

Ukraine, 76000, Ivano-Frankivsk, 2 Galytska str. / Адреса: Україна, 76000, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька 2
Tel.: +380505156031 / Тел.: +380505156031
E-mail: markianprijsma91@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 23.07.2025 / Стаття надійшла 23.07.2025 року
Accepted 12.11.2025 / Стаття прийнята до друку 12.11.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-194-201

UDC 616-092.9:618.173-06:616.379-008.64+616.61-002.2

Sribna V. O., Lytvynenko A. P., Kaleynikova O. M., Voznesenska T. Yu., Blashkiv T. V.

EXPERIMENTAL MODEL OF PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY: COMORBIDITY OF DIABETES MELLITUS AND CHRONIC KIDNEY DISEASE

Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

valia-z@ukr.net

Premature ovarian failure (POF) is a pathological condition characterized by decreased ovarian reserve and impaired folliculogenesis in women under 40 years of age. Modern experimental models of POF, in particular those induced by cyclophosphamide, busulfan, or D-galactose, primarily reflect local toxic damage to the gonads and do not account for systemic metabolic changes inherent to chronic diseases. The aim of the work was to study the parameters of meiotic maturation and morphological quality of oocytes, as well as the pathways of cell death in their follicular environment under the comorbid effects of diabetes mellitus (DM) and chronic kidney disease (CKD) to create a comprehensive, biologically relevant experimental model of POF. The studies were conducted using sexually mature white laboratory mice divided into three groups: control, DM, and DM+CKD. The diabetes model was reproduced by the administration of streptozotocin and nicotinamide, CKD - by repeated immunization with renal antigen. The viability of cells in the follicular environment of oocytes was assessed by the method of in vivo double staining with fluorescent dyes, and the meiotic maturation of oocytes and their quality – by morphological criteria. The results obtained indicate that the combined pathology of DM and CKD leads to a pronounced impairment of ovarian function, an increase in the proportion of cells with signs of apoptosis and necrosis, a decrease in the morphological quality of oocytes and a violation of meiotic maturation of oocytes at the stage of metaphase I and II. The developed POF model adequately reflects the influence of metabolic and systemic changes and can be effectively used for further study of the mechanisms of ovarian damage and testing new approaches to preserving reproductive function.

Key words: premature ovarian insufficiency, comorbidity, diabetes mellitus, chronic kidney disease, oocytes.

Connection of the publication with planned research work.

The article was carried out within the framework of scientific work No. III-1-24 “Mechanisms and ways of correcting regulated cell death of the immune (thymus and lymph nodes) and reproductive (ovaries and testicles) systems”, state registration number 0124U001370.

Introduction.

Premature ovarian failure (POF) is a condition characterized by diminished ovarian reserve, impaired follicular function, and poor oocyte quality in women under 40 years of age. The prevalence of POF is estimated at 1-3%, and a recent meta-analysis suggests a global prevalence of 3.7% [1]. POF has significant reproductive, metabolic, psychosocial, and long-term somatic consequences (cardiovascular, bone, cognitive) [2-4].

Type 2 diabetes mellitus (DM) and chronic kidney disease (CKD) are two common chronic diseases that often coexist (comorbid) and cause systemic changes: oxidative stress, microcirculatory disorders, chronic inflammation, and metabolic dysfunction [5, 6]. These factors can affect ovarian function. However, existing experimental models of POF typically treat it as an isolated pathology, failing to account for the systemic impact of comorbid conditions. To date, the literature lacks an adequate in vivo model of POF that reproduces the pathogenesis of ovarian dys-

function in the setting of comorbid diabetes and CKD. Existing approaches (using cyclophosphamide, busulfan, VCD or D-galactose) allow for reproducing only, as a rule, direct damage to the ovary – and do not take into account the systemic metabolic impact [7-9].

The aim of the study.

Study of parameters of meiotic maturation of oocytes, oocyte quality, as well as pathways of cell death of their follicular environment under conditions of comorbidity of diabetes mellitus and chronic kidney disease to create a complex, biologically relevant experimental model of premature ovarian failure (POF) in conditions of this comorbidity. Such a model will allow to determine multifactorial mechanisms of damage to ovarian cells in conditions of combined pathology and may become the basis for searching for strategies to preserve reproductive function in patients with systemic diseases.

Object and research methods.

The study was conducted on non-pregnant, sexually mature female white laboratory mice weighing 19-22 g in compliance with all requirements for working with animals (Council of Europe Convention for the Protection of Vertebrate Animals, 1986, EU Directive No. 609, 1986, Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 66, 2006, Law of Ukraine “On the Protection of Animals from Cruelty” No. 3447-IV, 2006). The animals were divided into 3

groups of 6 individuals each: I – control, II – group of diabetes mellitus, III – group of combined diabetes mellitus and chronic kidney disease (experimental model of POF).

Experimental diabetes mellitus in mice was modeled by intraperitoneal administration of nicotinamide and streptozotocin according to the following scheme: Nicotinamide 120 mg/kg (Sigma-Aldrich, USA) intraperitoneally once, after 15 min Streptozotocin 65 mg/kg (Sigma-Aldrich, USA) intraperitoneally once. Glucose levels were assessed after 2 weeks (on the day of animal collection) [10]. The average fasting blood glucose level was 10.37 ± 1.69 mmol, and in the control group – 5.0 ± 0.28 mmol/l.

Chronic kidney disease was modeled by immunizing first-generation mice with a suspension of the maternally derived kidney antigen. Immunization of animals was performed according to the following scheme: three times intraperitoneally – once a day with an interval between immunizations of 1 day; repeated immunization was performed after 3 weeks once at the same dose [11].

When reproducing the POF experimental model, injections of nicotinamide and streptozotocin were administered 1 week after the 3rd injection of kidney homogenate. Glucose levels were assessed after 2 weeks (on the day of animal collection). The average fasting blood glucose level was 14.8 ± 1.41 mmol/l, in the control – 5.0 ± 0.28 mmol/l.

Oocyte cultivation. Oocytes were isolated from mouse ovaries non-enzymatically, and morphological assessment of the state of the germinal vesicle, perivitelline space, and cytoplasm (its density, signs of fragmentation, degeneration, and degree of granulation) was performed under an MBS-10 microscope. Oocytes were subsequently distributed into separate chambers, 10-15 pcs. in each. All control and experimental oocytes were cultured under the same conditions (in a sterile box, in chambers containing 0.4 ml of DME culture medium and 15 mM HEPES, with a Ca^{2+} concentration of 1.71 mM, at 37°C for 20 hours). After 2 hours of cultivation, oocytes (% of the total number) that were at the Metaphase I stage were counted, and after 20 hours – at the Metaphase II stage.

The pathways of cell death in the follicular environment of oocytes were studied using in vivo double staining with the fluorescent nucleic acid dyes Hoechst 33342 and propidium iodide [12]. Morphological studies were performed on a fluorescent microscope using a water-immersion objective with a magnification of $\times 85$. The relative numbers of live and apoptotic cells, as well as cells with signs of necrosis, were determined in samples of ≥ 200 cells (%).

Statistical processing of the results was performed using the Graph Pad Prism package version 5.00 for Windows (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). The normality of the data distribution was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. In the case of normal distribution, the comparison of two groups was performed using the

Student's t-test; For larger groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by comparison of mean values between groups using the Newman-Keuls post hoc test. Statistical significance was considered at a level of $p < 0.05$.

Research results and their discussion.

When simulating experimental diabetes, a significant decrease in OFC cell viability parameters is observed. In particular, the proportion of live cells decreases to $50.83 \pm 1.57\%$ ($p < 0.001$) compared to $80.67 \pm 2.50\%$ in the control group. At the same time, the proportion of cells with signs of apoptosis increases to $35.25 \pm 1.11\%$ ($p < 0.001$) compared to $11.08 \pm 1.39\%$ in the control, and with signs of necrosis – to $13.92 \pm 2.29\%$ ($p < 0.05$) compared to $8.25 \pm 1.92\%$ in the control. When experimental DM is combined with CKD, OFC cell viability is inhibited: the proportion of live cells decreases to $38.67 \pm 1.66\%$ ($p < 0.05$) compared to $50.83 \pm 1.57\%$ in the DM group. The proportions of cells with morphological signs of apoptosis and necrosis increase, respectively, to $40.17 \pm 1.51\%$ ($p < 0.001$) and $21.17 \pm 1.69\%$ ($p < 0.01$) compared to $35.25 \pm 1.11\%$ and $13.92 \pm 2.29\%$ in the experimental DM group, respectively (**fig. 1**).

In the experimental groups of animals, a significant deterioration in the morphological quality of oocytes is noted: 1) under conditions of experimental diabetes, the proportion of cells with normal morphology decreases by 1.4 times ($p < 0.01$), while the proportion of atypical oocytes increases by almost 3 times ($p < 0.01$); 2) under the combined influence of diabetes and CKD, the proportion of morphologically normal oocytes decreases even more, by 1.6 times ($p < 0.01$) compared to the control, and the proportion of cells with atypical morphology increases by almost 4 times ($p < 0.01$) (**table**).

In animals with experimental diabetes mellitus, the proportion of oocytes that reached metaphase I decreases to $56.16 \pm 2.01\%$ ($p < 0.01$) compared to $78.50 \pm 2.46\%$ in the control group. The proportion of oocytes in metaphase II is $40.81 \pm 1.81\%$ ($p < 0.05$), which is also lower than the control $58.39 \pm 3.79\%$. In the combination of diabetes and chronic kidney disease, there is a suppression of the parameters of meiotic maturation of oocytes, the proportion of cells that dissolved the germinal vesicle and formed the first polar body decreases to, respec-

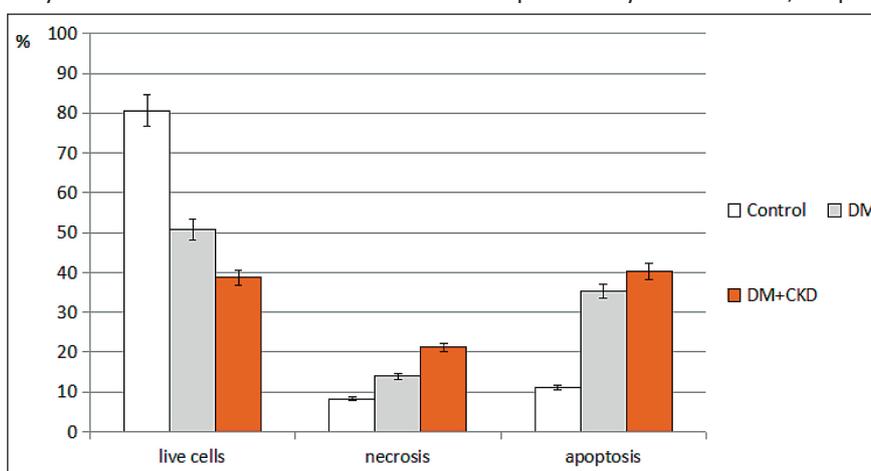


Figure 1 – Viability parameters of follicular cell environment of oocytes under conditions of modeling of chronic kidney disease and experimental diabetes mellitus ($M \pm m$).
 Notes: *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ – probability of differences in the values of the average data groups relative to such values in the control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – probability of differences in the values of the average data groups relative to such values under conditions of diabetes.

Table – Oocyte quality indicators under conditions of experimental diabetes and CKD modeling (M±m)

Group of animals	Normal morphology, %	Atypical morphology, %
Control, n=12	88.91±1.47	11.09±1.47
DM, n=12	65.40±2.35**	34.60±2.35**
EAI + DM, n=12	56.59±2.79** #	43.41±2.79** #

Notes: ** p<0.01, # p<0.05 – probability of differences in the values of the average data groups relative to such values in the control group; n – number of independent repetitions.

tively, 44.92±1.84% and 31.00±2.03%, both values are significantly lower in comparison with both the control (p<0.01) and the experimental diabetes group (p<0.05) (fig. 2).

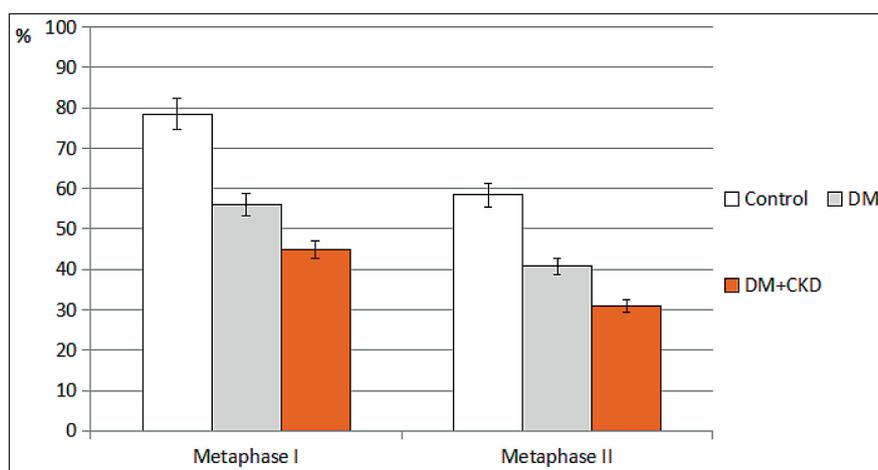


Figure 2 – Indicators of meiotic maturation of oocytes – dissolution of the germinal vesicle (metaphase I) and formation of the first polar body (metaphase II) under conditions of modeling chronic kidney disease and experimental diabetes mellitus (M±m).

Notes: ** p<0.01, * p<0.05 – probability of differences in the values of the average data groups relative to such values in the control group; # p<0.05, – probability of differences in the values of the average data groups relative to such values under conditions of diabetes; n – number of independent repetitions.

Previously described experimental models of PNA – induced by cyclophosphamide, busulfan, 4-vinylcyclohexene dioxide (VCD) or D-galactose – reproduce mainly direct toxic damage to the ovaries by inducing oxidative stress or cytotoxic effects on follicular cells [7, 8]. However, such models do not take into account the systemic nature of the damage observed in women with chronic metabolic and somatic diseases. In contrast, the model we developed, combining experimental DM and CKD, more adequately approximates the real clinical conditions of comorbidity.

Chronic hyperglycemia causes excessive formation of reactive oxygen species, activation of the NF-κB signaling pathway and imbalance between proapoptotic (Bax) and antiapoptotic (Bcl-2) proteins, which leads to the release of cytochrome c, activation of caspase-3 and structural destruction of oocytes. These processes are accompanied by increased expression of proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β), which enhance cell death in the follicular microenvironment. Similar mechanisms of oxidative and inflammatory stress in ovarian cells have been described in metabolic disorders, in particular in diabetes and PCOS [13-15]. In addition, clinical observations of women with diabetes demonstrate a decrease in the level of anti-Müllerian hormone (AMH), which reflects a

decrease in ovarian reserve, reduced oocyte quality and impaired reproductive outcomes [16, 17].

The additional impact of CKD is associated with oxidative stress, uremic intoxication, microcirculatory disorders and systemic inflammation, which together form an unfavorable environment for oocyte maturation and maintenance of ovarian function. All this leads to menstrual disorders, anovulation, reduced fertility, problems with pregnancy, premature birth and fetal growth restriction [18].

The changes in ovarian function we have identified, namely the deterioration of the morphological quality of oocytes (presence of granular cytoplasm, fragmentation) and a decrease in the proportion of oocytes that

have reached metaphase I and II, indicate the activation of degenerative processes, impaired meiotic maturation and a decrease in the functional fullness of gametes, which directly affects fertility. Our results are consistent with current data that the combination of metabolic disorders caused by hyperglycemia and systemic changes associated with CKD are key factors in the development of ovarian dysfunction in comorbid conditions [5, 6, 13, 18]. The experimental model of POF we have developed is a pathogenetically justified and reproducible system that can be effectively used to further study the mechanisms of ovarian damage, search for biomarkers of dysfunction and evaluate potential corrective approaches.

Conclusions.

The obtained results demonstrate that the combination of experimental diabetes mellitus and chronic kidney disease significantly increases the impairment of ovarian function in mice compared to the isolated model of diabetes. This is manifested by a significant decrease in the viability of cells in the oocyte follicular environment, a decrease in the proportion of live cells, an increase in the number of cells with signs of apoptosis and necrosis, inhibition of oocyte meiotic maturation, and deterioration of their morphological quality. The obtained data confirm that the model of premature ovarian failure created by us, based on the combination of diabetes mellitus and chronic kidney disease, reproduces the characteristic pathogenetic changes inherent in this condition. It reflects not only local damage to the ovaries but also systemic metabolic and inflammatory effects, which brings it closer to the clinical picture in women with chronic comorbid pathology. The results obtained can serve as a basis for further study of the pathogenetic mechanisms of ovarian dysfunction and development of strategies for preserving fertility - pharmacological, antioxidant, or cell-oriented approaches.

Prospects for further research.

Our next step will be to evaluate the effectiveness of antioxidants, sirtuin modulators, and PARP1 in preventing and restoring ovarian function using this model.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-194-201

УДК 616-092.9:618.173-06:616.379-008.64+616.61-002.2

Срібна В. О., Литвиненко А. П., Калейнікова О. М., Вознесенська Т. Ю., Блашків Т. В.

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ:
КОМОРБІДНІСТЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК**

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України (м. Київ, Україна)

valia-z@ukr.net

Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) є патологічним станом, що характеризується зниженням оваріального резерву та порушенням фолікулогенезу у жінок до 40 років. Сучасні експериментальні моделі ПНЯ, зокрема індуковані циклофосфамідом, бускульфаном чи D-галактозою, відображають переважно локальне токсичне ураження гонад і не враховують системних метаболічних змін, властивих хронічним захворюванням. Метою роботи було дослідження параметрів мейотичного дозрівання та морфологічної якості ооцитів, а також шляхів загибелі клітин їх фолікулярного оточення за умов коморбідного впливу цукрового діабету (ЦД) і хронічної хвороби нирок (ХХН) для створення комплексної, біологічно релевантної експериментальної моделі ПНЯ. Дослідження проведені з використанням статевозрілих білих лабораторних мишей, розділених на три групи: контрольну, ЦД та ЦД+ХХН. Модель діабету відтворювали введенням стрептозотоцину і нікотинаміду, ХХН – повторною імунізацією нирковим антигеном. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів оцінювали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками, а мейотичне дозрівання ооцитів та їх якість – за морфологічними критеріями. Отримані результати свідчать, що поєднана патологія ЦД і ХХН призводить до вираженого порушення оваріальної функції, збільшення частки клітин із ознаками апоптозу та некрозу, зниження морфологічної якості ооцитів і порушенням мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I та II. Розроблена модель ПНЯ адекватно відображає вплив метаболічних і системних змін і може бути ефективно використана для подальшого вивчення механізмів ураження яєчників та тестування нових підходів до збереження репродуктивної функції.

Ключові слова: передчасна недостатність яєчників, коморбідність цукровий діабет, хронічна хвороба нирок, ооцити.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Стаття виконувалась в межах наукової роботи № III-1-24 «Механізми та шляхи корекції регульованої загибелі клітин імунної (тимуса і лімфатичних вузлів) та репродуктивної (яєчників і сім'яників) систем», номер державної реєстрації 0124U001370.

Вступ.

Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) – це стан, що характеризується зменшенням оваріального резерву, порушенням функцій фолікулів і низькою якістю ооцитів у жінок віком до 40 років. Рівень поширеності ПНЯ оцінюється у 1-3%, а нещодавній мета-аналіз вказує що глобальний показник сягає вже 3,7%[1]. ПНЯ має значні репродуктивні, метаболічні, психосоціальні та довгострокові соматичні наслідки (серцево-судинні, кісткові, когнітивні) [2-4].

Цукровий діабет 2 типу (ЦД) та хронічна хвороба нирок (ХХН) – це два поширених хронічних захворювання, що часто перебігають одночасно (коморбідно) та викликають системні зміни: оксидативний стрес, порушення мікроциркуляції, хронічне запалення, метаболічну дисфункцію [5, 6]. Ці фактори потенційно впливають на оваріальну функцію. Проте, існуючі експериментальні моделі ПНЯ зазвичай репрезентують її як ізольовану патологію, не враховуючи системного впливу таких коморбідних станів. На сьогодні в літературі бракує адекватної *in vivo* моделі ПНЯ, що відтворює патогенез оваріальної дисфункції в умовах коморбідного ЦД і ХХН. Наявні підходи (використання циклофосфаміду, бускульфану, VCD або D-галактози) дозволяють відтворити лише як правило, пряме

пошкодження яєчника – і не враховують системного метаболічного впливу [7-9].

Мета дослідження.

Дослідження параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, якості ооцитів, а також шляхів загибелі клітин їх фолікулярного оточення за умов коморбідного впливу цукрового діабету і хронічної хвороби нирок для створення комплексної, біологічно релевантної експериментальної моделі передчасної недостатності яєчників (ПНЯ) в умовах цієї коморбідності. Така модель дозволить визначити мультифакторні механізми ушкодження клітин яєчника в умовах поєднаної патології та може стати основою для пошуку стратегій збереження репродуктивної функції в пацієнток із системними захворюваннями.

Об'єкт і методи дослідження.

Дослідження проведені на невагітних статевозрілих самицях білих лабораторних мишей масою 19-22 г із дотриманням усіх вимог щодо роботи з тваринами (Конвенція Ради Європи про охорону хребетних тварин, 1986 р., Директиви ЄС №609,1986 р., Наказ МОЗ України №66, 2006 р., Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, 2006 р.). Тварин було розділено на 3 групи по 6 особин у кожній: I – контрольна, II – група цукрового діабету, III – група поєданого цукрового діабету і хронічної хвороби нирок (експериментальна модель ПНЯ).

Експериментальний цукровий діабет у мишей моделювали шляхом внутрішньочерного введення нікотинаміду і стрептозотоцину за наступною схемою: Нікотинамід 120 мг/кг (Sigma-Aldrich, USA) внутрішньочеревинно однократно, через 15 хв Стрептозотин 65мг/кг (Sigma-Aldrich, USA) внутрішньочере-

винно однократно. Рівень глюкози оцінювали через 2 тижні (в день забору тварин) [10]. Середній рівень глюкози крові натщесерце становив $10,37 \pm 1,69$ ммоль, а в контролі – $5,0 \pm 0,28$ ммоль/л.

Хронічну хворобу нирок моделювали за допомогою імунізації мишей I покоління суспензією антигену нирки, отриманої від материнської особи. Імунізацію тварин проводили за наступною схемою: триразове внутрішньочеревне – 1 раз на добу з інтервалом між імунізацією в 1 день; повторно імунізацію проводили через 3 тижні одноразово у тій самій дозі [11].

При відтворенні експериментальної моделі ПНЯ ін'єкції нікотинаміду і стрептозоточину проводили через тиждень після 3-ї ін'єкції гомогенату нирки. Рівень глюкози оцінювали через 2 тижні (в день забору тварин). Середній рівень глюкози крові натщесерце становив $14,8 \pm 1,41$ ммоль/л, в контролі – $5,0 \pm 0,28$ ммоль/л.

Культивування ооцитів. З яєчників мишей неферментативно виділяли ооцити і проводили морфологічну оцінку стану зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми (її щільність, ознаки фрагментації, дегенерації та ступінь гранульованості) під мікроскопом МБС-10 з наступним їх розподілом в окремі камери, по 10-15 шт. у кожній. Усі контрольні та експериментальні ооцити культивували за однакових умов (у стерильному боксі, у камері із 0,4 мл культурального середовища DME та 15 мМ NERES, концентрацією Ca^{2+} 1,71 мМ, при температурі 37°C протягом 20 годин). Після 2 год культивування підраховували ооцити (% до загальної кількості), що пере-

бували на стадії Метафази I, а після 20 год – на стадії Метафази II.

Шляхи клітинної загибелі фолікулярного оточення ооцитів вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 та Йодид пропідіуму [12]. Морфологічні дослідження проводили на флуоресцентному мікроскопі з використанням водо-іммерсійного об'єктива із збільшенням $\times 85$. Визначали у (%) відносну кількість живих та апоптотичних клітин, а також клітин з ознаками некрозу у вибірках ≥ 200 клітин.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету Graph Pad Prism версії 5.00 для Windows (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Перевірку нормальності розподілу даних здійснювали за критерієм Колмогорова-Смирнова. При нормальному розподілі порівняння двох груп виконували за t-критерієм Стьюдента; для більшої кількості груп застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з подальшим порівнянням середніх значень між групами за допомогою пост-хок тесту Ньюмана-Кейлса. Статистично значущим вважали рівень $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

При моделюванні експериментального ЦД спостерігається достовірне зниження параметрів життєздатності клітин ФОО. Зокрема, частка живих клітин зменшується до $50,83 \pm 1,57\%$ ($p < 0,001$) порівняно з $80,67 \pm 2,50\%$ у контрольній групі. Одночасно, частка клітин з ознаками апоптозу підвищується до $35,25 \pm 1,11\%$ ($p < 0,001$) у порівнянні з $11,08 \pm 1,39\%$ у контролі, а з ознаками некрозу – до $13,92 \pm 2,29\%$ ($p < 0,05$) відносно $8,25 \pm 1,92\%$ у контролі. При поєднанні експериментального ЦД з ХХН відмічається пригнічення життєздатності клітин ФОО: частка живих клітин зменшується до $38,67 \pm 1,66\%$ ($p < 0,05$) порівняно з $50,83 \pm 1,57\%$ у групі ЦД. Частки клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу зростають, відповідно до $40,17 \pm 1,51\%$ ($p < 0,001$) та $21,17 \pm 1,69\%$ ($p < 0,01$) порівняно з $35,25 \pm 1,11\%$ та $13,92 \pm 2,29\%$ в групі експериментального ЦД, відповідно (рис. 1).

В експериментальних групах тварин відмічається суттєве погіршення морфологічної

якості ооцитів: 1) в умовах експериментального ЦД частка клітин з нормальною морфологією зменшується у 1,4 раза ($p < 0,01$), тоді як частка атипових ооцитів збільшується майже в 3 рази ($p < 0,01$); 2) при комбінованому впливі ЦД та ХХН частка морфологічно нормальних ооцитів знижується ще більше, – в 1,6 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем, а частка клітин з атиповою морфологією зростає майже в 4 рази ($p < 0,01$) (таблиця).

У тварин з експериментальним цукровим діабетом частка ооцитів, що досягли метафази I, зменшу-

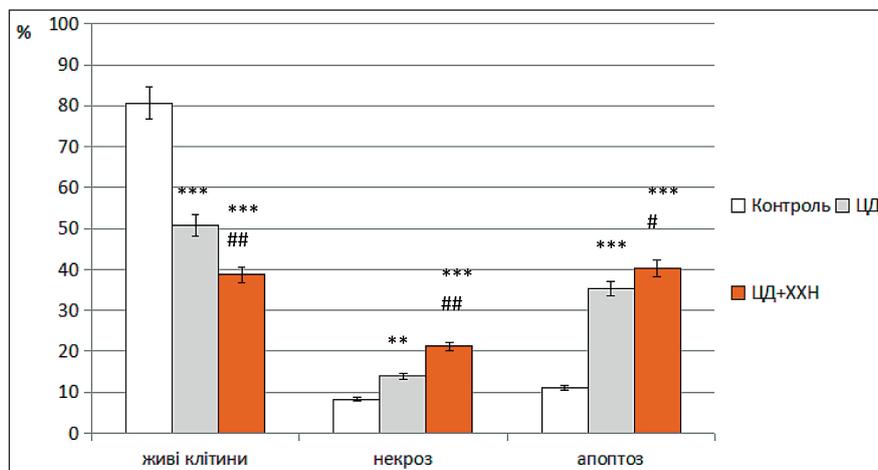


Рисунок 1 – Параметри життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів за умов моделювання хронічної хвороби нирок та експериментального цукрового діабету ($M \pm m$).

Примітки: *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин за умов ЦД.

Таблиця – Показники якості ооцитів за умов моделювання експериментального ЦД та ХХН ($M \pm m$)

Група тварин	Нормальна морфологія, %	Атипова морфологія, %
Контроль, n=12	88.91 ± 1.47	11.09 ± 1.47
ЦД, n=12	$65.40 \pm 2.35^{**}$	$34.60 \pm 2.35^{**}$
ЕСАУ + ЦД, n=12	$56.59 \pm 2.79^{** \#}$	$43.41 \pm 2.79^{** \#}$

Примітки: ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; n – кількість незалежних повторів.

ється до $56,16 \pm 2,01\%$ ($p < 0,01$) порівняно з $78,50 \pm 2,46\%$ у контрольній групі. Частка ооцитів у метафазі II становить $40,81 \pm 1,81\%$ ($p < 0,05$), що також нижче від контролю $58,39 \pm 3,79\%$. При поєднанні ЦД та хронічної хвороби нирок відмічається пригнічення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, частки клітин, що розчинила зародковий пухирець та сформувала перше полярне тільце знижується до, відповідно, $44,92 \pm 1,84\%$ та $31,00 \pm 2,03\%$, обидва значення достовірно нижчі як у порівнянні з контролем ($p < 0,01$), так і з групою експериментального ЦД ($p < 0,05$) (рис. 2).

Раніше описані експериментальні моделі ПНЯ – індуковані циклофосфамідом, бусульфамом, 4-вінілциклооксен діоксидом (VCD) або D-галактозою – відтворюють переважно пряме токсичне пошкодження яєчників шляхом індукції оксидативного стресу чи цитотоксичної дії на фолікулярні клітини [7, 8]. Проте, такі моделі не враховують системний характер ураження, який спостерігається у жінок із хронічними метаболічними та соматичними захворюваннями. Натомість, розроблена нами модель, що поєднує експериментальний ЦД та ХХН, більш адекватно наближається до реальних клінічних умов коморбідності.

Хронічна гіперглікемія спричиняє надмірне утворення реактивних форм кисню, активацію сигнального шляху NF- κ B та дисбаланс між проапоптотичними (Bax) і антиапоптотичними (Bcl-2) білками, що призводить до вивільнення цитохрому c, активації каспази-3 та структурного руйнування ооцитів. Ці процеси супроводжуються підвищеною експресією прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β), які посилюють клітинну загибель у фолікулярному мікрооточенні. Подібні механізми оксидативного та запального стресу в клітинах яєчників описані при метаболічних порушеннях, зокрема при діабеті та PCOS [13-15]. Крім того, клінічні спостереження жінок з цукровим діабетом демонструють зниження рівня антимюллерового гормону (АМН), що відображає зменшення оваріального резерву, зниження якості ооцитів та погіршення репродуктивних результатів [16, 17].

Додатковий вплив ХХН асоціюється з оксидативним стресом, уремичною інтоксикацією, мікроциркуляторними розладами та системним запаленням, що разом формують несприятливе середовище для дозрівання ооцитів і підтримання оваріальної функції. Все це зумовлює порушення менструального циклу, ановуляцію, зниження фертильності, проблеми з виношуванням вагітності, передчасні пологи та обмеження росту плода [18].

Виявлені нами зміни оваріальної функції, а саме погіршення морфологічної якості ооцитів (наявність гранульованої цитоплазми, фрагментація) та зменшення частки ооцитів, що досягли метафазі I та II, – свідчать про активацію дегенеративних процесів,

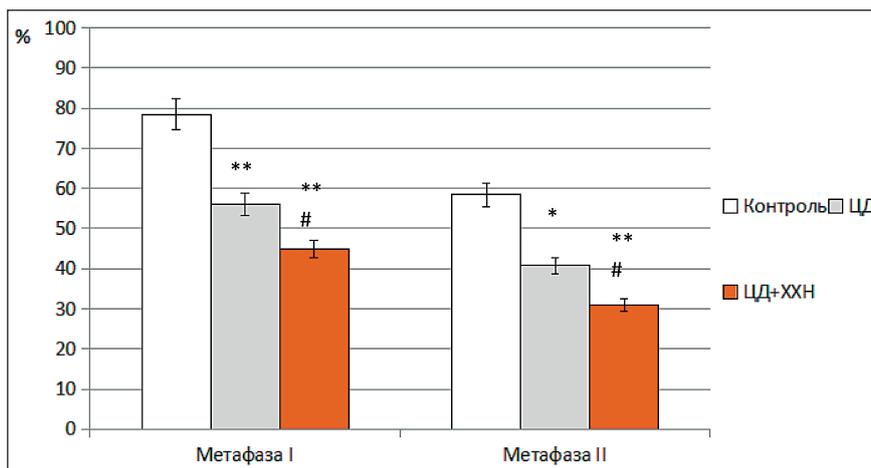


Рисунок 2 – Показники мейотичного дозрівання ооцитів – розчинення зародкового пухирця (метафаза I) і формування першого полярного тільця (метафаза II) за умов моделювання хронічної хвороби нирок та експериментального цукрового діабету (M \pm m).

Примітки: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$, – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин за умов ЦД; n – кількість незалежних повторів.

порушення мейотичного дозрівання та зниження функціональної повноцінності гамет, що безпосередньо впливає на фертильність. Наші результати узгоджуються з сучасними даними про те, що поєднання метаболічних порушень, зумовлених гіперглікемією, та системних змін, пов'язаних з ХХН, є ключовими чинниками розвитку оваріальної дисфункції при коморбідних станах [5, 6, 13, 18]. Розроблена нами експериментальна модель ПНЯ є патогенетично обґрунтованою та відтворюваною системою, яка може бути ефективно використана для подальшого вивчення механізмів ураження яєчників, пошуку біомаркерів дисфункції та оцінки потенційних коригуючих підходів.

Висновки.

Отримані результати демонструють, що поєднання експериментального цукрового діабету та хронічної хвороби нирок значно посилює порушення оваріальної функції у мишей у порівнянні з ізольованою моделлю діабету. Це проявляється суттєвим зниженням показників життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, зменшенням частки живих клітин і підвищенням кількості клітин з ознаками апоптозу та некрозу, пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів і погіршенням їх морфологічної якості. Отримані дані підтверджують, що створена нами модель передчасної недостатності яєчників, заснована на поєднанні цукрового діабету та хронічної хвороби нирок, відтворює характерні патогенетичні зміни, притаманні цьому стану. Вона відображає не лише локальні ушкодження яєчників, але й системний метаболічний та запальний вплив, що наближає її до клінічної картини у жінок із хронічною коморбідною патологією. Отримані результати можуть слугувати основою для подальшого вивчення патогенетичних механізмів оваріальної дисфункції та розробки стратегій збереження фертильності – фармакологічних, антиоксидантних чи клітинно-орієнтованих підходів.

Перспективи подальших досліджень.

Наступним нашим кроком буде оцінка ефективності антиоксидантів, модуляторів сіртуїнів та ПАРП1 у профілактиці порушення та відновленні оваріальної функції з використанням даної моделі.

References / Література

- Li M, Zhu Y, Wei J, Chen L, Chen S, Lai D. The global prevalence of premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Climacteric*. 2023;26(2):95-102. DOI: [10.1080/13697137.2022.2153033](https://doi.org/10.1080/13697137.2022.2153033).
- Panay N, Anderson RA, Binnie A, Cedars M, Davies M, Ee C, et al.; ESHRE, ASRM, CREWHIRL, and IMS Guideline Group on POI. Evidence-based guideline: premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod Open*. 2024;2024(4):hoae065. DOI: [10.1093/hropen/hoae065](https://doi.org/10.1093/hropen/hoae065).
- Jones AR, Enticott J, Ebeling PR, Mishra GD, Teede HT, Vincent AJ. Bone health in women with premature ovarian insufficiency/early menopause: a 23-year longitudinal analysis. *Hum Reprod*. 2024;39(5):1013-1022. DOI: [10.1093/humrep/deae037](https://doi.org/10.1093/humrep/deae037).
- Karamitrou EK, Anagnostis P, Vaitis K, Athanasiadis L, Goulis DG. Early menopause and premature ovarian insufficiency are associated with increased risk of dementia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Maturitas*. 2023;176:107792. DOI: [10.1016/j.maturitas.2023.107792](https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2023.107792).
- Jha JC, Banal C, Chow BS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(12):657-684. DOI: [10.1089/ars.2016.6664](https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664).
- Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:806358. DOI: [10.1155/2015/806358](https://doi.org/10.1155/2015/806358).
- Tang D, Feng X, Ling L, Zhang W, Luo Y, Wang Y, et al. Experimental study for the establishment of a chemotherapy-induced ovarian insufficiency model in rats by using cyclophosphamide combined with busulfan. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021;122:104915. DOI: [10.1016/j.yrtph.2021.104915](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104915).
- Cao LB, Leung CK, Law PW, Lv Y, Ng CH, Liu HB, et al. Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure. *Life Sci*. 2020;262:118543. DOI: [10.1016/j.lfs.2020.118543](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118543).
- Dai F, Wang R, Deng Z, Yang D, Wang L, Wu M, et al. Comparison of the different animal modeling and therapy methods of premature ovarian failure in animal model. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14:135. DOI: [10.1186/s13287-023-03333-4](https://doi.org/10.1186/s13287-023-03333-4).
- Ahangarpour A, Oroojan AA, Khorsandi L, Arzani G, Afshari G. Effects of betulinic acid on the male reproductive system of a streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mouse model. *World J Mens Health*. 2016;34(3):209-216. DOI: [10.5534/wjmh.2016.34.3.209](https://doi.org/10.5534/wjmh.2016.34.3.209).
- Stupchuk MS, Voznesenska TY, Hrushka N, Shepel OD, Dzhanuray BV, Blashkiv TV, vynakhidnyky; Instytut fiziologii im. O.O. Bohomoltsya NANU, patentovlasnyk. Sposib modelyuvannya systemnoho autoimunnogo ushkodzhennya u myshey. Patent Ukrainy № 120418. 2017 Zhovt 25. [in Ukrainian].
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Akao Y, Kosaka H, Hasegawa J, et al. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1996;271(6 Pt 1):G949-G958. DOI: [10.1152/ajpgi.1996.271.6.G949](https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.271.6.G949).
- Liang J, Gao Y, Feng Z, Zhang B, Na Z. Reactive oxygen species and ovarian diseases: antioxidant strategies. *Redox Biol*. 2023;62:102659. DOI: [10.1016/j.redox.2023.102659](https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102659).
- Yan H, Wang L, Zhang G, Li N, Zhao Y, Liu J, et al. Oxidative stress and energy metabolism abnormalities in polycystic ovary syndrome: from mechanisms to therapeutic strategies. *Reprod Biol Endocrinol*. 2024;22:159. DOI: [10.1186/s12958-024-01337-0](https://doi.org/10.1186/s12958-024-01337-0).
- Xue H, Hu Z, Liu S, Zhang S, Yang W, Li J, et al. The mechanism of NF-κB-TERT feedback regulation of granulosa cell apoptosis in PCOS rats. *PLoS One*. 2024;19(10):e0312115. DOI: [10.1371/journal.pone.0312115](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312115).
- Qin X, Du J, He R, Li Y, Zhu Q, Li Y, et al. Adverse effects of type 2 diabetes mellitus on ovarian reserve and pregnancy outcomes during the assisted reproductive technology process. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1274327. DOI: [10.3389/fendo.2023.1274327](https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1274327).
- Wang Y, Wang Y. Accelerated ovarian aging among type 2 diabetes patients and its association with adverse lipid profile. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:780979. DOI: [10.3389/fendo.2022.780979](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.780979).
- Helal J, Fatema K, Hasan MJ. Reproductive dysfunction in chronic kidney disease: a focus on male and female infertility. *J Kidney Dis Reprod*. 2025;7(1):1-10. DOI: [10.22259/2639-3573.0701001](https://doi.org/10.22259/2639-3573.0701001).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ: КОМОРБІДНІСТЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК

Срібна В. О., Литвиненко А. П., Калейнікова О. М., Вознесенська Т. Ю., Блашків Т. В.

Резюме. Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) – це розлад оваріальної функції, що характеризується зниженням оваріального резерву та порушенням фолікулогенезу у жінок до 40 років. Сучасні експериментальні моделі ПНЯ, зокрема індуковані циклофосфамідом, бускульфаном чи D-галактозою, відображають лише локальне токсичне ураження гонад і не враховують системних метаболічних змін, властивих хронічним захворюванням. Метою роботи було дослідження параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, якості ооцитів, а також шляхів загибелі клітин їх фолікулярного оточення за умов коморбідного впливу цукрового діабету і хронічної хвороби нирок для створення комплексної, біологічно релевантної експериментальної моделі ПНЯ в умовах цієї коморбідності. Експерименти проведені на статевозрілих білих лабораторних мишах, яких розподілено на три групи: контрольну, ЦД та ЦД+ХХН. Модель діабету відтворювали шляхом введення стрептозотозину і нікотинаміду, ХХН – повторною імунізацією нирковим антигеном. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів оцінювали методом прижиттєвого подвійного забарвлення нуклеїнових кислот флуоресцентними барвниками, а стан і мейотичне дозрівання ооцитів за морфологічними критеріями. Отримані результати свідчать, що при моделюванні поєднаної патології ЦД і ХХН відмічається виражене порушення оваріальної функції. Відмічено зростання частки клітин фолікулярного оточення ооцитів з ознаками апоптозу і некрозу, а також суттєве погіршення морфологічної якості ооцитів і порушення відновлення мейозу, як на стадії метафаза I так і на стадії метафаза II. Розроблена модель ПНЯ адекватно відображає поєднану дію метаболічних та системних порушень і може бути ефективно використана для подальшого дослідження механізмів ураження яєчників, пошуку маркерів оваріальної дисфункції та тестування фармакологічних або клітинно-орієнтованих підходів до її корекції.

Ключові слова: передчасна недостатність яєчників, коморбідність цукровий діабет, хронічна хвороба нирок, ооцити.

EXPERIMENTAL MODEL OF PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY: COMORBIDITY OF DIABETES MELLITUS AND CHRONIC KIDNEY DISEASE

Sribna V. O., Lytvynenko A. P., Kaleynikova O. M., Voznesenska T. Yu., Blashkiv T. V.

Abstract. Premature ovarian insufficiency (POI) is a disorder of ovarian function characterized by a reduced ovarian reserve and impaired folliculogenesis in women under 40 years of age. Existing experimental models of POI, such as those induced by cyclophosphamide, busulfan, or D-galactose, primarily reproduce localized gonadal

toxicity and oxidative injury, without reproducing the complex metabolic and inflammatory alterations typical of these chronic diseases. This study aimed to evaluate the parameters of oocyte meiotic maturation, oocyte quality, and the pathways of follicular cell death under the comorbid influence of diabetes mellitus and chronic kidney disease to develop a complex biologically relevant experimental model of POI in these systemic conditions. Experiments were performed on sexually mature white laboratory mice divided into three groups: control, DM, and DM+CKD. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin and nicotinamide, while CKD was modeled by repeated immunization with a renal antigen suspension. The viability of cells in the follicular environment of oocytes was assessed using the in vivo double staining method of nucleic acids with fluorescent dyes, and the condition and meiotic maturation of oocytes was assessed using morphological criteria. The results obtained indicate that in the modelling of combined diabetes mellitus and chronic kidney disease, there is a marked impairment of ovarian function. An increase in the proportion of follicular cells surrounding the oocytes with signs of apoptosis and necrosis was noted, as well as a significant deterioration in the morphological quality of the oocytes and impaired meiosis recovery, both at the metaphase I and metaphase II stages. The developed POI model adequately reflects the combined effect of metabolic and systemic disorders and can be effectively used for further research into the mechanisms of ovarian damage, the search for markers of ovarian dysfunction, and the testing of pharmacological or cell-oriented approaches to its correction.

Key words: premature ovarian insufficiency, comorbidity, diabetes mellitus, chronic kidney disease, oocytes.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Sribna V. O.: <https://orcid.org/0000-0003-0673-5131> ^{ABCD}

Lytvynenko A. P.: <https://orcid.org/0000-0003-0372-5130> ^{AB}

Kaleinikova O. M.: <https://orcid.org/0000-0001-9812-6266> ^{ABE}

Voznesenskaya T. Yu.: <https://orcid.org/0000-0001-8478-2422> ^{AE}

Blashkiv T. V.: <https://orcid.org/0000-0003-1196-2929> ^{AF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Sribna Valentyna Oleksandrivna / Срібна Валентина Олександрівна

Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine / Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Ukraine, 01024, Kyiv, 4 Akademika Bohomoltsia str. / Адреса: Україна, 01024, м. Київ, вул. Академіка Богомольця 4

Tel.: +380633552233/ Тел.: +380633552233

E-mail: valia-z@ukr.net

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 27.07.2025 / Стаття надійшла 27.07.2025 року

Accepted 10.11.2025 / Стаття прийнята до друку 10.11.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-4-179-201-211

UDC 616.89-008.441.44-053.6:616.8:355.48(477)

¹Tantsura L. M., ¹Dubenko A. Ye., ¹Pylypets O. Yu., ¹Tretiakov D. V.,

¹Herasymova K. M., ²Tantsura Ye. O., ¹Lukiantseva O. Yu., ²Tkachenko V. I., ¹Gekova M. V.

**STUDY OF DEPRESSION IN ADOLESCENTS WITH EPILEPSY,
OTHER NEUROLOGICAL DISORDERS, AND THEIR PARENTS DURING
THE PERIOD OF MILITARY ACTION IN UKRAINE**

¹SI «P. V. Voloshyn Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology

of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» (Kharkiv, Ukraine)

²Educational and Scientific Medical Institute of the National Technical University

«Kharkiv Polytechnic Institute» (Kharkiv, Ukraine)

pelya_71@ukr.net

A study was conducted to assess the prevalence of depressive symptoms in adolescents with various forms of epilepsy and their parents compared with a control group (patients with non-paroxysmal and non-progressive central nervous system disorders and their parents) under the conditions of martial law in the city of Kharkiv and the Kharkiv region.

It has been established that adolescents with epilepsy are significantly less likely to show low levels of depression compared to the control group, and adolescents with epilepsy have an almost three times higher proportion of