *in vitro*, значительно ниже тех значений, которые получают *in vivo*, возможно из-за неполного цитоплазматического созревания ооцитов, что снижает способность к дальнейшему эмбриональному развитию. Значительная часть факторов, влияющих на процесс созревания ооцитов *in vivo*, ещё не идентифицирована.

Известно, что активность АнГII у коров связана с возобновлением мейоза (Giometti et al., 2005; Stefanello et al., 2006), стероидогенезом (Acosta et al., 1999) и фолликулярным ростом (Nielsen et al., 1994; Portela et al., 2006), однако, АнГII не оказывает влияния на ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro* при культивировании ОКК в отсутствие фолликулярных клеток. У коров экспрессия АнГII

наивысшая в больших фолликулах, что свидетельствует о важности этого фактора в процессе фолликулярного роста и созревания. В то же время, в тех экспериментах, в которых ОКК культивировались в присутствии текальных клеток, АнГII аннулировал ингибирующее действие на ядерное созревание ооцитов КРС этих клеток (Giometti et al., 2005).

Известно две основных работы, в которых исследовалось воздействие АнГII на созревание ооцитов КРС в системе *in vitro* (Giometti et al., 2005; Stefanello et al., 2006). При культивировании ОКК КРС с фолликулярными клетками и без них, в присутствии АнГII или сараласина (антагонист АнГII) было установлено, что АнГII в безбелковой среде 199HEPES, без гормонов и в отсутствие фолликулярных клеток, в концентрациях  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  М не оказывал влияния на процентную долю ооцитов, достигающих стадии разрушения зародышевого пузырька, М1 и М2 после 7 и 18 ч культивирования (Giometti et al., 2005). Точно также, сараласин в концентрациях 0,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  М не оказывал влияния на процентную долю ооцитов, достигающих стадии М2 после 18 ч культивирования. Клетки теки (М2 = 22.9%) или среда, кондиционированная с фолликулярными клетками (ЗП = 25.5%, М1 = 23.6%) ингибировали созревание ооцитов. Однако, клетки теки или среды, кондиционированной с фолликулярными клетками (ЗП = 34.6%, М1 = 52.7%), не ингибировали ядерное созревание в присутствии АнГII в минимальной концентрации  $10^{-11}$  М. Тот факт, что в этом исследовании клетки теки сохраняли жизнеспособность при культивировании в присутствии АнГII, свидетельствует о том, что АнГII блокирует ингибирующий эффект клеток теки на ядерное созревание ооцитов КРС.

Во второй из цитированных выше работ также было показано, что АнГII аннулирует ингибирующий эффект фолликулярных клеток (клеток теки) на ядерное созревание ооцитов КРС независимо от присутствия в среде гонадотропинов (Stefanello et al., 2006). Небольшим методическим недостатком этой работы является, по-видимому, наличие в среде созревания 199 HEPES 0.4% БСА, который является достаточно неопределённым фактором, что может повлиять на результаты эксперимента. Вышеназванные авторы делают вывод, что АнГII действует на созревание ооцитов КРС опосредованно через клетки теки, а напрямую его действие не проявляется независимо от времени культивирования.

В наших исследованиях, в среде без белка и гормонов, АнГII существенно ингибировал выделение ПНТ через 22 ч культивирования (Smetanina, Tatarinova, 2019), что противоречит результатам (Giometti et al., 2005). Следует отметить, что различия в результатах этих экспериментов могут быть обусловлены множеством причин, включая используемую среду культивирования, источник гормонов, породу скота, стадию эстрального цикла и др. Очень наглядно проблему воспроизводимости результатов иллюстрируют две пилотные работы по АнГII, опубликованные в 1988 и 1989 гг. (Pellicer et al., 1988; Daud et al., 1989). В работе 1988 г было показано, что сараласин (рецепторный антагонист АнГII) наполовину уменьшает количество ооцитов в фаллопиевой трубе незрелых крыс через 17-20 ч после введения хГч. Одновременное введение АнГII отменяло блокаду овуляции сараласином. Авторы второй работы (Daud et al., 1989) полностью воспроизвели экспериментальный протокол первой работы и, по контрасту с 50%-ым снижением количества яйцеклеток в эксперименте своих коллег (Pellicer et al., 1988), они не выявили существенной разницы по числу яйцеклеток в яйцеводах контрольных крыс, инъецированных физиологическим раствором, и числом яйцеклеток в яйцеводах крыс, обработанных сараласином. Поскольку авторы использовали одну и ту же линию крыс (Sprague-Dawley) и возраст крыс (25 дней на момент обработки ГСЖК), одинаковую дозу (100 мкл 1 мМ антагониста), одинаковый путь введения (внутрибрюшинный) и время введения антагониста АнГII рецепторов (1 ч. перед инъекцией хГч) и точно такие же дозы и интервалы гонадотропных обработок несоответствие результатов этих двух работ не может быть обусловлено влиянием этих факторов.

После того, как Pellicer et al. прочли Daud's комментарий, они повторили свои эксперименты и в восьми повторах из десяти не выявили статистически значимых различий между контролем и опытом, т.е. авторы не смогли воспроизвести свои собственные результаты. В дальнейшем авторы выяснили, что различия в результатах экспериментов могли быть обусловлены вариабельностью гормонов (ГСЖК и хГч), полученных из биологического материала. Применяв другой препарат хГч, они наблюдали статистически значимую разницу между числом ооцитов в яйцеводах контрольных и обработанных сараласином крыс. Возможно, что и наши данные (Сметанина, Татаринова, 2019), также не совпадают с

данными (Giometti et al., 2005) и (Stefanello et al., 2006) из-за разницы в качестве используемых составляющих культуральной системы.

В работе (Stefanello et al., 2006) также исследовали влияние АнгII на цитоплазматическое созревание ооцитов КРС и развитие до преимплантационных стадий вплоть до вылупления бластоцист. Недостатком этой серии экспериментов было наличие в среде созревания фетальной сыворотки, являющейся неопределённым фактором. В качестве контроля использовали среду без фолликулярных клеток. В опытной группе ооциты культивировали в среде только с фолликулярными клетками или с добавлением АнгII. Было показано, что АнгII полностью нивелирует ингибирующее действие фолликулярных клеток при их совместном культивировании в течение 1 и 12 ч. Если же фолликулярные клетки присутствовали в культуре в течение 24 ч., АнгII не отменял полностью их ингибирующее действие (он повышал процент бластоцист, но вылупление было хуже, чем в контроле без клеток). В дополнительной серии экспериментов, в которой авторы в среде созревания заменили фетальную сыворотку на БСА, АнгII также полностью нивелировал ингибирующее действие фолликулярных клеток при их совместном культивировании в течение 12 ч.

Влияние АнгII на созревание *in vitro* ооцитов КРС, полученных из фолликулов различного диаметра, исследовалось нами впервые (данные не опубликованы). Показано, что АнгII не оказывал влияние на ядерное созревание ооцитов из фолликулов среднего диаметра (5-7 мм), однако, достоверно ингибировал первоначальное дробление яйцеклеток в этой группе. В то же время АнгII существенно ингибировал как выделение ПНТ в ооцитах из фолликулов маленького диаметра (1-4 мм), так и развитие эмбрионов, полученных из данных ооцитов, до стадии бластоцисты. Эти данные не совпадают с результатами, полученными на свиньях (Li et al., 2004), что может свидетельствовать о межвидовых особенностях действия АнгII.

Ингибирование ядерного созревания ооцитов КРС (мейотической репликации) в среде, кондиционированной фолликулярными клетками, наблюдаемое в исследованиях (Giometti et al., 2005), также имело место и при использовании определённой культуральной системы (Richard, Sirard, 1996; Goncalves et al., 2001). Согласно ранее полученным данным, текальные клетки (но не гранулёзные), снижают процент ооцитов, достигающих стадии M2, (Richard, Sirard, 1996). Текальные клетки продуцируют ингибирующий фактор, который действует через кумулюсные клетки (Richard, Sirard, 1996; Richard, Sirard, 1998).

АнгII участвует в регуляции овуляции у кроликов (Yoshimura et al., 1993; Yoshimura et al., 1996) и в процессе ядерного созревания ооцитов у КРС (Giometti et al., 2005). Следовательно, АнгII – это вполне вероятный фактор регуляции возобновления мейоза непосредственно перед овуляцией. В поддержку этой гипотезы говорит тот факт, что концентрация АнгII (Acosta et al., 2000) и экспрессия рецепторов АнгII (Acosta et al., 1999) значительно повышаются после ЛГ пика. Хотя механизм действия АнгII на овуляцию или на ядерное созревание ооцитов у различных видов животных недостаточно изучен, этот пептид влияет на концентрацию стероидов в фолликулярной жидкости. Инфузия АнгII повышает у кроликов продукцию эстрадиола и простагландина в яичниках (Yoshimura et al., 1996). У кроликов и хомяков при культивировании фолликулов *in vitro*, АнгII повышал продукцию андрогенов в фолликулярной жидкости (Kitzman, Hutz, 1992; Feral et al., 1995). При культивировании ОКК в отсутствие фолликулярных клеток АнгII не оказывал влияния на ядерное созревание ооцитов КРС, но в присутствии текальных клеток АнгII снимал ингибирующий эффект фолликулярных клеток. Механизм, посредством которого АнгII аннулирует ингибирующий эффект фолликулярных клеток, требует дальнейшего изучения; тем не менее, представляется несомненным, что АнгII – это один из факторов, участвующий в регуляции созревания ооцитов КРС.

Имеются данные, что РАС играет важную роль в овуляции у коров. Роль АнгII в процессе овуляции у КРС исследовали посредством инъекции антагониста рецепторов АнгII в овуляторные фолликулы *in vivo* (Ferreira et al., 2007). Процент овуляции был значительно ниже (14.3%) после внутрифолликулярной инъекции сараласина в дозе 100 мкМ, по сравнению с инъекцией физиологического раствора (83.3%). Овуляция ингибировалась PD123319 и LO+PD123319 (лозартан, антагонист АРТ1 + антагонист АРТ2), но не одним лозартаном или физраствором (100% овуляций в обеих группах). Исходя из этих результатов, авторы заключили, что АнгII играет основную роль в раннем механизме овуляции КРС через подтип рецепторов АРТ2 (Ferreira et al., 2007).

Возобновление мейоза зависит от преовуляторной волны ЛГ, но ОКК КРС не имеют ЛГ рецепторов, так что действие может происходить через клетки теки и пристеночные гранулёзные клетки (Nuttinck et al., 2004). ЛГ волна стимулирует ОВРАС, ответственную за повышение уровней ренина, проренина и Анг II в фолликулярной жидкости у КРС (Nielsen et al., 1994; Acosta et al., 2000). Более того, взаимодействие между ЛГ, АнгII, эндотелином-1 и атральным натрийдиуретическим пептидом (atrial natriuretic peptide), повышает фолликулярную продукцию простагландинов и модулирует стероидогенез в преовуляторных фолликулах КРС (Acosta et al., 1999). АнгII ассоциируется с фолликулярным ростом (Ferreira et al., 2008) и овуляцией у коров (Acosta et al., 2000; Ferreira et al., 2007). Более того, АнгII стимулирует возобновление мейоза в культуральных системах в присутствии фолликулярных клеток (Giometti et al., 2005; Stefanello et al., 2006).

То, что АнгII индуцирует возобновление мейоза в ооцитах, ко-культивированных с фолликулярными клетками, установлено в экспериментах (Giometti et al., 2005; Stefanello et al., 2006), однако нет информации, касающейся необходимости АнгII для возобновления ооцитами мейоза после ЛГ волны. Была выдвинута гипотеза о том, что АнгII необходим для возобновления мейоза после ЛГ волны и что он действует через PTGS2 (синтез простагландинов, опосредованный эндопероксидсинтазой-2) (Barreta et al., 2008). Целью исследований этих авторов было уточнить, требуется ли АнгII для возобновления мейоза после ЛГ волны, индуцированной агонистом GnRH, и протестировать гипотезу о том, что простагландины E<sub>2</sub> и F<sub>2α</sub> опосредуют этот процесс. Результаты показали, что воздействие ЛГ волны, индуцированной агонистом GnRH, снижается после обработки фолликулов сараласином (100% ЗП). Однако, возобновление мейоза наблюдалось в ооцитах, извлечённых из фолликулов, обработанных физиологическим раствором (30.8% на СРЗП и 69.2% на стадии M1).

Способность фолликулярных клеток ингибировать мейоз сохранялась после обработки фолликулярных полусекций сараласином в концентрации 10 мкМ в течение 15 ч (21.4 и 13.3% M1 в сараласине и контроле, соответственно). По такой же методике фолликулярные клеточные функции были оценены с использованием АнгII в концентрации 100 пкМ. В ооцитах, культивированных с фолликулярными полусекциями, возобновление мейоза было индуцировано АнгII (80.0% M1), результаты не отличались от группы положительного контроля при культивировании в течение 15 ч. без фолликулярных клеток (86.7% M1).

Процент дробления (84.4%), эмбрионального развития (44.4%) и вылупления (40.0%) ооцитов, созревающих в среде, содержащей сараласин (10 мкМ, без фолликулярных клеток), не отличался от такового в контрольной группе (79.1, 48.8 и 38.1%, соответственно); т.е. сараласин на клеточные функции не влияет.

Еще один эксперимент был проведен с целью выяснить, индуцирует ли АнгII возобновление мейоза, опосредованное PTGS. Действие АнгII на фолликулярные клетки было ингибировано индометацином (неселективный ингибитор PTGS, 10 мкМ). Процентная доля ооцитов, культивированных в течение 15 ч. с АнгII и индометацином, достигших стадии M1, составляла 13.4%, в то время как при культивировании с АнгII и фолликулярными клетками, но без индометацина, она была существенно выше (77.5%). При наличии в среде фолликулярных клеток в отсутствие АнгII, группы ооцитов, культивированных с индометацином и без него, не различались существенно по проценту ингибирования мейотического возобновления (26.6% M1 без индометацина против 13% с индометацином). При оценке процентной доли возобновления мейоза в среде без фолликулярных полусекций (80.7% M1), не было выявлено эффектов индометацина в АнгII обработанной группе (77.5% M1) и в группе положительного контроля (78.1% M1). При наличии фолликулярных клеток в среде, процентная доля M1 ооцитов, культивированных в присутствии PGE<sub>2</sub> (78.3%) или F<sub>2α</sub> (76.1%), не отличалась от таковой у ооцитов, культивированных с АнгII (80.4%) (Barreta et al., 2008).

Первичная культура гранулёзных клеток КРС используется как модель для изучения аутокринно/паракринного контроля фолликулярного развития в бессывороточной гранулёзной клеточной системе (Fortune et al., 2004). Использование внутрифолликулярной инъекции для изменения фолликулярного окружения является надежным *in vitro* средством для изучения фолликулярного развития (Ginther et al., 2004), овуляции (Ferreira et al., 2007) и созревания ооцитов у коров (Barreta et al., 2008).

Показано, что внутрифолликулярная инъекция сараласина ингибирует фолликулярный рост у всех обработанных коров, при этом все коровы, обработанные сараласином, имели последующее развитие новой фолликулярной волны, т.е. ингибирование распространялось только на один цикл. ФСГ снимал ингибирующее действие сараласина на рост доминантных фолликулов; все коровы овулировали через 120 ч. после обработки сараласином (внутрифолликулярно) плюс внутримышечное введение ФСГ, в то время, как коровы, обработанные сараласином без ФСГ, не овулировали (Ferreira et al., 2008).

Гипотеза о том, что АнГII действует напрямую на эстрогенные гранулёзные клетки, была протестирована *in vitro* с использованием трёх доз АнГII (0, 0.1 или 10 мкМ) в присутствии или в отсутствие ФСГ (1 нг/мл). В отсутствие ФСГ, АнГII не влияет на наличие ароматазной мРНК; однако, в присутствии ФСГ АнГII повышал экспрессию ароматазы (Ferreira et al., 2009).

Гипотеза о том, что АнГII опосредует действие ЛГ, была верифицирована с использованием культуральной системы гранулёзных клеток из фолликулов с диаметром >10 мм. С использованием этой системы, гены, экспрессирующиеся под действием ЛГ волны, могут быть изучены в течение периовуляторного периода. Было показано, что АнГII устойчиво повышает наличие мРНК, кодирующей ЛГ-индуцируемые гены, кодирующие факторы овуляции, включая активаторы плазминогена и эндопероксид синтазы 2 (PTGS2). Один АнГII, даже в повышенных дозах, не даёт эффекта, в то время ЛГ при высокой дозе (400 нг/мл) может стимулировать продукцию PTGS2 – мРНК и самого белка до уровней, наблюдаемых при сниженной дозе ЛГ плюс АнГII. Эти данные свидетельствуют о том, что АнГII способствует проявлению или усиливает ЛГ действие на PTGS2 – мРНК или экспрессию белка (Goncalves et al., 2010).

Среди аутокринных и паракринных факторов регуляции развития овариальных антральных фолликулов, РАС пептиды, особенно АнГII и в меньшей степени - сам АнГ (1-7), недавно определены как ключевые факторы в регуляции фолликулярной девиации (Ferreira et al., 2011b). Фолликулярная девиация характеризуется снижением и прекращением роста второстепенных фолликулов и продолжением роста будущего доминантного фолликула (Ginther et al., 1996). У коров доминантный фолликул приобретает овуляторные способности, когда достигает диаметра около 12 мм (Sartori et al., 2001). В конце фолликулярной фазы, сложный ряд событий приводит к овуляции с освобождением компетентной яйцеклетки и инициацией лютеального развития (развитием жёлтого тела). Показано, что АнГII играет существенную роль в овуляторном процессе (Ferreira et al., 2007), и он, по-видимому, является важным медиатором ЛГ активности, которая индуцирует каскад событий, ведущих к овуляции (Portela et al., 2011).

Корова, как моноовуляторный вид, является отличной моделью для изучения роли локальных факторов в контроле фолликулярного развития, поскольку развитие антрального фолликула может быть проверено изо дня в день, могут быть проконтролированы время фолликулярной девиации и доминирования, ЛГ волна и овуляция, и к тому же фолликулярное окружение может быть легко модифицировано посредством ультразвуковой инъекции (Kot et al., 1995, Ginther et al., 2004; Ferreira et al., 2007). В качестве же *in vitro* моделей используют бессывороточные культуральные системы гранулёзных клеток без спонтанной лютеинизации (Gutierrez et al., 1997). Внутрифолликулярная инъекция сараласина (конкурентный антагонист АнГII) ингибирует у коров рост доминантного фолликула, снижая концентрацию эстрадиола в фолликулярной жидкости (Ferreira et al., 2011a). При этом фолликулярная регрессия, индуцированная сараласином, снималась путём систематического введения ФСГ, и доминантный фолликул достигал овуляции.

Гипотеза о том, что АнГII – это медиатор ЛГ активности в каскаде событий, ведущих к овуляции, была подтверждена ранее при использовании культуры гранулёзных клеток, полученных из фолликулов диаметром >10 мм (Portela et al., 2011).

Бессывороточная культуральная система гранулёзных клеток без спонтанной лютеинизации и культуральная система больших фолликулов были использованы для дальнейших исследований влияния РАС на специфические регуляторные факторы фолликулярных клеток (Goncalves et al., 2012). Основываясь на этих моделях, авторы нашли, что: 1) концентрация АнГII повышается в фолликулярной жидкости доминантного фолликула в течение девиации и после неё; 2) фолликулярное развитие было полностью заблокировано посредством внутрифолликулярной инъекции конкурентного антагониста АнГII или селективного антагониста PTGS2; 3) внутрифолликулярная инъекция АнГII или антагониста

APT2 предотвращает ожидаемую регрессию второго наибольшего фолликула при девиации; 4) антагонист АнгII снижает экспрессию мРНК генов (LHR, CYP19A1, HSD3 $\beta$ ), участвующих в пролиферации гранулёзных клеток и их дифференцировке в процессе фолликулярной девиации; 5) внутрифолликулярная инъекция конкурентного антагониста АнгII снижает процент овуляции у коров, индуцированных агонистом GNRH; и 6) АнгII действует через APT2, приводя к увеличению мРНК генов, включённых в каскад регуляторных факторов овуляции, таких как AREG, EREG, и PTGS2 (Goncalves et al., 2012).

Основываясь на этих данных, следует заключить, что PAC играет фундаментальную роль в развитии, девиации, атрезии и овуляции фолликулов, при этом ключевые процессы характеризуются видоспецифическими особенностями.

### Рецепторы PAC

Известно, что АнгII регулирует клеточные функции через множество рецепторов. Идентифицировано четыре подтипа АнгII рецепторов – APT1, APT2, APT3 и APT4 (Miyazaki et al., 1996). И APT1 и APT2 рецепторы АнгII экспрессировались в фолликулах и ооцитах в незрелых свиных яичниках (Li et al., 2004); эти результаты согласуются с данными, полученными на других видах животных (Yoshimura, 1997).

В первоначальных исследованиях по изучению локализации АнгII рецепторов в фолликулах коров было обнаружено, что он связывается преимущественно или эксклюзивно с клетками теки (Schauser et al., 2001; Giometti et al., 2005). Однако, при использовании ПЦР в реальном времени удалось определить мРНК APT1 и APT2 как в клетках теки, так и в гранулёзных клетках коров, при этом в гранулёзных клетках неатретических фолликулов коров количество APT2 было больше, чем в гранулёзе атретических. Важно отметить, что синтез мРНК APT2 в гранулёзе активировался ФСГ (Portela et al., 2008). Методом иммуногистохимии эти же авторы обнаружили АнгII в клетках и теки, и гранулезе, что согласовывалось с данными ПЦР (Portela et al., 2008). У свиней АнгII был найден в *zona pellucidae* и в гранулёзных клетках. Распределение APT1 соответствовало локализации самого АнгII, а APT2, в основном, находился в строме и текальных клетках фолликул (Li et al., 2004).

Дозозависимые различия в реакции на АнгII могут быть обусловлены наличием множественной популяции АнгII рецепторов. APT1 опосредует многие известные функции АнгII на уровне организма, включая сокращение гладкой мускулатуры, стимуляцию освобождения альдостерона из коры надпочечников и ингибирование ренина, освобождающегося из коркового слоя почек, в то время как APT2 включается в овариальную фолликулярную атрезию в течение эстрального цикла. Возможно, что APT1 и APT2 действуют через различные пути; APT1 непосредственно стимулирует активатор транскрипции, а сигнальные пути APT2 недостаточно хорошо изучены, хотя его ДНК была клонирована (Miyazaki et al., 1996). Показано, что добавление через интервалы АнгII в концентрации 10 или 100 мкг/мл в перфузат индуцирует овуляцию в *in vitro* перфузированных кроличьих яичниках в отсутствие гонадотропинов, в то время как овуляция не происходила в противоположных контрольных яичниках (Yoshimura et al., 1992). Более того, АнгII существенно стимулирует через APT2 мейотическое созревание овулировавших ооцитов и фолликулярных ооцитов и стимулирует продукцию эстрадиола и простагландина в перфузируемых кроличьих яичниках (Yoshimura et al., 1996; Yoshimura et al., 1992). Таким образом, постулируется, что АнгII может быть частью нового внутрияичникового паракринного или аутокринного контрольного механизма в процессе овуляции (Kuji et al., 1996).

Так, показано, что экспрессия APT1 была ассоциирована с уровнем АнгII в развивающихся фолликулах и ооцитах, подтверждая предположение о том, что АнгII стимулирует созревание ооцитов через APT1 в яичниках свиньи. Изменения в экспрессии АнгII в ОКК и концентрации АнгII в среде в течение IVM свидетельствуют о том, что кумулюсные клетки могут секретировать АнгII, однако, он постепенно истощался в среде созревания в течение IVM, что, возможно, происходило из-за нестабильности и метаболизма АнгII в используемых условиях (Li et al., 2004).

Одной из причин межвидовых различий в физиологической роли PAC может быть различная клеточная локализация АнгII рецепторов в овариальных фолликулах.

В первоначальных исследованиях, изучавших локализацию АнгII рецепторов в фолликулах КРС, сообщалось, что меченный радиоактивным йодом АнгII связывается преимущественно или

эсклюзивно с клетками теки (Brunswig-Spickenheier, Mukhopadhyay, 1992; Schauser et al., 2001). Однако, этот лигандный метод исследования может быть недостаточно чувствителен для детектирования АнгII, связанного с гранулёзными клетками. С использованием ПЦР в реальном времени, удалось детектировать мРНК АРТ1 и АРТ2 в клетках теки и гранулёзы. Уровни экспрессии АРТ2 были выше в гранулёзе здоровых фолликулов КРС, чем в атретических, причем, присутствие мРНК АРТ2 в гранулёзе активируется ФСГ (Portela et al., 2008). Эти же авторы иммуногистохимически уточнили локализацию и обнаружили соответствующий белок в клетках теки и гранулёзы, что согласуется с данными ПЦР (Portela et al., 2008). У свиней АнгII был иммуногистохимически найден в зоне-пеллюцида и в гранулёзных клетках. Паттерны распределения АРТ1 были схожи с таковыми самого АнгII, однако АРТ2, главным образом, был найден в строме и клетках теки фолликулов (Li et al., 2004).

Показано ингибирование овуляции в кроличьих яичниках, перфузированных *in vitro*, с использованием специфического ингибитора АРТ2 (PD123319) но этот эффект не проявлялся при использовании CV-11974, специфического ингибитора АРТ1 (Yoshimura et al., 1996). PD123319 – антагонист АРТ2, специфически ингибирует связывание АнгII при концентрации 100 мкМ (Yoshimura et al., 1996).

Недавно продемонстрировано, что экспрессия мРНК АРТ2 в гранулёзных клетках коррелирует с фолликулярным здоровьем и содержанием эстрадиола и регулируется ФСГ и IGF-1 (Portela et al., 2006.).

Рецепторы АнгII найдены в клетках теки всех анализируемых видов (Brunswig-Spickenheier et al., 1992). В фолликулах коров оба типа рецепторов АнгII были найдены в клетках теки, но не в гранулёзных клетках (Acosta et al., 1999). Это объясняет, почему эффект АнгII сказывается только тогда, когда клетки теки включены в культуральную систему созревания ооцитов. Ингибирование ядерного созревания ооцитов КРС (мейотической репликации) в среде, кондиционированной фолликулярными клетками, также имело место при использовании “определённой” системы IVС (Richard, Sirard, 1996; Goncalves et al., 2001).

Рецепторы АРТ1 были найдены и в гранулёзных, и в клетках теки преовуляторных фолликулов кроликов (Feral et al., 1996). В крысиных яичниках, АнгII рецепторы были найдены, главным образом, в гранулёзных клетках атретических фолликулов и были идентифицированы как АРТ2, в то время как рецепторы в тканях, оставшихся после удаления гранулёзы, были классифицированы как АРТ1 (Daud et al., 1988; Pucell et al., 1991). По контрасту, в яичниках КРС рецепторы АнгII (АРТ1 и АРТ2) были найдены в клетках теки, но не в гранулёзных клетках (Brunswig-Spickenheier et al., 1992; Acosta et al., 1999). Экспрессия рецепторов АнгII наивысшая в больших фолликулах (Schauser et al., 2001).

Показано наличие рецепторов АнгII в ооцитах *Xenopus laevis* и то, что эти рецепторы включены в мобилизацию внутриклеточного кальция (Sakuta et al., 1991). Повышение внутриклеточного кальция стимулируется посредством АнгII через сигнал, передаваемый при наличии щелевых контактов между кумулюсом и ооцитом, что является необходимым условием для созревания ооцитов *Xenopus laevis* (Sandberg et al., 1990). Возможно АнгII не имеет рецепторов в ооцитах КРС или механизм действия АнгII на ооциты млекопитающих отличается от такового, предполагаемого у амфибий. При перфузии яичников раствором с АнгII (посредством канюлирования овариальной артерии в отсутствие гонадотропина) было показано, что АнгII действует на кроличьи ооциты посредством стимулирования возобновления мейоза и овуляции (Yoshimura et al., 1996). Антагонист АнгII, действующий специфически через АРТ2, блокировал созревание ооцитов в перфузируемых яичниках, однако, антагонист АнгII, специфический к АРТ1, не ингибировал созревание ядра ооцитов кроликов (Yoshimura et al., 1996). Действие АнгII на ядерное созревание ооцитов у кроликов было неодинаковым у разных авторов. Одни исследователи не наблюдали каких-либо воздействий АнгII на ядерное созревание в перфузируемых кроличьих яичниках (Kuo et al., 1991), в других работах показано специфическое действие этого пептида для стимулирования возобновления мейоза кроличьих ооцитов (Giometti et al., 2005). Установлено, что АнгII участвует в фолликулярной атрезии через АРТ2 и стимулирует дефосфорилирование Bcl-2 (фактор клеточного выживания), индуцируя апоптоз в фолликулярных клетках (Horiuchi et al., 1997). Текальные клетки, полученные методом рассечения, интактные и с небольшим количеством мёртвых клеток, не показывали признаков повреждений при их

культивировании в присутствии АнГII (Giometti et al., 2005). Следовательно, АнГII ингибирует действие клеток теки на ядерное созревание ооцитов у коров не через гибель клеток.

В работе (Husain et al., 1987) не найдено ожидаемого автордиографического распределения рецепторов АнГII в каждом из развивающихся крысиных фолликулов, свидетельствуя, что не все преовуляторные фолликулы обязательно реагируют на экзогенный и эндогенный АнГII. Эти различия в данных о влиянии АнГII на гонадотропин-индуцированную овуляцию свидетельствуют о недостаточности наших представлений о физиологическом влиянии АнГII на овуляцию.

Исследование с применением ПЦР в реальном времени показало, что мРНК АРТ2 присутствует у коров и в гранулёзных, и в текальных клетках фолликулов коров (Portela et al., 2008). Наличие самого АРТ2 (белка) было подтверждено методом иммунофлуоресценции. Присутствие мРНК АРТ2 в гранулёзных клетках было выше в здоровых фолликулах, чем атретических, в то время как в текальных клетках подобных изменений не наблюдалось. Добавление АнГII или АРТ2-специфического агониста в культуру с гранулёзными клетками не оказывало влияния на секрецию эстрадиола или пролиферацию клеток, но ингибировало наличие мРНК, кодирующей ингибитор  $E_2$  сериновой протеазы – белка, участвующего в процессах тканевого ремоделирования. Поскольку секреция эстрадиола – основной маркер неатретических гранулёзных клеток, эти данные свидетельствуют о том, что АнГII не ассоциируется с фолликулярной атрезией у коров, но может играть другие специфические роли в процессе фолликулярного роста (Portela et al., 2008).

Выявлены значительные межвидовые различия в функции и локализации АнГII рецепторов в яичнике. У кроликов, рецепторы, главным образом, АРТ2, экспрессируются в гранулёзных клетках преовуляторных фолликулов, и связаны с ролью АнГII в овуляции (Kuji et al., 1996). У крыс, АРТ2 также локализуется в гранулёзных клетках, но только в атретических фолликулах (de Gooyer et al., 2004). В поддержку этих данных показано, что АнГII ингибирует секрецию эстрадиола в культивируемых гранулёзных клетках крыс и кроликов (Feral et al., 1995; Kotani et al., 1999), и связывание АнГII с АРТ2 повышается в ходе атрезии гранулёзных клеток крыс *in vitro* (Tanaka et al., 1995). Однако, у коров клетки теки, но не гранулёзы, содержат АнГII связывающие сайты, преимущественно АРТ2 (Acosta et al., 1999; Brunswig-Spickenheier et al., 1992; Schauser et al., 2001).

Данные об отсутствии АРТ2 в гранулёзных клетках КРС особенно интересны, поскольку большинство признаков ранней атрезии включает в себя изменения прежде всего в гранулёзных, а не в текальных клетках (Bao, Garverick, 1998; Irving-Rodgers et al., 2001). Однако, в работе (Sahmi et al., 2004) авторы идентифицировали потенциальное действие АнГII в гранулёзных клетках с использованием нелютеинизированной культуральной модели.

В течение нескольких лет исследовательская группа в Бразилии (Goncalves et al., 2010) фокусировалась на изучении вклада РАС в развитие антрального фолликула и овуляции, с использованием КРС как модели. Исследователи продемонстрировали, что АРТ1 и АРТ2 рецепторы экспрессировались как в клетках гранулёзы, так и в клетках теки. Количество мРНК АРТ2 в гранулёзных клетках было выше в здоровых фолликулах, чем в атретических, в то время как мРНК АРТ1 в текальных и гранулёзных клетках присутствовала как в здоровых и так и в атретических фолликулах. Гранулёзные клетки, культивированные с гормонами, стимулирующими секрецию эстрадиола, увеличивали содержание мРНК АРТ2 и уровень АРТ2 белка, в то время как фактор роста фибробластов (FGF-7 и 10) ингибировал секрецию эстрадиола и секрецию АРТ2 протеина (Goncalves et al., 2010). Этой группой показано, что антагонист АнГII блокирует овуляцию у коров, когда он внутрифолликулярно инъецируется через 0 или 6 ч после применения агониста GnRH. Овуляция также ингибируется посредством антагониста АРТ2 рецепторов, но не посредством антагониста АРТ1 рецепторов АнГII. Более того, АнГII стимулирует увеличение мРНК множества генов, вовлекаемых в процесс овуляции. Кроме того, АнГII активирует гены, участвующие в экстраклеточном ремоделировании и разрыве фолликулярной стенки. Данные исследований *in vitro* и *in vivo* демонстрируют, что АнГII у коров играет ключевую роль в развитии антрального фолликула и раннего механизма овуляции через АРТ2 подтип рецепторов АнГII (Goncalves et al., 2010).

АнГII играет существенную роль в ранних стадиях овуляторного каскада у коров, действуя как ключевой фактор в овуляторном процессе. Сигналы АнГII включаются в регуляторные пути фолликулярного роста, доминирование и овуляцию через АРТ2 рецепторы (Goncalves et al., 2010).

Чтобы исследовать подтипы рецепторов АнгII, участвующих в процессе ЛГ-индуцированной овуляции, лозартан (ЛО; антагонист АРТ<sub>1</sub> рецепторов АнгII) и PD123319 (PD; антагонист АРТ<sub>2</sub> рецепторов АнгII) были внутрифолликулярно инъецированы и затем коровы были обработаны GnRH агонистом. Процент овуляции был значительно снижен после введения PD123319, но не ЛО или физраствора (Ferreira et al., 2007).

В период развития антральных фолликулов имеются существенные межвидовые различия в функциях рецепторов АнгII. У крыс AGTR<sub>2</sub> включался в фолликулярную атрезию через апоптоз (Tanaka et al., 1995; Kotani et al., 1999). У крыс АРТ<sub>1</sub> рецептор локализован в здоровых фолликулах, в то время как экспрессия мРНК АРТ<sub>2</sub> рецептора идентифицирована в атретических фолликулах малого и среднего размера (de Gooyer et al., 2004). Более того, экспрессия АРТ<sub>2</sub> протеина ингибировалась ФСГ, индуцированная ФСГ продукция эстрадиола ингибировалась АнгII, и этот эффект устранялся под действием антагониста АнгII рецепторов – PD123319 (Kotani et al., 1999).

Экспрессия АРТ<sub>2</sub> рецепторов у моноовуляторных видов была впервые идентифицирована в клетках теки из доминантного фолликула КРС (Schauser et al., 2001). Сильная экспрессия АРТ<sub>2</sub> наблюдалось у коров в период овуляции, главным образом, в клетках теки (Schauser et al., 2001). Эти данные были подтверждены обнаружением мРНК, кодирующей АРТ<sub>1</sub> и АРТ<sub>2</sub> рецепторы и в теке, и в гранулёзных клетках коров (Berisha et al., 2002). Экспрессия мРНК АРТ<sub>2</sub> в гранулёзных клетках была значительно выше в здоровых фолликулах, чем в атретических (Portela et al., 2008). Было также обнаружено, что ФСГ повышает экспрессию АРТ<sub>2</sub> - как мРНК, так и самого протеина (Portela et al., 2008). Эти данные свидетельствуют о том, что грызуны и КРС имеют разные сигнальные пути в фолликулярном развитии.

Антагонисты рецепторов ингибируют овуляцию и используются для изучения роли РАС в овуляторном процессе у крыс, кроликов и коров (Pellicer et al., 1988; Kuji et al., 1996; Ferreira et al., 2007). Внутривентрикулярная инъекция сараласина блокирует гонадотропин-индуцированную овуляцию у незрелых крыс (Pellicer et al., 1988). С другой стороны, селективный непептидный антагонист АРТ<sub>2</sub> рецепторов (PD123319) не оказывал влияния на процент овуляций в *in vitro* перфузируемых яичниках крыс (Mikuni et al., 1998). Более того, введение PD123319 снижает, но не полностью блокирует овуляцию у крыс (Mitsube et al., 2003). Рассматриваемые вместе, эти результаты свидетельствуют, что АнгII имеет существенное значение для овуляции у крыс, но этот эффект не обязательно регулируется посредством АРТ<sub>2</sub>.

На яичниках кроликов, перфузируемых *in vitro*, было показано, что сигналы АнгII проходят через АРТ<sub>2</sub> рецепторы (Kuji et al., 1996). Овуляция у коров ингибировалась, если антагонисты АРТ<sub>2</sub> рецепторов (сараласин или PD123319) внутрифолликулярно инъецировались одновременно с инъекцией GnRH (Ferreira et al., 2007). В культивируемых гранулёзных клетках из большого доминантного фолликула КРС ЛГ-индуцированная экспрессия мРНК PTGS2 повышалась под действием АнгII и ингибировалась антагонистом АРТ<sub>2</sub> рецепторов PD123319 (Portela et al., 2011). Как у КРС, так и у кроликов блокада AGTR<sub>1</sub> не влияет на гонадотропин-индуцированную овуляцию (Kuji et al., 1996; Ferreira et al., 2007). В целом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что у кроликов и коров АнгII играет важную роль в раннем механизме овуляции, опосредованную рецепторами АРТ<sub>2</sub>.

### Заключение

Ангиотензин II (АнгII) и его рецепторы, как составляющие ренин-ангиотензиновой системы (РАС), в яичниках млекопитающих участвуют в регуляции синтеза и секреции простагландинов и эстрогенов, роста фолликулов, овуляции и атрезии. Важно идентифицировать факторы, ответственные за созревание ооцитов *in vivo*, чтобы можно было включать их в *in vitro* системы.

Показано, что уровень АнгII в фолликулярной жидкости человека коррелирует с относительной долей созревших ооцитов, собранных после стимуляции яичников для оплодотворения *in vitro*. У свиней АнгII стимулировал созревание ооцитов *in vitro* из малых и средних фолликулов; он не оказывал влияния на ядерное созревание ооцитов КРС при культивировании *in vitro* ооцит-кумулясных комплексов в отсутствие фолликулярных клеток, но в присутствии текальных клеток аннулировал ингибирующее действие этих клеток. В исследованиях автора показано, что АнгII в концентрациях 10

<sup>11</sup>,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  М не воздействовал на выделение первого направительного тельца в безбелковой среде с гормональными добавками, однако при культивировании в среде созревания без гормонов АнгII в концентрации  $10^{-7}$  М существенно ингибировал достижение яйцеклетками стадии метафазы 2. Это даёт основание предположить, что гормоны нивелируют ингибирующее действие АнгII на созревание ядра яйцеклеток в системе без клеток кумулюса, гранулёзы, теки или яйцевода. В то же время другими авторами в опытах, проведенных на яйцеклетках свиней и овец, было установлено, что АнгII улучшает созревание яйцеклеток и в бессывороточной среде, и в среде с сывороткой, дополненной гормонами. Одна из причин межвидовых различий по физиологической роли PAC может состоять в различной клеточной локализации рецепторов АнгII в овариальных фолликулах.

В целом, физиологическая функция АнгII в яичнике недостаточно исследована, и большие межвидовые различия делают понимание роли PAC ещё более сложной. С другой стороны, разработка культуральных сред для полноценного созревания *in vitro* ооцитов млекопитающих может открыть широкие возможности для экспериментального изучения и мониторинга влияния и внешних и внутренних факторов на воспроизводительную функцию продуктивных животных.

#### REFERENCES

1. Acosta T.J., Bersha B., Ozawa T. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles *in vitro*: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol. Reprod.* 1999, 61: 1419-1425.
2. Acosta T.J., Ozawa T., Kobayashi S., Hayashi K., Ohtani M., Kraetzl W.D. et al. Perioovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F<sub>2α</sub>, and steroid hormones from bovine mature follicles *in vivo*. *Biol. Reprod.* 2000, 63: 1253-1261.
3. Aguilera G., Millan M.A., Harwood J.P. Angiotensin II receptor in the gonads. *Am. J. Hypertens.* 1989, 2: 395-402.
4. Bao B., Garverick H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 1998, 76: 1903-1921.
5. Barreta M.H., Oliveira J.F.C., Ferreira R., Antoniazzi A.Q., Gasperin B.G., Sandri L.R., Goncalves B.D. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub>. *Reproduction.* 2008, 136: 733-740.
6. Bavister B.D. How animal embryo research led to the first documented human IVF. *RBM Online.* 2002, 4: 24-29.
7. Beker van Woudenberg A.B., Gröllers-Mulderij M., Snel C., Jeurissen N., Stlerum R., Wolterbeek A. The bovine oocyte *in vitro* maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. *Reprod. Toxicol.* 2012, 54: 251-260.
8. Berisha B., Schams D., Miyamoto A. The mRNA expression of angiotensin and endothelin system members in bovine ovarian follicles during final follicular growth. *J. Reprod. Devel.* 2002, 48: 573-582.
9. Bokal E.V., Vrtovec H.M., Klun I.V., Verdenic I. Prolonged hCG action affects angiogenic substances and improves follicular maturation, oocyte quality and fertilization competence in patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.* 2005, 20: 1562-1568.
10. Bottari S.P., de Gasparo M., Steckelings U.M., Levens N.P. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front. Neuroend.* 1993, 14: 123-171.
11. Brunswig-Spickenheier B., Mukhopadhyay A.K. Characterization of angiotensin II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. *Endocrinology.* 1992, 131: 1445-1452.
12. Buccione R., Schroeder A., Eppig J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 1990, 43: 543-547.
13. Cheng Y., Wang H., Xia G.L. Immunohistochemical localization of AngII in the mouse ovary. *J. Agric. Biotechnol.* 2000, 3: 267-270.
14. Cavallo I.K., Dela Cruz C., Oliveira M.L., Del Puerto H.L., Dias J.A., Lobach V.N., Casalechi M., Camargos M.G., Reis A.M., Santos R.A., Reis F.M. Angiotensin-(1-7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. *Hum. Reprod.* 2017, 32(6): 1318-1324.
15. Chiu A.T., Duncia J.V., McCall D.E., Wong P.C., Price W.A.Jr., Thoolen M.J.M.C., Carini D.J., Johnson A.L., Timmermans P.B.M.W.M. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. III. Structure-function studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989, 250: 867-874.
16. Clauser E., Gaillard I., Wei L., Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. *Am. J. Hypertens.* 1989, 2: 403-410.
17. Cornwallis C.M., Skinner S.L., Nayudu P.L. et al. Follicular fluid renin concentration and IVF outcome. *Hum Reprod.* 1990, 5: 413-417.
18. Daud A., Bumpus F.M., Husain A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology.* 1988, 122:2727-34.

19. Daud A.I., Bumpus F.M., Husain A. Angiotensin II – does it have a direct obligate role in ovulation? *Science*. 1989, 245: 870-871.
20. Derkx F.H.M., Albereda A.T., Zeilmaker F.H., Schalekamp M.A.D.H. High concentration of immunoreactive renin, prorenin and enzymatically-active renin in human ovarian follicular fluid. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1987, 94: 4-11.
21. Do Y.S., Shinagava T., Tam H., Inagami T., Hsueh W.A. Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. *J. Biol. Chem.* 1987, 262: 1037-1043.
22. Feral C., Le Gall S., Leymarie P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: its possible involvement in atresia. *Eur. J. Endocrinol.* 1995, 133: 747-753.
23. Feral C., Benhaim A., Leymarie P. Angiotensin II receptor type 1 on granulosa and thecal cells of rabbit preovulatory follicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 1996, 1284: 221-226.
24. Ferreira R., Oliveira J.F., Fernandes R., Moraes J.F., Goncalves P.B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007, 134: 713-719.
25. Ferreira R., Gasperin B., Bohrer R., Rovani M., Barreta M.H., Santos J., Price C.A., Goncalves P.B. The role of angiotensin II in bovine follicular growth. *Biol. Reprod.* 2008, 78: 222 (Abstract).
26. Ferreira R., Gasperin B.G., Rovani M.T., Santos J.T., Antoniazzi A.Q., Zamberlam G.O. Effect of angiotensin II on bovine follicular growth and mRNA encoding steroidogenic enzymes, gonadotrophin receptors, and tissue development genes. *Biol. Reprod.* 2009, 81: 559 (Abstract).
27. Ferreira R., Gasperin B., Rovani M., Santos J., Barreta M., Bohrer R., Price C., Goncalves P.B.D. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. *Endocrinology*. 2011a, 152: 4957-4965.
28. Ferreira R., Gasperin B., Santos J., Rovani M., Santos R.A., Gutierrez K., Oliveira J.F., Reis A.M., Goncalves P.B. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011b, 12: 475-482.
29. Fortune J.E., Rivera G.M., Yang M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 82/83: 109-126.
30. Gallinat S., Busche S., Raizada M.K., Sumners C. The angiotensin II type2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 2000, 278: 357-374.
31. De Gasparo M., Husain A., Alexander W., Gatt K.J., Chiu A.T., Drew M., Goodfriend T., Harding J.W., Inagami T., Timmermans PBMWM. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension*. 1995, 25: 924-927.
32. Ginter O.J., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Gibbons J.R., Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 1996, 55: 1187-1194.
33. Ginther O.J., Bergfelt D.R., Beg M.A., Meira C., Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol. Reprod.* 2004, 70: 99-105.
34. Giometti I.C., Bertagnolli A. C., Ornes R.C., Santos da Costa L.F., Carambula S.F., Reis A.M., de Oliveira J.F.C., Emanuelli I.P., Goncalves P. B. D. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*. 2005, 63: 1014-1025.
35. Glorioso N., Atlas S.A., Laragh J.H., Jewelewicz R., Sealey J.E. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. *Science*. 1986, 233: 1422-1424.
36. Goncalves P.B., Emanuelle I.P., Costa M.P., Emanuelle M.P., Schoenau J.P., Neves J.P. et al. The inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro oocyte nuclear maturation depends on the follicular size. *Theriogenology*. 2001, 55: 473 (Abstract).
37. Goncalves P.B.D., Portela V.M., Ferreira R., Gasperin B.G. Role of angiotensin II on follicle development and ovulation. *Anim. Reprod.* 2010, 7: 140-145.
38. Goncalves P.B.D., Ferreira R., Gasperin B.G., Oliveira J.F. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. *Reproduction*. 2012, 143: 11-20.
39. De Gooyer T.E., Skinner S.L., Wlodec M.E., Kelly D.J., Wilkinson-Berka J.L. Angiotensin II influence ovarian follicle development in the transgenic (mRen-2)27 and Sprague-Dawley rat. *J. Endocrinol.* 2004, 180: 311-324.
40. Gutierrez C.G., Campbell B.K., Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol. Reprod.* 1997, 56: 608-616.
41. Herr D. Bekes I., Wulff C. Local renin-angiotensin system in the reproductive system. *Front. Endocrinol.* 2013, 4: 1-7.
42. Horiuchi M., Hayashida W., Kambe T., Yamada T., Dzau V.J. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 19022-19026.
43. Husain A., Bumpus F.M., DeSilva P., Speth R.C. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in the rat ovaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987, 84: 2489-2493.
44. Irving-Rodgers H.F., van Wezel I.L., Mussard M.L., Kinder J.E., Rodgers R.J. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction*. 2001, 122: 761-775.

45. Itskovitz J., Rubattu S., Rosenwaks Z. et al. Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome of in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991, 72: 165-171.
46. Jarry H., Meyer B., Holzapfel G., Hinney B., Kuhn W., Wuttke W. Angiotensin II/III and substance P in human follicular fluid obtained during IVF: relation of the peptide content with follicular size. *Acta Endocrin.* 1988, 119: 277-282.
47. Kim Y.J., Kim Y.Y., Kang B.C., Kim M.S., Ko I.K., Liu H.C., Rosenwaks Z., Ku S.Y. Induction of multiple ovulation via modulation of angiotensin II receptors in vitro ovarian follicle culture models. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017, 11(11): 3100-3110.
48. Kitzman P.H., Hutz R.J. In vitro effects of angiotensin II on steroid production by hamster ovarian follicles and ultrastructure of the theca interna. *Cell Tissue Res.* 1992, 268: 191-196.
49. Kot K., Gibbons J.R., Ginther O.J. A technique for intrafollicular injection in cattle: effects of hCG. *Theriogenology.* 1995, 44: 41-50.
50. Kotani E., Sugimoto M., Kamata H., Fujii N., Saitoh M., Usuki S., Kubo T., Song K., Miyazaki M., Murakami K. et al. Biological roles of angiotensin II via its type 2 receptor during rat follicle atresia. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 1999, 276: 25-33.
51. Krisher R.L. Utility of animals models for human embryo culture development: domestic species. In: *Embryo Culture: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Gary D. Smith et al., eds.). 2012, 12: 27-37.
52. Kuji N., Sueoka K., Miyazaki T., Tanaka M., Oda T., Kobayashi T., Yoshimura Y. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. *Biol. Reprod.* 1996, 55: 984-991.
53. Kuo T.C., Endo K., Dharmarajan A.M., Miyazaki T., Atlas S.J., Wallach E.E. Direct effect of angiotensin II on in vitro perfused rabbit ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1991, 92: 469-474.
54. Lazzari G., Tessaro I., Crotti G., Galli C., Hoffmann S., Bremer S., Pellizzer C. Development of an *in vitro* test battery for assessing chemical effects of bovine germ cells under the ReProtect umbrella. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 233: 360-370.
55. Li Y.H., Jiao L.H., Liu R.H., Chen X.L., Wang H., Wang W.H. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. *Theriogenology.* 2004, 61: 447-459.
56. Li Y.H., Liu R.H., Jiao L.H., Wang H., Wang W.H. Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol on cytoplasmic maturation of porcine oocytes after in vitro fertilization. *Zygote*, 2002, 10: 349-354.
57. Lightman A., Tartatzis B.C., Rzasz P.J., Culler M.D., Caride V.J., Negro-Vilar A.F. et al. The ovarian rennin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1987, 156: 808-816.
58. Lightman A., Jones C.L., Maclusky N.J., Palumbo A., DeCherney A.H., Naftolin F. Immunocytochemical localization of angiotensin II immunoreactivity and demonstration of angiotensin II binding in the rat ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1988, 159: 526-530.
59. Luciano A.M., Franciosi F., Lodde V., Corbani D., Lazzari G., Crotti G., Galli C., Pellizzer C., Bremer S., Welmer M., Modena S.C. Transferability and interlaboratory variability assessment of the *in vitro* bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProtect. *Reprod. Toxicol.* 2010, 30: 81-88.
60. Menezo YJR., Herubel F. Mouse and bovine models for human IVF. *RBM Online.* 2002, 4: 170-175.
61. Mikuni M., Brannstrom M., Hellberg P., Peterson C.A., Pall M., Edvin S.S., Peterson C.M. Saralasin-induced inhibition of ovulation in the in vitro perfused rat ovary is not replicated by the angiotensin II type-2 receptor antagonist PD123319. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998, 179: 35-40.
62. Mitsube K., Mikuni M., Matousek M., Zackrisson U., Brannstrom M. Role of the angiotensin II system in regulation of ovulation and blood flow in the rat ovary. *Reproduction.* 2003, 125: 425-435.
63. Miyazaki H., Ohnishi J., Shibata T. Angiotensin II receptor subtypes: their distribution, signaling pathways, and physiological functions. *Zool. Sci.* 1996, 13: 641-646.
64. Mukhopadhyay A.K., Holstein K., Szkudlinski M., Brunswig-Spickenheier B., Leidenberger F.A. The relationship between prorenin levels in follicular fluid and follicular atresia in bovine ovaries. *Endocrinology.* 1991, 129: 2367-2375.
65. Naderi M.M., Borjian Boroujeni S., Sarvari A., Heidari B., Akhondi M.M., Zarnani A.H., Shirazi A. The effect of media supplementation with angiotensin on developmental competence of ovine embryos derived from vitrified-warmed oocytes. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2016, 8: 139-144.
66. Naderi M.M., Borjian Boroujeni S., Sarvari A., Heidari B., Akhondi M.M., Zarnani A.H., Shirazi A. The Effect of Angiotensin on the Quality of In Vitro Produced (IVP) Sheep Embryos and Expression of Na(+)/K(+)/ATPase. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2016, 8(1): 9-15.
67. Nielsen A.H., Hagenmann A., Svenstrup B., Nielsen J., Poulsen K. Angiotensin II receptor density in bovine ovarian follicles relates to tissue renin and follicular size. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1994, 21: 463-469.
68. Nuttinck F., Charpigny G., Mermillod P., Loosfelt H., Meduri G., Freret S., Grimard B., Heyman Y. Expression of components of the insulin-like growth system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Dom. Anim. Endocrin.* 2004, 27: 179-195.

69. Ohkudo H., Nakayama K., Tanaka T., Nakamishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 1986, 261: 319-323.
70. Palumbo A., Jones C., Lightman A., Carcangiu M.L., DeCherney A.H., Naftolin F. Immunohistochemical localization of renin and angiotensin II in human ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989, 160: 8-14.
71. Palumbo A., Ávila J., Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system (ovras): a major factor in ovarian function and disease. *Reprod. Sci.* 2016, 23(12): 1644-1655.
72. Pellicer A., Palumbo A., DeCherney A.H., Naftolin F. Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science.* 1988, 240: 1660-1661.
73. Portela V.V., Goncalves P.B.D., Buratini J.J., Price C.A. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease-nexin-1 expression and secretion in bovine follicles. *Proc. Soc. Study of Reproduction, 39<sup>th</sup> Annual Meeting.* Omaha, NF, USA, 2006, P. 452.
74. Portela V.M., Goncalves P.B.D., Veiga A.M., Nicola E., Buratini J., Price C.A. Regulation of angiotensin type2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*, 2008, 149: 5004-5011.
75. Portela V.M., Zamberlam G., Goncalves P.B.D., de Oliveira J.F.C., Price C.A. Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 2011, 85: 1167-1174.
76. Pucell G.A., Bumpus F.M., Husain A. Rat ovarian angiotensin II receptors. *J. Biol. Chem.* 1987, 262: 7076-7080.
77. Pucell A.G., Hodges J.C., Sen I., Bumpus F.M., Husain A. Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology.* 1991, 128: 1947-1959.
78. Richard F.J., Sirard M.A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.* 1996. 54: 22-28.
79. Richard F.J., Sirard M.A. Thecal cell monolayers that inhibit maturation of bovine oocytes show differences in their protein secretion pattern. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 50: 200-206.
80. Sahmi M., Nicola E.S., Silva J.M., Price C.A. Expression of 17 $\beta$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004, 223: 43-54.
81. Sakuta H., Sekiguchi M., Okamoto K., Sakai Y. Endogeneous angiotensin II receptors in *Xenopus* oocytes and eggs. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 1991, 208: 31-39.
82. Sandberg K., Bor M., Ji H., Markwick A., Millan M.A., Catt K.J. Angiotensin II-induced calcium mobilization in oocytes by signal transfer through gap junctions. *Science.* 1990, 249: 298-301.
83. Santos R.R., Schoevers E.J., Roelen B.A.J. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014, 12: 117-128.
84. Sartori R., Fricke P.M., Ferreira J.C.P., Ginther O.J., Wiltbank M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 2001, 65: 1403-1409.
85. Schauer K.H., Nielsen A.H., Winther H., Dantzer V., Poulsen K. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. *Biol. Reprod.* 2001, 65: 1672-1680.
86. Sealey J.E., White R.P., Laragh J.H., Rubin A.L. Plasma renin and renin in anephric patients. *Circul. Res.* 1977, 41: 17-21.
87. Shimizu T., Berisha B., Schams D., Miyamoto A. Changes in the messenger RNA expressions of the endothelin-1 and angiotensin systems in mature follicles of the superovulated bovine ovary. *J. Reprod. Dev.* 2007, 53: 655-662.
88. Shuttleworth G., Pipkin F.B., Hunter M.G. In vitro development of pig preantral follicles cultured in a serum-free medium and the effect of angiotensin II. *Reproduction.* 2002, 123: 807-818.
89. Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [The effect of angiotensin II on in vitro maturation of cow oocytes]. *Geny i kletki - Genes and Cells.* 2019, 14(2): 58-61.
90. Stefanello J.R., Barreta M.H., Porciuncula P.M. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology.* 2006, 66: 2068-2076.
91. Tanaka M., Ohnishi J., Ozawa Y., Sugimoto M., Usuki S., Naruse M., Murakami K., Miyazaki H. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995, 207: 593-598.
92. Wall R.J., Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology.* 2008, 69: 2-9.
93. Wang W.H., Abeydeera L.R., Cantley T.C., Day B.N. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 1997, 111: 101-108.
94. Yoshimura Y., Karube M., Koyama N., Shiokawa S., Nanno T., Nakamura Y. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *FEBS Lett.* 1992, 307: 305-308.
95. Yoshimura Y., Karube M., Oda T., Koyama N., Shiokawa S., Akiba M. et al. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in in vitro perfused rabbit ovaries. *Endocrinology* 1993, 133: 1609-1616.

96. Yoshimura Y., Karube M., Koyama N., Shiokawa S., Nanno T., Nakamura Y. Angiotensin II induces follicle ovulation and oocyte maturation in the rabbit ovary via the AT2 receptor subtype. *Endocrinology*. 1996, 137: 1204-1211.
97. Yoshimura Y., Koyama N., Karube M., Oda T., Akiba M., Yoshinaga A., Shiokawa S., Jinno M., Nakamura Y. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. *J. Clin. Invest.* 1994, 93: 180-187.
98. Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front. Neuroendocrin.* 1997, 18: 247-291.

### **Ovarial renin-angiotensin system as a control factor of oocytes maturation in mammals**

Smetanina I.G.

*Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition - Branch of Ernst Federal  
Science Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

**ABSTRACT.** The main reason for the decline in reproduction rates in productive animals is a violation of the endocrine regulation of ovarian function. Angiotensin II (Ang II) and its receptors, as components of the renin-angiotensin system (RAS), in the ovaries of mammals are involved in the regulation of the synthesis and secretion of prostaglandins and estrogens, follicular growth, ovulation and atresia. The main sections of the review: the renin-angiotensin system in mammals, local ovarian RAS in humans and other mammalian species, RAS in cows, RAS receptors. As a rule, the *in vitro* maturation efficiency of oocytes is lower than *in vivo* efficiency. It is important to identify the factors underlying this fact so that they can be incorporated into *in vitro* systems. It was shown that the level of AngII in human follicular fluid correlates with the relative proportion of mature oocytes collected after ovarian stimulation for *in vitro* fertilization. It was found that in pigs, AngII stimulates the *in vitro* maturation of oocytes from small and medium follicles; it did not affect the nuclear maturation of cow oocytes during *in vitro* cultivation of oocyte-cumulus complexes in the absence of follicular cells, but in the presence of theca cells it canceled the inhibitory effect of these cells. In the author studies, it was shown that AngII at concentrations of  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  M did not affect the secretion of the first directing body in a protein-free medium with hormonal additives, however, when cultured in a maturation medium without AngII hormones in a concentration of  $10^{-7}$  M, it significantly inhibited the achievement of metaphase 2 by the oocytes. This suggests that hormones neutralize the inhibitory effect of AngII on the maturation of the oocytes nucleus in a protein-free cell-free system (without co-cultivation with cumulus, granulosa, and theca cells). At the same time, other authors in experiments conducted on the eggs of pigs and sheep found that AngII improves egg maturation both in serum-free medium and in medium with serum supplemented with hormones. One of the reasons for interspecific differences in the physiological role of RAS may consist in different cellular localization of AngII receptors in ovarian follicles. Receptor antagonists inhibit ovulation, and they are used to study the role of RAS in the ovulatory process in rats, rabbits, and cows. In general, the physiological function of AngII in the ovary is not sufficiently investigated, and large interspecific differences make understanding the role of RAS even more difficult. On the other hand, the development of culture media for the full maturation of *in vitro* mammalian oocytes can open up great opportunities for experimental study and monitoring of the influence of both external and internal factors on the reproductive function of productive animals.

*Keywords: mammals, cows, oocytes, maturation in vitro, renin-angiotensin system*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2020, 1: 5-23**

Поступило в редакцию: 22.11.2019

Получено после доработки 02.03.2020

**Сметанина Ирина Геннадьевна**, к.б.н., с.н.с., 8(961)006-90-49; sme.irina2011@yandex.ru