УДК 636.2.054:591.465:12:59.085

DOI:10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2025.1.40-49

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АНГИОТЕНЗИНА II НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*

Сметанина И. Г.

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

Ренин-ангиотензиновая система (РАС), включающая в себя ангиотензин II (АнгII) и его рецепторы, известна своей ролью в яичнике, однако, широкие видовые вариации затрудняют понимание её физиологических функций. Цель данной работы - изучить влияние АнгII на созревание ооцитов крупного рогатого скота (КРС) *in vitro* в безбелковой среде МЕМ-альфа, содержащей гормоны или без них. Критерием успешного созревания считали способность ооцитов достигать стадии метафаза II (МII) или способность ооцитов после оплодотворения развиваться до стадии морулы-бластоцисты. В первой серии экспериментов ооциты КРС созревали *in vitro* в среде, содержащей гормоны, с тремя различными концентрациями АнгII (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} М) и в среде без гормонов, в которую АнгII добавляли до концентрации 10^{-7} М. Полученные результаты показывают, что АнгII в концентрациях 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} М не оказывает влияния на ядерное созревание ооцитов *in vitro* 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). Однако, если в среду созревания гормоны не добавлялись, АнгII в концентрации 10^{-7} М существенно ингибировал выделение первого направительного тельца (ПНТ, 43.6% в контроле vs 29.3% в опыте, $P < 0.05$). Это позволяет сделать предварительный вывод, что гормоны нивелируют ингибирующий эффект АнгII на ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro*. Во второй серии экспериментов исследовали влияние АнгII в концентрации 10^{-7} М на цитоплазматическое созревание ооцитов в среде с гормонами, критерием которого являлось развитие эмбрионов до преимплантационных стадий. Не было выявлено различия между контрольной и опытной группой ни по проценту первоначального дробления (53.6% vs 52.9%), ни по проценту эмбрионов, достигших стадии морулы/бластоцисты (17.6% vs 15.7%). Таким образом, вопрос об АнгII, как возможной составляющей культуральных сред, остаётся открытым. Заключили о необходимости продолжения исследований в отношении роли АнгII в регуляции созревания ооцитов у млекопитающих.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, ооциты, созревание in vitro, ангиотензин II.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2025. 1: 40-49.

Введение

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

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) хорошо известна своей ролью в организме; она включает в себя АнгII и его различные рецепторы. Известно, что РАС играет важную роль в организме млекопитающих, включая регуляцию кровяного давления, метаболизацию

солей и воды, поддержание баланса жидкости в организме, и стимуляцию пролиферацию кровяных сосудов в мышечной ткани. Имеются надежные данные, что РАС представлена в яичниках млекопитающих и играет важную роль в синтезе и секреции простагландинов и эстрогенов, регуляции роста фолликулов, овуляции и атрезии, что дало основание для формулирования концепции “локальной” или “тканевой” РАС.

Однако, физиологическая функция АнгII в яичнике до сих пор недостаточно хорошо определена и широкие видовые вариации делают её понимание ещё более сложным.

Установлено, что ближе к овуляции, уровень АнгII повышается в яичнике после обработки кроликов хорионическим гонадотропином человека (хГч, Yoshimura, 1994), коров лютеинизирующим гормоном (ЛГ, Acosta et al, 1999; Shimizu et al., 2007), и женщин человеческим менопаузальным гонадотропином (чМг) и хГч (Lightman et al., 1997). Данные, собранные в программах по *in vitro* оплодотворению на человеке, свидетельствуют, что концентрация проренина в фолликулярной жидкости, коррелирует с фолликулярным развитием, созреванием ооцит-кумулюсного комплекса (ОКК) и жизнеспособностью ооцитов, т.е. 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).

Показано, что у свиней АнгII напрямую стимулирует созревание ооцитов *in vitro* из малых и средних фолликулов (Li et al., 2004). Однако, АнгII не оказывал влияние на ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro*, когда ОКК культивировали в отсутствие фолликулярных клеток. В то же время, когда ОКК были культивированы в присутствии текальных клеток, АнгII аннулировал ингибирующий эффект, производимый посредством этих клеток (Giometti et al., 2005).

Одной из причин межвидовых различий в отношении физиологической роли РАС может являться различная клеточная локализация АнгII рецепторов в овариальных фолликулах.

Существуют два основных подтипа АнгII рецепторов – AT1 и AT2. Считается, что AT1 рецепторы опосредуют множество хорошо известных АнгII эффектов на сокращение гладкой мускулатуры, секрецию альдостерона и регуляцию кровяного давления, в то время как AT2 рецепторы индуцируют апоптоз (Yamada et al., 1996) и репродуктивные функции, включая стероидогенез, созревание ооцитов и овуляцию (Kuji et al., 1996; Yoshimura et al., 1996).

В первоначальных исследованиях, изучавших локализацию АнгII рецепторов в фолликулах КРС, сообщалось, что меченный радиоактивным йодом АнгII связывается преимущественно или эксклюзивно с клетками теки (Brunswig - Spickenheier, Mukhopadhyay, 1992; Schauser et al., 2001), чем вышеназванные авторы (Giometti et al., 2005) и объясняют полученные результаты. Однако, этот лигандный метод исследования может быть недостаточно чувствителен для детектирования АнгII, связанного с гранулёзными клетками. Используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени, удалось детектировать матричную РНК (мРНК) AT1 и AT2 рецепторов как в клетках теки, так и в клетках гранулёзы. Уровни экспрессии AT2 рецепторов были выше в гранулёзе здоровых фолликулов КРС, чем в гранулёзе атретических. Причем, присутствие мРНК AT2 рецепторов в гранулёзе активируется фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) (Portela et al., 2008). Те же авторы уточнили локализацию иммуногистохимически и обнаружили соответствующий белок как в клетках теки, так и гранулёзы, что согласовалось с данными ПЦР (Portela et al., 2008). У свиней АнгII с использованием иммуногистохимического

анализа был найден в зоне-пеллюцида и гранулёзных клетках. Распределение АТ1 рецептора было аналогично распределению самого АнгII. Однако АТ2 рецептор, главным образом, был распределен в строме и клетках теки фолликулов (Li et al., 2004).

Значительные межвидовые различия, касающиеся экспрессии и клеточной локализации АнгII рецепторов в овариальных фолликулах, подтверждают различия среди видов в отношении физиологической роли РАС. Роль АнгII в созревании ооцитов КРС оценена недостаточно по сравнению с другими видами.

Цель данной работы – оценить влияние различных концентраций АнгII на ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro* в безбелковой среде МЕМ-альфа с гормонами либо без них, а также влияние АнгII на цитоплазматическое созревание ооцитов КРС, критерием которого являлось развитие эмбрионов до стадии бластоцисты.

Материал и методы

Получение ооцитов, их созревание, оплодотворение и культивирование осуществлялось, как было описано ранее (Сметанина и др., 2000; Кривохарченко и др., 2001; Сметанина и др., 2006; Сметанина и др., 2014) с некоторыми модификациями.

Яичники КРС 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 1 мкг/мл гипофизарного свиного ФСГ (ФСГ-супер, ООО Агробиомед, ВНИИФБиП, Россия) и 0,3 ед/мл хГч (Московский эндокринный завод), пирувата натрия и глутамина (Sigma, США) до концентрации 0,2 и 2 мМ, соответственно. В первой серии экспериментов в среду созревания добавляли АнгII (Sigma, США) до концентраций 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} М или в среду МЕМ-альфа без гормонов добавляли АнгII до концентрации 10^{-7} М. Сток АнгII приготавливали путём разведения пептида в фосфатном буфере Дюльбекко (ПанЭко, Россия) до концентрации 10^{-5} М, затем распределяли на 100 мкл аликвоты и хранили при -20°C. Каждая концентрация АнгII исследовалась в трех-шести повторных экспериментах.

Для того, чтобы исключить возможное влияние неопределённых белковых компонентов, в среду созревания не добавляли сыворотку или сывороточный альбумин. Ооциты культивировали в 4-луночных чашках (Nunc, Дания) по 30 ОКК на лунку с 500 мкл среды при температуре 38,5°C в течение 24 ч в атмосфере 5%-го CO₂ в воздухе. После созревания ооциты освобождали от клеток кумулюса с помощью 0,5%-ного раствора гиалуронидазы (Sigma, США) и механического пипетирования. Наличие ПНТ (морфологический критерий достижения ооцитами стадии МII) определяли при увеличении $\times 98$.

Во второй серии экспериментов созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Тироде (Bavister et al., 1983) с 10 мМ буфером Hepes (Т-Н), дополненной 3 г/л свободного от жирных кислот бычьего сывороточного альбумина (BSA, N 4919, Sigma, США) и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл среды оплодотворения (из расчёта 30 ОКК на 500 мкл среды). Для оплодотворения применяли среду Тироде с 25 мМ бикарбонатом натрия (Bavister et al., 1983), дополненную 10 мкг/мл гепарина (Sigma, США) и 6 г/л БСА. Сперму готовили методом “всплывания” (Parrish et al., 1986), используя среду 1 для гамет КРС (Parrish et al., 1985) с добавлением пирувата натрия в концентрации 1 мМ и 6 г/л БСА. Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 2×10^6 .

Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 18 ч. при 38,5°C в атмосфере 5%-го CO₂ 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, Tervit et al., 1972) объёмом 50 мкл без глюкозы с заменимыми (по рецептуре MEM, Sigma, США) и незаменимыми (по рецептуре Игла, Sigma, США) аминокислотами, содержащей 1 мМ глутамин, 0,33 мМ пируват натрия, 3 г/л БСА (N 3311, Sigma, США). Через 42 ч после начала оплодотворения эмбрионы переносили в новые микрокапли среды СЖЯ объёмом 30 мкл, 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 при температуре 38,5°C в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂).

Во все среды добавляли пенициллин/стрептомицин в концентрации 100 ед/мкг на 1 мл (ПанЭко, Россия).

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов ооциты КРС созревали *in vitro* в среде, содержащей гормоны с тремя различными концентрациями АнГII и в среде без гормонов, в которую АнГII добавляли до максимально используемой концентрации. Полученные результаты показывают (табл. 1), что АнГII в концентрациях 10⁻¹¹, 10⁻⁹, 10⁻⁷ М не оказывает влияния на ядерное созревание ооцитов *in vitro* в том случае, если в среду созревания добавлены гормоны.

Таблица 1. *Влияние различных концентраций АнГII на ядерное созревание ооцитов КРС, культивированных in vitro с добавлением гормонов*

Группы гамет	Концентрация АнГII в опытной группе	ооцитов	Число ооцитов с ПНТ, n (%)
Контрольная	10 ⁻¹¹ М*	191	109 (57.1)
Опытная		212	137 (64.6)
Контрольная	10 ⁻⁹ М**	189	115 (60.8)
Опытная		133	78 (58.6)
Контрольная	10 ⁻⁷ М***	92	60 (65.2)
Опытная		90	60 (66.7)

Примечания: 10⁻¹¹М* – приведена сумма результатов от пяти опытов; 10⁻⁹М** – приведена сумма результатов от трёх опытов. 10⁻⁷М*** Приведена сумма результатов от двух опытов

Однако, если в среду созревания гормоны не добавлялись (табл. 2), АнГII в концентрации 10⁻⁷М существенно ингибировал выделение ПНТ. Это позволяет сделать предварительный вывод, что гормоны нивелируют ингибирующий эффект АнГII на ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro*.

Таблица 2. *Влияние АнГ II на ядерное созревание ооцитов КРС, культивированных in vitro в среде без гормонов*

Группы гамет	Концентрация АнГII в опытной группе	Количество	
		ооцитов	ооцитов с ПНТ, n (%)

Контрольная	$10^{-7}M$	94	41 (43.6)
Опытная		92	27 (29.3)*

Примечание: приведена сумма результатов от шести опытов. * $P < 0.05$ по t - критерию.

Во второй серии экспериментов исследовали влияние АнгII в концентрации $10^{-7}M$ на цитоплазматическое созревание ооцитов в среде с гормонами, критерием которого являлось развитие эмбрионов до преимплантационных стадий (табл. 3).

Таблица 3. Влияние Анг II на цитоплазматическое созревание ооцитов крупного рогатого скота, культивированных *in vitro* в среде с гормонами

Группы гамет	Концентрация Анг II в опытной группе	ооцитов	Количество эмбрионов на стадии морулы-бластоцисты, n(%)		
			эмбрионов на стадии дробления, n(%)	эмбрионов на стадии морулы-бластоцисты, n(%)	от общего числа ооцитов от числа дробящихся эмбрионов
Контрольная	$10^{-7}M$	153	82 (53.6)	27 (17.6)	27 (32.9)
Опытная		153	81 (52.9)	24 (15.7)	24 (29.6)

Примечание: приведена сумма результатов от пяти опытов.

В этом опыте не было выявлено разницы между контрольной и опытной группой ни по проценту первоначального дробления, ни по проценту эмбрионов, достигших стадии морулы/бластоцисты.

Таким образом, АнгII, добавляемый в среду созревания с гормонами, не оказывает влияния ни на ядерное, ни на цитоплазматическое созревание ооцитов КРС *in vitro*. Но в среде без гормонов АнгII существенно ингибирует выделение ПНТ.

Обсуждение

В нашем первом эксперименте показано, что АнгII в концентрациях 10^{-11} , 10^{-9} , $10^{-7}M$ не оказывал влияние на выделение ПНТ в безбелковой среде с гормонами. Однако, когда в среду созревания гормоны не добавлялись, АнгII в концентрации $10^{-7}M$ существенно ингибировал достижение ооцитами стадии МII. Возникает предположение, что гормоны каким-то образом нивелируют ингибирующее действие АнгII на созревание ядра в безбелковой, бесклеточной системе.

Известны две основных работы, в которых исследовалось воздействие АнгII на созревание ооцитов КРС в *in vitro* системе. Это работы Giometti et al., (2005) и Stefanello et al. (2006) выполненные в одной лаборатории. В первой работе показано, что АнгII в безбелковой среде 199 NEPES без гормонов в отсутствие фолликулярных клеток в концентрациях 10^{-11} , 10^{-9} , $10^{-7}M$ не оказывал влияния на процент ооцитов, достигающих стадии разрушения зародышевого пузырька, метафазы I (MI) и MII после 7, 12 и 18 часов культивирования, соответственно. В том случае, когда клетки теки были добавлены в культуральную систему, АнгII в минимальной концентрации $10^{-11}M$ был способен аннулировать ингибирующий эффект, производимый посредством этих клеток на ядерное созревание ооцитов КРС. Stefanello et al. (2006) подтвердили выводы своих коллег. АнгII аннулирует ингибирующий эффект фолликулярных клеток (клеток теки) на ядерное созревание ооцитов КРС независимо от присутствия в среде гонадотропинов. Небольшим методическим недостатком этой работы является, как нам кажется, наличие в среде созревания 199NEPES 0,4% БСА, который

является достаточно неопределённым фактором, что может вредить чистоте 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 бесклеточной среде без белка и гормонов, АнГII существенно ингибировал выделение первого направительного тельца через 22 часа культивирования, что противоречит результатам Giometti et al. (2005). Следует отметить, что подобная разница в результатах может иметь в своей основе множество причин, как то: используемая среда культивирования, источник гормонов, порода скота, стадия эстрального цикла и т.д. Очень наглядно проблему воспроизводимости результатов иллюстрируют две пилотные работы по АнГII, опубликованные в 1988, 1989 г.г. в журнале "Science" (Pellicer et al., 1988; Daud et al., 1989). В первой работе 1988 г. (Pellicer et al., 1988) было показано, что сараласин (рецепторный антагонист АнГII) вполнину уменьшает число ооцитов, найденных в фаллопиевой трубе незрелых крыс через 17-20 ч. после введения хорионического гонадотропина человека (хГч). Одновременное введение АнГII делало обратимой блокаду овуляции сараласином.

Авторы второй работы (Daud et al., 1989) полностью воспроизвели экспериментальный протокол Pellicer et al. (1988) и, по контрасту с 50% снижением в числе яйцеклеток, о котором сообщал Pellicer et al. (1988), они не наблюдали существенной разницы между числом яйцеклеток в яйцеводах, инъецированных физиологическим раствором контрольных крыс 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 гонадотропином сыворотки жеребых кобыл, ГСЖК), одинаковую дозу (100 мкл 1мМ р-ра) антагониста, одинаковый путь введения (внутрибрюшинный) и время (1 ч. перед хГч инъекцией) введения антагониста АнГII рецепторов и точно такие же дозы и интервалы гонадотропных обработок, как и у Pellicer et al. (1988), несовпадение результатов не может быть объяснено этими факторами.

После того, как Pellicer et al. (1988) прочли Daud's (1989) комментарий, они повторили свои же эксперименты и в восьми повторах из десяти не было статистически значимых различий между группами, то есть авторы не смогли воспроизвести свои собственные результаты. Дальнейшие исследования выявили, что за разногласия в результатах может быть в ответе вариабельность биологически полученных гормонов (ГСЖК и хГч). Применяв другой препарат хГч, Pellicer et al. (1988) уже наблюдали статистически значимую разницу между числом ооцитов в яйцеводах контрольных животных и крыс, обработанных сараласином.

Возможно, что и наши данные также не совпадают с данными Giometti et al. (2005) и Stefanello et al. (2006) из-за разницы в качестве используемых составляющих культуральной системы.

С другой стороны, в исследованиях Li et al. (2004), проведенных на свиньях, установлено, что когда ооциты из фолликулов различного диаметра были культивированы в безбелковой среде с гормонами, содержащей различные концентрации АнГII (10, 100 и 1000 ng/ml) существенно более высокая пропорция ооцитов ($P < 0,05$) достигала стадии МII в среде со 100 ng/ml (87%), чем без АнГII (61%). При адекватных концентрациях, АнГII стимулирует ядерное созревание ооцитов *in vitro*. Однако, повышенные концентрации (1000 ng/ml) не оказывают эффекта на ядерное созревание.

Во второй серии наших экспериментов исследовали влияние АнГII в концентрации 10^{-7} М на цитоплазматическое созревание ооцитов в среде с гормонами, критерием которого являлось развитие эмбрионов до преимплантационных стадий. Не было выявлено разницы

между контрольной и опытной группой ни по проценту первоначального дробления (53,6% vs 52,9%), ни по проценту эмбрионов, достигших стадии морулы/бластоцисты (17,6% vs 15,7%).

В исследованиях Li et al. (2004), однако, показано, что оплодотворяемость и процент формирования мужского пронуклеуса ооцитов, созревших в среде, содержащей 100 или 1000 ng/ml АнгII, были значительно выше ($P < 0,05$), чем у ооцитов, созревавших в среде, содержащих 0 или 10 ng/ml АнгII. Содержание глутатиона в ооцитах, культивированных в течение 44 ч. в среде, содержащей 100 или 1000 ng/ml АнгII было также выше ($P < 0,01$), чем в ооцитах, культивированных в среде, содержащей 0 или 10 ng/ml АнгII. Формирование мужского пронуклеуса после оплодотворения *in vitro* и внутриклеточное содержание глутатиона в ооцитах – это два очень важных критерия цитоплазматического созревания у многих животных, особенно у свиней. Таким образом, АнгII в концентрации 100 ng/ml стимулирует ядерное и цитоплазматическое созревание ооцитов свиней. Однако, механизм его действия до конца неясен.

Stefanello et al. (2006) подробно исследовали влияние АнгII на цитоплазматическое созревание ооцитов КРС, критерием которого являлось развитие до преимплантационных стадий вплоть до вылупления бластоцист. Явным недостатком этой серии экспериментов являлось наличие в среде созревания 10% фетальной сыворотки, являющейся неопределённым фактором. В качестве контроля использовали среду без фолликулярных клеток. В опытной группе ооциты культивировали в течение разных временных промежутков в среде только с фолликулярными клетками или с добавлением АнгII. Показано, что АнгII полностью нивелирует ингибирующее действие фолликулярных клеток, когда они совместно добавлялись в культуру в течение 1 ч. и в течение 12 ч.. Если же фолликулярные клетки присутствовали в культуре в течение 24 ч., АнгII не отменял полностью их ингибирующее действие (он повышал существенно процент бластоцист, но вылупление было хуже, чем в контроле без клеток). В дополнительной серии экспериментов, в которых авторы заменили сыворотку в среде созревания на белок, было показано, что АнгII также полностью нивелирует ингибирующее действие фолликулярных клеток, когда они совместно добавлялись в культуру в течение 12 ч.

Таким образом, вопрос об использовании АнгII в качестве возможной составляющей культуральных сред, остаётся открытым. Необходимы дальнейшие исследования в отношении механизмов, посредством которых АнгII стимулирует созревание ооцитов у млекопитающих.

Следует отметить, что среди некоторых групп активных составляющих, действующих на РАС, могут быть некоторые, подходящие для создания новых контрацептивных средств. Если пациентки ЭКО принимают гипотензивные средства на основе ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, то это, вероятно, может сказываться на созревании яйцеклеток.

Благодарности

Выражаю благодарность ведущему эмбриологу Татариневой Людмиле Викторовне за активное участие в проведении экспериментов.

Список литературы

1. Кривохарченко А.С., Сметанина И.Г., Татаринова Л.В. Оплодотворение и последующее развитие ооцитов крупного рогатого скота после сокращенной инкубации со сперматозоидами. // Онтогенез. 2001. № 32. С. 283-287.

2. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. // Онтогенез. 2000. № 31. С. 139-143.
3. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе. // Онтогенез. 2006. № 37. С. 438-443.
4. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. № 157. С. 655-658.
5. 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. Vol. 61. P. 1419-1425.
6. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. // Biol. Reprod. 1983. Vol. 28. P. 235-247.
7. Brunswig - Spickenheier B., Mukhopadhyay A.K. Characterization of angiotensin II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. // Endocrinology. 1992. Vol. 131. P. 1445-1452.
8. Cornwallis C.M., Skinner S.L., Nayudu P.L. et al. Follicular fluid renin concentration and IVF outcome. // Hum. Reprod. 1990. Vol. 5. P. 413-417.
9. Daud A.I., Bumpus F.M., Husain A. Angiotensin II – does it have a direct obligate role in ovulation? // Science. 1989. Vol. 245. P. 870-871.
10. Giometti J.C., Bertagnolli A.C., Ornes R.C. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. // Theriogenology. 2005. Vol. 63. P. 1014-1025.
11. 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. Vol. 72. P. 165-171.
12. Kuji N, Sueoka K, Miyazaki T. et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. // Biol. Reprod. 1996. Vol. 55. P. 984-991.
13. Lightman A., Tartatzis B.C., Rzasa P.J. et al. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and un-stimulated human follicular fluid. // Am. J. Obstet. Gynecol. 1987. Vol. 156. P. 808-816.
14. 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. Vol. 61. P. 447-459.
15. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried- Rutledge M.L. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. // Theriogenology. 1986. Vol. 25. P. 591-600.
16. 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. Vol. 24. P. 237-249.
17. Pellicer A., Palumbo A., DeCherney A.H., Naftolin F. Blockade of ovulation by an angiotensin antagonist. // Science. 1988. Vol. 240. P. 1660-1661.
18. Portela V.M., Goncalves P.B.D., Veiga A.M. et al. Regulation of angiotensin type2 receptor in bovine granulosa cells. // Endocrinology. 2008. Vol. 149. P. 5004-5011.
19. 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. Vol. 65. P. 1672-1680.
20. 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. Vol. 53. P. 655-662.
21. 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. Vol. 66. P. 2068-2076.
22. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. // J. Reprod. Fertil. 1972. Vol. 30. P. 493-497.
23. Yamada T., Horiuchi M., Dzau V.J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 156-160.

24. Yoshimura Y., Karube M., Aoki H. et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. // *Endocrinology* 1996. Vol. 137. P. 1204-1211.
25. Yoshimura Y., Koyama N., Karube M. et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 93. P. 180-187. .

References (for publications in Russian)

1. Krivokharchenko A.S., Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [Fertilization and subsequent development of cattle oocytes after shortened incubation with spermatozoa]. *Ontogenez (Ontogenesis)*. 2001. 32: 283-287.
2. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Influence of the composition of culture media on the maturation of oocytes and the development of bovine embryos in vitro]. *Ontogenez (Ontogenesis)*. 2000. 31: 39-143.
3. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Fertilization of cattle oocytes in vitro in a protein-free culture system]. *Ontogenez (Ontogenesis)*. 2006. 37: 438-443.
4. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [The influence of hormones on the maturation of cattle oocytes in vitro]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny (Bulletin of Experimental Biology and Medicine)*. 2014. 157: 655-658.

UDC 636.2.054:591.465:12:59.085

**Study of the influence of angiotensin II
on the maturation of cattle oocytes *in vitro***

Smetanina I. G.

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

ABSTRACT. The renin-angiotensin system (RAS), which includes angiotensin II (AngII) and its receptors, is known for its role in the ovary, but wide species variations make it difficult to understand its physiological functions. The aim of this work is to study the effect of AngII on bovine oocyte maturation *in vitro* in a protein-free MEM-alfa medium containing or without hormones has been studied. The criterion of successful maturation was the ability of oocytes to reach the stage of metaphase II (MII) or the ability of oocytes to develop to the stage of morula-blastocyst after fertilization. In the first series of experiments, bovine oocytes were matured *in vitro* in a hormone-containing medium with three different concentrations of AngII (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M) and with a hormone-free environment, where AngII was added to a concentration of 10^{-7} M. Our results show that AngII in concentrations 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M does not affect the nuclear maturation of oocytes *in vitro*, if hormones are added to the medium (57,1% in control vs 64,6% in the experiment; 60,8% vs 58,6%; 65,2% vs 66,7%, respectively.) However, if hormones were not added to the maturation medium, AngII at a concentration of 10^{-7} M significantly inhibited the release of the first polar body (43,6% in control vs 29,3% in the experiment, $P < 0,05$). This allows us to make a preliminary conclusion that hormones neutralize the inhibitory effect of AngII on nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*. In the second series of experiments, the effect of AngII at a concentration of 10^{-7} M on the cytoplasmic maturation of oocytes in a medium with hormones, the criterion of which was the development of embryos before preimplantation stages, has been investigated. There was no difference between the control group and the experimental group by the percentage of initial cleavage (53,6% vs 52,9%), nor the percentage of embryos that have reached the stage of morula-blastocysts (17,6% vs 15,7%). Thus, the question of Ang II as a possible component of culture media remains open. Concluded that there is a need to continue research on the role of Ang II in the regulation of oocyte maturation in mammals.

Ключевые слова: ооциты коров, созревание *in vitro*, ангиотензин II.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2025. 1: 40-49.

Поступило в редакцию: 27.12.2024

Получено после доработки: 20.03.2025

Сведения об авторах:

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