

**ВЛИЯНИЕ АНГИОТЕНЗИНА II НА ЯДЕРНОЕ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ  
СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ КОРОВ *in vitro*, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ФОЛЛИКУЛОВ  
РАЗЛИЧНОГО ДИАМЕТРА**

Сметанина И. Г.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФИЦ  
животноводства – ВИЖ им. ак. Л.К. Эрнста, Калужская обл., Боровск, Россия*

Цель работы – оценить влияние ангиотензина II на ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов коров *in vitro* из фолликулов различного диаметра в безбелковой среде МЕМ-альфа с гормонами. В первой серии экспериментов ооциты из фолликулов диаметром 1-4 мм и диаметром 5-7 мм раздельно культивировали в среде МЕМ-альфа с гормонами и добавлением ангиотензина II в концентрации  $10^{-7}$  М. Критерием успешного созревания считали способность ооцитов достигать стадии метафазы II. Полученные результаты показали, что ангиотензин II не оказывал влияния на ядерное созревание ооцитов из фолликулов диаметром 5-7 мм, в то же время ингибируя выделение первого направительного тельца в ооцитах из фолликулов диаметром 1-4 мм (58,7% vs 71,7% в контроле,  $P < 0,05$ ). Во второй серии экспериментов созревшие с добавлением ангиотензина II и затем оплодотворенные ооциты из фолликулов различных диаметров культивировали до стадии бластоцисты, что являлось критерием цитоплазматического созревания. Ангиотензин II ингибировал первоначальное дробление яйцеклеток из фолликулов диаметром 5-7 мм (59,5% vs 77,3% в контроле,  $P < 0,05$ ), не снижая (при наличии тенденции) развитие до стадии бластоцисты (27,3% vs 19,1% в контроле), но ингибируя развитие яйцеклеток, полученных из фолликулов диаметром 1-4 мм, до стадии бластоцисты (9,6% vs 21,7% в контроле,  $P < 0,001$ ), не влияя при этом на первоначальное дробление яйцеклеток. Заключение, что влияние ангиотензина II на ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов коров *in vitro* зависит от диаметра фолликулов, из которого они получены.

*Ключевые слова: ооциты, фолликулы, диаметр, созревание in vitro, ангиотензин II, коровы, бластоцисты.*

*Проблемы биологии продуктивных животных. 2021. 3: 42-49.*

### **Введение**

В последние годы значительно расширился спектр применения клеточных *in vitro* технологий, в частности, системы созревания ооцитов и культивирования эмбрионов млекопитающих вне организма. Помимо изучения фундаментальных механизмов раннего развития, эти системы все более широко используются в медицине и фармакологии как для скрининга токсичных для человека агентов, так и для совершенствования технологий экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у людей. В то же время возрастает значимость этих систем для воспроизводства генетически ценных сельскохозяйственных животных, а также для разработки новых коммерческих сред для ЭКО млекопитающих.

Большинство факторов, действующих на процесс созревания ооцитов млекопитающих *in vivo*, неизвестны. И, как следствие, эффективность созревания ооцитов *in vitro* ниже, чем *in vivo*. Важно идентифицировать эти факторы, с тем, чтобы можно было включать их в *in vitro* систему.

Имеются надежные данные, что ренин-ангиотензиновая система (РАС) представлена в яичниках млекопитающих и играет важную роль в синтезе и секреции простагландинов и эстрогенов, регуляции роста фолликулов, овуляции и атрезии, что позволило ввести концепцию

“локальной” или “тканевой” РАС. Локальная овариальная ренин-ангиотензиновая система (ОВРАС) включается в контроль и регуляцию физиологических и патологических кондиций в женском репродуктивном тракте (Сметанина, Татарина, 2019). Ангиотензин II (АнгII) и его рецепторы широко распространены в фолликуле, преовуляторной теке и гранулезных клетках, и постовуляторных пристеночных лютеиновых гранулезных клетках и регулируют стероидогенез (Acosta et al., 1999, 2000; Сметанина и др., 2000; Кривохарченко и др., 2001; Сметанина и др., 2006, 2014).

Молекулярная блокада ОВРАС ингибирует созревание ооцита и овуляцию. Патологически аномальная ОВРАС функция ассоциируется с бесплодием, поликистозным овариальным синдромом, синдромом гиперстимуляции яичников, и раком яичников. Блокада рецепторов АнгII изучается в свете лечения данных заболеваний. Однако, нет полного понимания функции ОВРАС и ее применения. Необходимость дальнейших исследований очевидна (Bavister et al., 1983).

Недавно впервые показано, что уровень АнгII в фолликулярной жидкости человека коррелирует с пропорцией созревших ооцитов, собранных после стимуляции яичников для ЭКО (Cavallo et al. 2017).

Физиологическая функция АнгII в яичнике до сих пор недостаточно хорошо определена и широкие видовые вариации делают ее понимание еще более сложной.

В наших экспериментах ранее впервые было показано, что АнгII в концентрациях  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$ М не воздействовал на выделение первого направительного тельца (ПНТ) в ооцитах коров в бессывороточной среде МЕМ-альфа с гормональными добавками (Сметанина, Татарина, 2019). Однако, когда в среду созревания гормоны не включали, АнгII в концентрации  $10^{-7}$ М существенно ингибировал достижение яйцеклетками стадии метафазы II (МII). На основании полученных результатов можно предположить, что гормоны нивелируют ингибирующее действие АнгII на созревание ядра яйцеклеток в безбелковой бесклеточной системе (без сокультивирования с клетками кумулюса, гранулезы, теки или яйцевода).

В то же время роль АнгII в созревании ооцитов млекопитающих (а, именно, свиней) из фолликулов различного диаметра оценена всего в одной известной нам работе (Ferreira et al., 2007). Когда ооциты из фолликулов различного диаметра были отдельно культивированы в среде, содержащей АнгII в концентрации 100 нг/мл, процент созревания был значительно выше в ооцитах из мелких (61,5%) и средних (85,1%) фолликулов в сравнении с контролем (45,1 и 72,6%, соответственно). Однако, добавление АнгII ингибировало ядерное созревание в ооцитах из больших фолликулов (77,8% против 87,3%). В то же время, воздействие ангиотензина II на созревание ооцитов коров из фолликулов различного диаметра не изучалось в принципе.

Цель работы – оценить влияние АнгII на ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов коров *in vitro* из фолликулов различного диаметра в безбелковой среде МЕМ-альфа с гормонами.

### Материал и методы

Получение ооцитов и их созревание, оплодотворение и культивирование осуществляли так, как нами было описано ранее (Li et al., 2004; Goncalves et al., 2010; 2012; Herr et al., 2013) с некоторыми модификациями.

Яичники коров получали на мясокомбинате и транспортировали в лабораторию в течение 2-3 ч. при 30°C в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (ПанЭко, Россия). Ооциты выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-8 мм методом рассечения. Для эксперимента отбирали ооциты с многослойным компактным кумулюсом. Для созревания ооцитов использовали среду МЕМ-альфа (Sigma, США) с добавлением гипофизарного свиного ФСГ (ФСГ-супер, ООО Агробиомед, ВНИИФБиП с/х животных, Россия) в количестве 1 мкг/мл и хГч (0,3 ед/мл) (Московский эндокринный завод), пирувата натрия и глутамин (Sigma, США) до концентрации 0,2 и 2 мМ, соответственно. В первой серии экспериментов ооциты из фолликулов диаметром 1-4 мм и диаметром 5-7 мм отдельно культивировали в среде МЕМ-альфа с гормонами и добавлением АнгII в концентрации  $10^{-7}$  М. Критерием успешного созревания считали способность ооцитов достигать стадии МII. Сток АнгII приготавливался путем разведения пептида в фосфатном буфере

Дюльбекко (ПанЭко, Россия) до концентрации  $10^{-5}$  М, затем распределялся на 100 мкл аликвоты и хранился при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для того, чтобы исключить возможное влияние неопределенных белковых компонентов, мы не добавляли сыворотку или сывороточный альбумин к среде созревания. Ооциты культивировали в 4-луночных чашках (Nunc, Дания) по 30 штук на лунку с 500 мкл среды при температуре  $38,5^{\circ}\text{C}$  в течение 22 ч. в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$  в воздухе. После созревания ооциты освобождали от клеток кумулюса с помощью 0,5%-ного раствора гиалуронидазы (Sigma, США) и механического пипетирования. Наличие первого направительного тельца (ПНТ, морфологический критерий достижения ооцитами стадии МП) определяли при увеличении  $\times 98$ .

Во второй серии экспериментов созревшие с добавлением АнгII и затем оплодотворенные ооциты из фолликулов различного диаметра, культивировали до стадии бластоцисты, что являлось критерием цитоплазматического созревания. Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Тироде (Nielsen et al., 1994) с 10мМ буфером Нерес (Т-Н), дополненной 3 г/л свободного от жирных кислот бычьего сывороточного альбумина (БСА, N 4919, Sigma, США), и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл среды оплодотворения (из расчета 25-30 ооцитов на 500 мкл среды). Для оплодотворения применяли среду Тироде с 25 мМ бикарбонатом натрия (Nielsen et al., 1994), дополненную 10 мкг/мл гепарина (Sigma, США) и 6 г/л БСА. Сперму готовили методом “всплывания” (Palumbo et al., 2016), используя среду 1 для гамет коров (Parrish et al., 1985) с добавлением пирувата натрия в концентрации 1мМ и 6 г БСА/л. Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла  $2 \times 10^6$ /мл. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 18 ч. при температуре  $38,5^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$  в воздухе.

Для оценки способности оплодотворённых ооцитов к дальнейшему развитию *in vitro* их трижды отмывали в среде Т-Н, а затем помещали на культивирование в микрокапли синтетической жидкости яйцевода (СЖЯ) (Parrish et al., 1986) объемом 50 мкл (из расчёта 10 яйцеклеток на одну микрокаплю) без глюкозы с заменимыми (по рецептуре МЕМ, Sigma, США) и незаменимыми (по рецептуре Игла, Sigma, США) аминокислотами, содержащей 1 мМ глутамина, 0,33 мМ пирувата натрия, 3 г/л БСА (N 3311, Sigma, США). Через 42 ч. после начала оплодотворения эмбрионы переносили в новые микрокапли среды СЖЯ объемом 30 мкл (не более 10 эмбрионов на каплю), дополненной 20% эстральной сыворотки (ЭС). Еще через двое суток в капли развития добавляли глюкозу (“Sigma”, США) до концентрации 4 мМ. Культивирование осуществляли в течение 192 ч (рис. 1) при температуре  $38,5^{\circ}\text{C}$  в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси и в отдельных экспериментах до 240 ч до стадии вылупления для подтверждения жизнеспособности полученных бластоцист (рис. 2).

Во все среды добавляли пенициллин/стрептомицин в концентрации 100 ед/мкг на 1 мл (ПанЭко, Россия). Дробление от двух клеток оценивали через 2 сут. после оплодотворения визуально под световым микроскопом (МБС-10, Россия) при увеличении  $\times 98$ . Количество бластоцист подсчитывали вручную, используя световой микроскоп Nikon Eclipse (Япония) при увеличении  $\times 200$ .

### Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов ооциты из фолликулов диаметром 1-4 мм (маленький диаметр) и диаметром 5-7 мм (средний диаметр) раздельно культивировали в среде МЕМ-альфа с гормонами и добавлением АнгII в определённой ранее рабочей концентрации  $10^{-7}$  М. Критерием успешного созревания считали способность ооцитов достигать стадии МП. Полученные нами результаты показали (данные приведены в табл.1), что АнгII в концентрации  $10^{-7}$ М не оказывал влияние на ядерное созревание ооцитов из фолликулов среднего диаметра (61,6% в контроле vs 66,7% в опыте). В то же время АнгII ингибировал выделение ПНТ в ооцитах из фолликулов малого диаметра (71,7% в контроле vs 58,7% в опыте,  $P < 0,05$ ).

Таблица 1. Влияние АнгII на ядерное созревание ооцитов коров, полученных из фолликулов различного диаметра и культивированных *in vitro* в среде с гормонами

Группы гамет	Диаметр фолликулов, мм	Концентрация АнгII в опытной группе	Количество	
			ооцитов, n	ооцитов с ППТ, n (%)
Контрольная	1-4	$10^{-7}$ М	99	71 (71,7)
Опытная			104	61 (58,7) *
Контрольная	5-7	$10^{-7}$ М	86	53 (61,6)
Опытная			75	50 (66,7) *

Примечание: приведена сумма результатов от четырёх опытов; здесь и далее в таблицах: \* $P < 0,05$  по *t* - критерию при сравнении с контролем.

Во второй серии экспериментов ооциты из фолликулов диаметром 1-4 мм и диаметром 5-7 мм, отдельно созревшие в среде МЕМ-альфа с гормонами и добавлением АнгII в определенной ранее рабочей концентрации  $10^{-7}$  М и затем оплодотворенные, культивировали до стадии бластоцисты, что являлось критерием цитоплазматического созревания. АнгII ингибировал первоначальное дробление яйцеклеток из фолликулов среднего диаметра (77,3% в контроле vs 59,5% в опыте,  $P < 0,05$ ), не снижая (при наличии тенденции), однако, развития до стадии бластоцисты (27,3% в контроле vs 19,1% в опыте) (табл. 3). В то же время ангиотензин II ингибировал развитие яйцеклеток, полученных из фолликулов малого диаметра до стадии бластоцисты (21,7% в контроле vs 9,6% в опыте,  $P < 0,001$ ), не влияя при этом на первоначальное дробление яйцеклеток (66,3% в контроле vs 59,6% в опыте) (табл. 2).

Таблица 2. Влияние АнгII на цитоплазматическое созревание ооцитов коров, полученных из фолликулов диаметром 1-4 мм и культивированных *in vitro* в среде с гормонами

Группы гамет	Концентрация АнгII в опытной группе	ооцитов, n	эмбрионов на стадии дробления, %	Количество эмбрионов на стадии морулы-бластоцисты, %			
				от общего числа ооцитов		от общего числа дробящихся эмбрионов	
				эмбрионов	числа дробящихся эмбрионов	эмбрионов	числа дробящихся эмбрионов
Контроль	нет	202	66,3	33,7	50,7	21,7 <sup>a</sup>	32,8
Опыт	$10^{-7}$ М	208	59,6	31,7	53,2	9,6*	16,1*

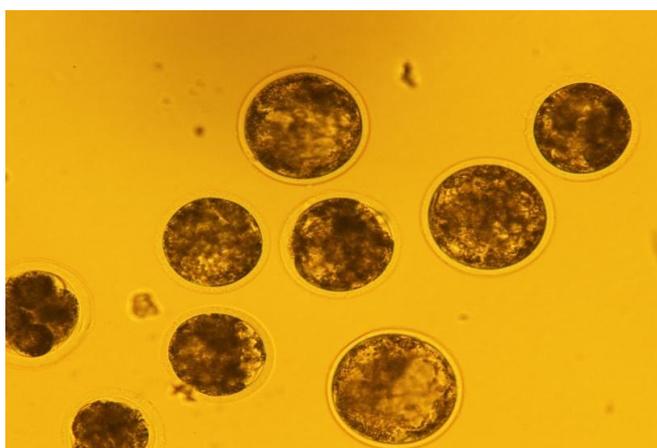


Рис. 1. Бластоцисты коров, полученные *in vitro* (7,5 суток после IVF).

Таблица 3. Влияние АнгII на цитоплазматическое созревание ооцитов коров, полученных из фолликулов диаметром 5-7 мм и культивированных *in vitro* в среде с гормонами

Группы гамет	Концентрация АнгII в опытной группе	Количество					
		ооцитов, n	эмбрионов на стадии дробления, %	эмбрионов на стадии морулы-бластоцисты, %		эмбрионов на стадии бластоцисты, %	
				от общего числа ооцитов	от числа дробящихся эмбрионов	от общего числа ооцитов	от числа дробящихся эмбрионов
Контроль	10 <sup>-7</sup> М	88	77,3 <sup>a</sup>	38,6	50,0	27,3	41,2
Опыт		84	59,5 <sup>b</sup>	35,7	60,0	19,1	32,0*

Примечание: приведена сумма результатов от четырех опытов; P<0,05 при сравнении с контролем.

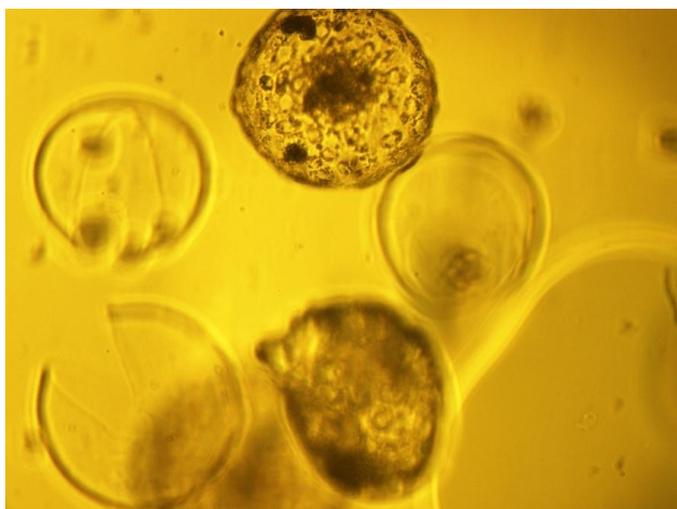


Рис. 2. Бластоцисты коров, полученные *in vitro* (9,5 суток после IVF).

Корова является отличной моделью для изучения роли локальных факторов в контроле фолликулярного развития (Schauser et al., 2001)

Широко распространено мнение, что имеются существенные видовые различия в РАС функции в развитии фолликулов. Примеры видоспецифичных функций РАС в яичнике включают, например, вовлечение АнгII в регуляцию фолликулярной атрезии у крыс в противоположность необходимости этого пептида для развития доминантного фолликула и овуляции у кроликов и коров (Schauser et al., 2001)

В данной работе впервые исследовано влияние АнгII на ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов коров из фолликулов различного диаметра. 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 достоверно ингибировал как выделение первого направительного тельца в ооцитах из фолликулов маленького диаметра (1-4 мм), так и развитие эмбрионов, полученных из данных ооцитов, до стадии бластоцисты.

В предыдущем нашем исследовании [10]?? каком? установлено, что АнгII в концентрациях 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-7</sup> М не оказывал влияния на ядерное созревание ооцитов коров *in vitro*, взятых их

фолликулов 3-8 мм, в том случае, если в среду созревания добавлены гормоны (57,1% в контроле vs 64,6% в опыте; 60,8% vs 58,6%; 65,2% vs 66,7%, соответственно). То есть, предположительно, ингибирующее влияние АнгII на ядерное созревание ооцитов из фолликулов маленького диаметра было скрыто в общем пуле ооцитов из фолликулов 3-8 мм, которые стандартно берутся в эксперименты.

В противоположность нашим данным показано, что у свиней АнгII напрямую стимулирует созревание ооцитов *in vitro* из маленьких и средних фолликулов (Ferreira et al., 2007). Когда ооциты из фолликулов различного диаметра были раздельно культивированы 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 их контроле (45,1 и 72,6%, соответственно). Однако, добавление АнгII ингибировало ядерное созревание в ооцитах из больших фолликулов (77,8% против 87,3%).

Также у свиней установлено, что концентрация АнгII негативно коррелирует с фолликулярным диаметром (Ferreira et al., 2007). У коров, напротив, экспрессия АнгII наивысшая в больших фолликулах, что свидетельствует о важности этого фактора в процессе фолликулярного роста и созревания (Acosta et al., 1999). Эти данные свидетельствуют о существовании выраженных видовых различий в функции PAC во время фолликулярного роста и атрезии. Одной из причин различия среди видов в физиологической роли PAC может являться различная клеточная локализация АнгII рецепторов в овариальных фолликулах.

У коров, рецепторы второго типа АнгII идентифицированы, главным образом, в доминантном фолликуле посредством автордиограмм (Acosta et al., 1999). и их экспрессия позитивно коррелирует с диаметром фолликула (Tervit et al., 1972). Показано, что АнгII активность связана с фолликулярным ростом и овуляцией у коров (Tervit et al., 1972; Yoshimura. et al., 1996; Acosta et al., 2000; Сметанина др., 2014). Данные от *in vitro* и *in vivo* исследований демонстрируют, что АнгII играет ключевую роль в развитии антрального фолликула и раннего механизма овуляции через AT<sub>2</sub> подтип рецепторов у коров (Yoshimura, 1997).

Таким образом, нами показано, что влияние АнгII на ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов коров *in vitro* зависит от диаметра фолликулов из которого они получены.

В то же время полученные данные позволяют понять и уточнить некоторые фундаментальные механизмы, регулирующие созревание ооцитов коров, в частности, роль PAC и ее составляющих в этом процессе. Дальнейшие углубленные исследования необходимы для выяснения механизмов, посредством которых АнгII влияет на созревание яйцеклеток у млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке госзадания ААА-А18-118021590132-9 № 0445-2019-0030.

**Благодарности.** Благодарю ведущего специалиста Татаринovu Людмилу Викторовну за помощь в экспериментальной части работы.

#### Список литературы

1. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В. Воздействие ангиотензина II на созревание яйцеклеток коров *in vitro*. // Гены и Клетки. 2019. Т. 14. № 2. С. 58-61
2. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 139-143
3. Кривохарченко А.С., Сметанина И.Г., Татаринова Л.В. Оплодотворение и последующее развитие ооцитов крупного рогатого скота после сокращенной инкубации со сперматозоидами. // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 4. С. 283-287.
4. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе. // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 6. С. 438-443.
5. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157. № 5. С. 655-658.

6. 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.
7. Acosta T.J., Ozawa T., Kobayashi S. 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.
8. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 1983. 28: 235-247.
9. Cavallo I.K., Dela Cruz C., Oliveira M.L. et al. Angiotensin-(1-7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. *Hum. Reprod.* 2017. 32: 1318-1324.
10. Ferreira R., Gasperin B., Bohrer R. et al. The role of angiotensin II in bovine follicular growth. *Biol. Reprod.* 2008. 78: 222 (abstract).
11. Ferreira R., Oliveira J.F., Fernandes R. et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction.* 2007. 134: 713-719.
12. 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.
13. 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.
14. Herr D., Bekes I., Wulff C. Local Renin-Angiotensin system in the reproductive system. *Front. Endocrinol.* 2013. 4: 150.
15. Li Y.H., Jiao L.H., Liu R.H. et al. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation in vitro. *Theriogenology.* 2004. 61: 447-459.
16. Nielsen A.H., Hagenmann A., Svenstrup B. et al. Angiotensin II receptor density in bovine ovarian follicles relates to tissue renin and follicular size. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1994. 21: 463-469.
17. Palumbo A., Ávila J., Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system (OVRAS): A major factor in ovarian function and disease. *Reprod. Sci.* 2016. 23: 1644-1655.
18. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., First N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology.* 1985. 24: 237-249.
19. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried- Rutledge M.L. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986. 25: 591-600.
20. Schauser K.H., Nielsen A.H., Winther H. et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. *Biol. Reprod.* 2001. 65: 1672-1680.
21. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972. 30: 493-497.
22. Yoshimura Y., Karube M., Koyama N. et al. Angiotensin II induces follicle ovulation and oocyte maturation in the rabbit ovary via the AT<sub>2</sub> receptor subtype. *Endocrinology.* 1996. 137: 1204-1211.
23. Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol.* 1997. 18: 191-247.

#### References (for publications in Russian)

1. Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [Effect of angiotensin II on maturation of oocytes of cows in vitro]. *Geny i Kletki - Genes and Cells.* 2019. 14(2): 58-61.
2. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effects of the culture medium composition on cattle oocyte maturation and embryogenesis in vitro. *Ontogenez - Russian Journal of Developmental Biology* 2000. 31(2): 139-143.
3. Krivokharchenko A.S., Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [Fertilization and subsequent development of cattle oocytes after reduced incubation with spermatozoa]. *Ontogenez - Russian Journal of Developmental Biology* 2001. 32(4): 283-287.
4. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [In vitro fertilization of bovine oocytes in protein-free culture system]. *Ontogenez - Russian Journal of Developmental Biology.* 2006. 37(6): 438-443.
5. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effects of hormones on in vitro maturation of cattle oocytes]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny - Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2014; 157(5): 655-658]

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.3.42-49

**Effect of angiotensin II on nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes of cows  
in vitro obtained from follicles of different diameter**

Smetanina I. G.

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

**ABSTRACT.** The aim of the work was to evaluate the effect of angiotensin II on the nuclear and cytoplasmic maturation of cows oocytes *in vitro* from follicles of various diameters in a protein-free medium of MEM-alpha with hormones. In the first series of experiments, oocytes from follicles with a diameter of 1-4 mm and a diameter of 5-7 mm were separately cultured in the medium of MEM-alpha with hormones and the addition of angiotensin II at a concentration of  $10^{-7}$  M. The criterion for successful maturation was the ability of oocytes to reach the metaphase II stage. Our results showed that angiotensin II did not affect the nuclear maturation of oocytes from follicles with a diameter of 5-7 mm, while significantly inhibiting the release of the first directional body in oocytes from follicles with a diameter of 1-4 mm (58,7% vs 71,7% in control,  $P < 0,05$ ). In the second series of experiments, oocytes matured with the addition of angiotensin II and then fertilized from follicles of various diameters were cultured to the blastocyst stage, which was the criterion for cytoplasmic maturation. Angiotensin II significantly inhibited the initial cleavage of embryos from follicles with a diameter of 5-7 mm (59,5%, vs 77,3% in control,  $P < 0,05$ ), without significantly reducing (if there is a trend), however, the development to the blastocyst stage (27,3% vs 19,1% in control); at the same time, it significantly inhibited the development of embryos obtained from follicles with a diameter of 1-4 mm to the blastocyst stage (9,6% vs 21,7% in control,  $P < 0,001$ ), without affecting the initial cleavage of embryos (66,3% vs 59,6%, respectively). Concluded that the effect of angiotensin II on the nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro* depends on the diameter of the follicles from which they are obtained.

*Keywords: oocytes, follicles, diameter, maturation in vitro, angiotensin II, cows, blastocysts.*

**Problemy biologii productivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology**, 2021, 3: 42-49.

Поступило в редакцию: 03.06.2021

Получено после доработки: 13.09.2021

**Сметанина Ирина Геннадьевна**, с.н.с. к.б.н., тел. 8-(48438)-4-32-34 (дом.) 89610069049 (моб.);  
sme.irina2011@yandex.ru