

**GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN ERYTHROCYTES AND ERYPTOSIS PROCESSES IN ADOLESCENTS WITH ABNORMAL UTERINE BLEEDING**

Kharkiv National Medical University (Kharkiv, Ukraine)

liudmilavygovskaya@gmail.com

*Abnormal uterine bleeding is one of the most common disorders of the pubertal period, affecting not only the reproductive function, but also the body as a whole. The study of the generation of reactive oxygen species in erythrocytes in adolescents with AUBA contributes to the understanding of the pathophysiological processes of its occurrence. Aim of the study: to determine the level of ROS generation in peripheral blood erythrocytes and eryptosis processes in patients with AUBA and anemia of varying degrees of severity. The study involved examination of 31 patients aged 10-17 years with AUB, which made up the main group (MG). Depending on the severity of anemia, the girls of MG were divided into subgroups: I – girls with AUBA and mild anemia, II – girls with AUBA and moderate anemia, III – girls with AUBA and severe anemia. Control group (CG) included 12 practically healthy girls. The level of ROS generation in peripheral blood erythrocytes was determined using flow cytometry. The mean fluorescence intensity of dichlorofluorescein in the population of viable peripheral blood erythrocytes was determined. In order to determine the binding of annexin V to phosphatidylserine to study the intensity of eryptosis processes, the following were analyzed: the percentage of annexin V – positive erythrocytes and the value of the mean fluorescence intensity of annexin V -FITC in all erythrocytes. In groups II and III, the level of generation of ROS in erythrocytes exceeded by 159.4%, 185.3% and by 78.8%, 96.6%, respectively, the level of this indicator in the CG and in Group I. The mean fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes in patients of Group II and III was increased by 296.5% and 380.5%, respectively, compared to CG. Increased generation of reactive oxygen species in erythrocytes of peripheral blood is observed in patients with AUBA and with grades 2 and 3 anemia, which contributes to the development of oxidative stress and leads to an increase in the intensity of the processes of eryptosis of circulating erythrocytes.*

**Key words:** reactive oxygen species in erythrocytes, eryptosis, abnormal uterine bleeding during puberty, anemia, oxidative stress.

**Connection of the publication with planned research works.**

The study was carried out as part of the research project "Optimization of clinical, diagnostic and therapeutic approaches to the management of gynecological patients taking into account age and the presence of extragenital disorders" (state registration number 0122U000257).

**Introduction.**

Abnormal uterine bleeding in adolescents (AUBA) is bleeding that occurs during puberty in teenage girls due to a violation of endometrial rejection [1]. AUBA is one of the most common reasons for consulting gynecologists, which is associated with significant physiological and hormonal changes in the body during puberty. Pathological conditions such as abnormal uterine bleeding (AUB) not only disrupt reproductive function, but also affect general homeostasis [2, 3].

The relevance of research on the generation of reactive oxygen species (ROS) in erythrocytes in pubertal girls with AUB is due to the importance of understanding the pathophysiological processes taking place in this age period. Pubertal period (PP) is known to be characterized by significant hormonal changes that can lead to a violation of menstrual function, in particular to AUB [4].

AUB pathogenesis in adolescents is closely related to endocrine and metabolic changes that occur during this period of development [4, 5]. Eryptosis, namely the programmed death of erythrocytes, which is caused by various stimuli, including increased production of ROS, the development of oxidative stress (OS), disruption of ion homeostasis and others is believed to be one of the possible pathogenic mechanisms triggering AUB [6].

ROS are known to be by-products of normal cell metabolism, but their excessive accumulation can lead to damage to cell structures and the initiation of programmed cell death processes [7]. Erythrocytes are usually resistant to the effects of ROS, but under the conditions of impaired antioxidant protection, which can be observed in AUB, they become vulnerable to OS [8]. In the case of uterine bleeding, this phenomenon takes on special importance, since increased eryptosis can significantly aggravate anemia and significantly disrupt blood coagulation processes, which increases the risk of a complicated course of AUB [9].

Therefore, the study of ROS generation in erythrocytes (Er) in adolescents with AUB is important for understanding the mechanisms of pathological changes and may become the basis for the development of new approaches to the treatment of AUB aimed at protecting cells from damage. The study of the mechanisms of eryptosis will allow a better understanding of AUB pathogenesis in girls of pubertal age, as well as the development of new approaches to the diagnosis and treatment of these conditions. This will contribute to improving the quality of life of adolescents, reducing the risk of developing complications and ensuring more effective and timely medical intervention.

**The aim of the study.**

To determine the level of ROS generation in peripheral blood erythrocytes and eryptosis processes in patients with AUBA and anemia of varying degrees of severity.

**Object and research methods.**

The study was carried out in the gynecological department of the communal non-profit establishment "City Maternity Hospital No. 1" of Kharkiv City Council

**Table 1 – Average fluorescence intensity of dichlorofluorescein in peripheral blood erythrocytes of girls of the main and control groups**

Clinical groups	Average fluorescence intensity of dichlorofluorescein in erythrocytes (Median [25%; 75% percentile])
CG (n=12)	595.5 [409.0; 886.5]
Clinical group I (n=12)	541.5 [434.0; 629.0]
Clinical group II (n=10)	1545.0 [637.3; 3429.0] <sup>a, b</sup> p=0.014; p <sub>1</sub> =0.0017;
Clinical group III (n=9)	1065.0 [976.0; 1234.0] <sup>a, b, d</sup> p=0.006; p <sub>1</sub> =0.001;

**Notes:** <sup>a</sup> – significant (p<0.05) difference compared to the indicators of CG girls; <sup>b</sup> – significant (p<sub>1</sub><0.05) difference compared to the indicators of girls of clinical group I; <sup>c</sup> – significant (p<sub>2</sub><0.05) difference compared to the indicators of girls of clinical group II; <sup>d</sup> – significant (p<sub>2</sub><0.05) difference compared to the indicators of girls of clinical group III.

and the surgical department No. 4 with gynecological beds of Kharkiv Regional Children’s Clinical Hospital No. 1, which are the clinical bases of the department of obstetrics, gynecology, pediatric gynecology and medical genetics of KhNMU, and at the department of biological of Chemistry of the KhNMU during 2021-2024. The study involved examination of 31 patients between the ages of 10 and 17, who sought medical attention due to AUB. These girls made up the main group (MG). The control group (CG) consisted of 12 practically healthy girls. This study was conducted in accordance with the requirements of Good Clinical Practice (ICH E2(R6) GCP) and the Declaration of Helsinki of the World Health Organization. The criteria for inclusion in the study were AUB, according to international criteria (FIGO, 2011) [10] at the time of admission to medical institutions, voluntary informed consent of parents and patients (age ≥14 years) to participate in the study. Taking into account the level of hemoglobin (Hb) in the clinical blood test (CBC), the MG girls were further divided into three subgroups. Clinical subgroup I – 12 (38.7%) girls with Hb level in CBC 114.5±4.5 g/l, II – 10 (32.3%) girls with Hb level in CBC 94.5±14.5 g/l, III – 9 (29.0%) girls with Hb level in CBC <80 g/l. In CG girls, the level of Hb in CBC was 125±5 g/l. To determine the degree of severity of anemia, we took into account the level of Hb in the CBC and presentation of patients (weakness, headache, dizziness, pale skin,

**Table 2 – Characteristics of the intensity of erythrocyte eryptosis processes (Me[IQR]) in girls of the control and main groups**

Clinical groups	Annexin V-positive erythrocytes, %	Mean fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes, r.u.
CG (n=12)	1.2 [0.725; 1.675]	926 [764; 1134]
Clinical group I (n=12)	6.0 [3.7; 7.25] <sup>a</sup> p=0.0002	2241 [2009; 2352] <sup>a</sup> p<0.0001
Clinical group II (n=10)	9.5 [7.55; 11.10] <sup>a, b</sup> p=0.0001; p <sub>1</sub> =0.0011	3672 [1985; 4809] <sup>a</sup> p<0.0001;
Clinical group III (n=9)	16.7 [12.75; 24.10] <sup>a, b, c</sup> p=0.0001; p <sub>1</sub> =0.0006; p <sub>2</sub> =0.004;	4450 [3273; 5129] <sup>a, b</sup> p=0.0001; p <sub>1</sub> =0.0007;

**Notes:** <sup>a</sup> – significant (p<0.05) difference compared to indicators in CG girls; <sup>b</sup> – significant (p<sub>1</sub><0.05) difference compared to the indicators of Group I patients; <sup>c</sup> – significant (p<sub>2</sub><0.05) difference compared to the indicators of Group II patients.

decreased performance at school) [11]. Thus, Group I girls had mild anemia, Group II girls had moderate anemia, and Group III girls had severe anemia.

The level of ROS generation in peripheral blood erythrocytes was determined using flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) of dichlorofluorescein (DCF) in the population of viable peripheral blood erythrocytes was determined. Blood samples were analyzed on a BD FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). In order to determine the binding of annexin V to phosphatidylserine (PS) to study the intensity of eryptosis processes, we analyzed the following parameters: the percentage of annexin V – positive erythrocytes and the value of the average fluorescence intensity of annexin V – FITC in all erythrocytes.

Statistical data processing was carried out using GraphPad Prism 7.05 and 5.0 software. Shapiro-Wilk and Kholmogorov-Smirnov tests were used to check the normality of the sample distribution. To compare two independent groups, either the non-parametric Mann-Whitney u test or the parametric Student’s t test was used. In the first case, numerical values were presented as median (Me) and interquartile range (IQR).

**Research results.**

The increase in generation of ROS in erythrocytes was evaluated by determining the MFI of DCF in erythrocytes of the peripheral blood of MG and CG patients. Assessment of findings showed that girls of the clinical group I did not have an increase in the generation of ROS in erythrocytes in comparison with the corresponding indicators in CG girls (**table 1**).

Clinical group II patients were found to have the most significant level of ROS generation in erythrocytes, which exceeded by 159.4% and 185.3%, respectively, the level of this indicator in the CG and in clinical group I.

Clinical group III patients were shown to have an increased generation of ROS in erythrocytes, namely by 78.8% and 96.6%, respectively, in comparison with the determined indicators in the CG and in the girls of clinical group I.

The increased generation of ROS in peripheral blood erythrocytes in patients with AUB and grade 2 and 3 anemia revealed during the study can also affect the processes of eryptosis, namely induce the death of erythrocytes.

To assess the intensity of eryptosis processes, the percentage of annexin V-positive erythrocytes and the value of the average fluorescence intensity of annexin V-FITC in all erythrocytes were determined. The obtained results are shown in **table 2** and **figure**.

During the study, statistically significant changes were observed in the percentage of annexin V-positive erythrocytes, namely the percentage of dead erythrocytes in patients with anemia of varying degrees of severity, compared to CG (**fig.**).

Assessment of findings (**table 2**) showed that the percentage of dead erythrocytes increased to 6.0% of all peripheral blood erythrocytes in patients with AUB and grade 1 anemia (Group I), which is 4.8% (5 times) exceeded this percentage in CG girls, and the mean fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes increased to 2241 units on average, which is 142.0% more than this indicator in CG. We also observed a statistically significant difference in the percentage of annexin V+ Er compared to this indicator in CG: it

exceeded this percentage by almost 8.3% and by 15.5% in patients with AUBA with grades 2 and 3 anemia, respectively (Groups II and III).

Evaluating the mean fluorescence intensity of Annexin V-FITC in erythrocytes, it can also be noted that in Group II and III patients, an increase in this indicator was observed by 296.5% and 380.5%, respectively, compared to CG. In patients with AUBA and with grade 3 anemia, a significant difference was also detected between the determined indicator in comparison with the mean fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes in Group I patients, namely by 98.57%. Thus, we observed the most significant changes in the indicators of the intensity of eryptosis processes in Group III patients, namely with grade 3 anemia.

In patients with AUB and with grade 1 anemia, we determined a minor development of eryptosis, which is probably related to the fact that the increase in ROS generation in erythrocytes was not detected and the possible inclusion of compensatory mechanisms, as well as activation of the antioxidant system for the elimination of ROS.

Patients with AUB with grades 2 and 3 anemia were found to have a significant violation of redox-homeostasis in circulating erythrocytes, which can lead to a change in their shape, development of deformation, premature aging, impaired transport function, elimination of cells from the blood circulation, creating grounds for the development of anemia and hypoxic conditions.

**Discussion of research results.**

The study of ROS generation in erythrocytes becomes especially relevant in pubertal period, when the body undergoes significant hormonal changes. ROS, being important mediators of cellular processes, in particular apoptosis and immune response, with excessive accumulation can trigger OS, which affects the function of erythrocytes [12]. An increased level of ROS in erythrocytes is known to be able to induce eryptosis, which, in turn, leads to deterioration of the rheological properties of blood, disruption of microcirculation, and a decrease in oxygen transport to tissues [13]. In pubertal girls with AUB, oxidative stress may be one of the key factors influencing the progression of the disease and its complications, including anemia.

Eryptosis is considered to be an important mechanism for regulating the life cycle of erythrocytes, and its excessive activation can cause the development of pathological conditions associated with microcirculation disorders, decreased tissue oxygenation, and increased blood viscosity [9].

Assessment of the study findings showed that patients with AUB and anemia had an increase in the percentage of dead erythrocytes in comparison with CG. An increase in the fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes was also recorded, indicating an increase in eryptosis processes. This can be explained by a change in the physicochemical properties of the

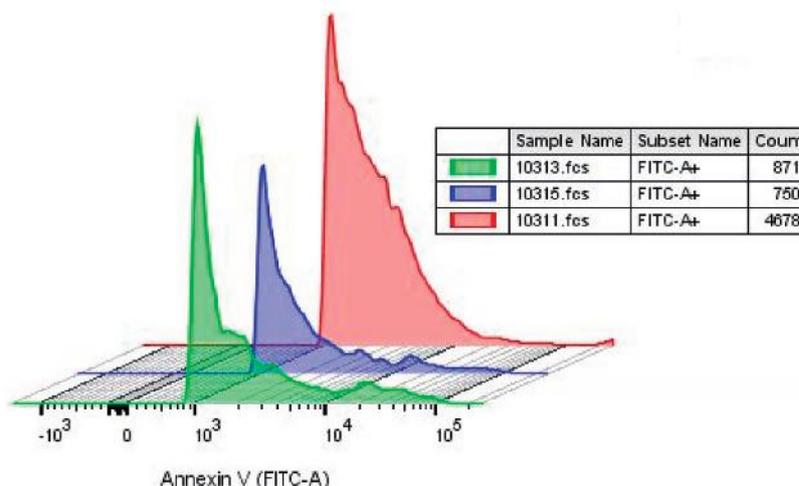


Figure – Representative histograms (determination of annexin V-positive erythrocytes, %) of patients with abnormal bleeding in the pubertal period depending on the grade of anemia (blue color – indicators in group I; green color – indicators in group II; red – indicators in group III patients).

phospholipid bilayer of cell membranes of erythrocytes secondary to OS in AUB [13]. In patients with more severe degrees of anemia, a more pronounced increase in the number of annexin V+ erythrocytes was observed, indicating a deepening of disorders in the cellular mechanisms of blood circulation.

The study revealed a significant increase in the fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes in patients with more severe grades of anemia (Groups II and III) compared to CG. In girls with severe grades of anemia, increased fluorescence in erythrocytes indicated profound violations of membrane integrity and metabolic balance, causing their premature death and removal from the blood circulation. Especially noticeable changes were observed in patients with grade 3 anemia, where this indicator was significantly higher not only compared to the control, but also to Group I patients, who had a milder form of anemia.

Therefore, patients with moderate and severe grades of anemia (Groups II and III) were found to have a significant increase in the intensity of eryptosis, especially in the group with grade 3 anemia. In patients with the mildest form of anemia (Group I), the development of eryptosis was minimal, probably relating to the activation of the antioxidant system. In more severe grades of anemia, a violation of redox homeostasis was observed, which led to the deformation of erythrocytes, their premature aging and impaired transport function, contributing to the development of anemia and hypoxia.

**Conclusions.**

Increased generation of reactive oxygen species in erythrocytes of peripheral blood is observed in patients with AUBA and with grades 2 and 3 anemia, which contributes to the development of oxidative stress and leads to an increase in the intensity of the processes of eryptosis of circulating erythrocytes.

**Prospects for further research.**

AUBA is one of the most frequent disorders in adolescent gynecological practice. The study of the main pathogenic aspects of the development of this condition will make it possible to predict it and determine the therapeutic and preventive measures, which will contribute to the improvement of the reproductive potential of the nation.

**ГЕНЕРАЦІЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ЕРИТРОЦИТАХ ТА ПРОЦЕСИ ЕРИПТОЗУ У ДІВЧАТ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРІОДУ З АНОМАЛЬНИМИ МАТКОВИМИ КРОВОТЕЧАМИ**

Харківський національний медичний університет (м. Харків, Україна)

liudmilavygovskaya@gmail.com

Аномальні маткові кровотечі – одна з найпоширеніших патологій пубертатного періоду, що впливають не тільки на репродуктивну функцію, але й на організм у цілому. Дослідження генерації активних форм кисню в еритроцитах у дівчат з АМКПП сприяє розумінню патофізіологічних процесів їх виникнення. Мета дослідження: визначити рівень генерації АФК в еритроцитах периферичної крові та процесів ериптозу в пацієнток з АМКПП й анемією різного ступеня тяжкості. Обстежено 31 пацієнтку віком 10–17 років з АМК, що становили основну групу (ОГ). Залежно від ступеня тяжкості анемії дівчат ОГ розподілили на підгрупи: I – дівчата з АМКПП й анемією легкого ступеня, II – дівчата з АМКПП та анемією середнього ступеня, III – дівчата з АМКПП й анемією тяжкого ступеня. Контрольна група (КГ) – 12 практично здорових дівчат. Рівень генерації АФК в Ер периферичної крові визначали за допомогою проточної цитометрії. Встановлено середню інтенсивність флуоресценції дихлорфлуоресцеїну в популяції життєздатних Ер периферичної крові. З метою визначення зв'язування анексіну V з фосфатидилсерином для дослідження інтенсивності процесів ериптозу проаналізовано відсоток анексіну V-позитивних Ер та значення середньої інтенсивності флуоресценції анексіну V-FITC в усіх Ер. У II та III підгрупах рівень генерації АФК в Ер перевищував цей показник у КГ та I підгрупі на 159,4%, 185,3% та на 78,8%, 96,6% відповідно. Середня інтенсивність флуоресценції анексіну V-FITC в Ер у пацієнток II та III підгруп була збільшеною на 296,5% і 380,5% відповідно порівняно з КГ. У пацієнток з АМКПП та з анемією II і III ступеня тяжкості спостерігається підвищена генерація активних форм кисню в еритроцитах периферичної крові, що спричиняє розвиток оксидативного стресу та призводить до підвищення інтенсивності процесів ериптозу циркулюючих еритроцитів.

**Ключові слова:** активні форми кисню в еритроцитах, ериптоз, аномальні маткові кровотечі пубертатного періоду, анемія, оксидативний стрес.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Роботу виконано в межах науково-дослідної роботи «Оптимізація клініко-діагностичних та лікувальних підходів ведення гінекологічних хворих з урахуванням віку та наявності екстрагенітальної патології» (номер державної реєстрації 0122U000257).

**Вступ.**

Аномальні маткові кровотечі пубертатного періоду (АМКПП) – це кровотечі, що виникають у період статевого дозрівання в дівчат-підлітків унаслідок порушення відторгнення ендометрія [1]. АМКПП у дівчат є однією з найпоширеніших причин звернення до лікарів-гінекологів, що пов'язано зі значними фізіологічними та гормональними перебудовами організму в цей період. Такі патологічні стани, як аномальні маткові кровотечі (АМК), не лише порушують репродуктивну функцію, але й впливають на загальний гомеостаз [2, 3].

Актуальність досліджень генерації активних форм кисню (АФК) в еритроцитах у дівчат пубертатного віку з АМК обумовлена важливістю розуміння патофізіологічних процесів, які відбуваються в цьому віковому періоді. Як відомо, пубертатний період (ПП) характеризується значними гормональними змінами, які можуть призводити до порушення менструальної функції, зокрема до АМК [4].

Патогенез АМК у дівчат ПП тісно пов'язаний з ендокринними та метаболічними змінами, що відбуваються в цей період розвитку [4, 5]. Одним з можливих патогенетичних механізмів, залучених у розвиток АМК, може бути ериптоз – програмована загибель еритроцитів, що зумовлюється різноманітними стимулами, серед яких підвищення продукції АФК, розвиток оксидативного стресу (ОС), порушення іонного гомеостазу та інші [6].

Як відомо, АФК є побічними продуктами нормального метаболізму клітин, однак їх надмірне накопичення може призводити до пошкодження клітинних структур та запуску програмованих процесів загибелі клітин [7]. Еритроцити зазвичай є резистентними до впливу АФК, однак за умов порушеного антиоксидантного захисту, що може спостерігатися при АМК, вони стають уразливими до ОС [8]. У випадку маткових кровотеч це явище набуває особливого значення, оскільки посилений ериптоз може значно загострювати анемію та суттєво порушувати процеси згортання крові, що підвищує ризик ускладненого перебігу АМК [9].

Отже, дослідження генерації АФК в еритроцитах (Ер) у дівчат ПП з АМК є важливим для розуміння механізмів патологічних змін і може стати основою для розроблення нових підходів до лікування АМК, спрямованих на захист клітин від пошкодження. Дослідження механізмів ериптозу дасть змогу краще зрозуміти патогенез АМК у дівчат пубертатного віку, а також розробити нові підходи до діагностики та лікування цих станів. Це сприятиме покращенню якості життя підлітків, зниженню ризику розвитку ускладнень і забезпеченню більш ефективного та своєчасного медичного втручання.

**Мета дослідження.**

Визначити рівень генерації АФК в еритроцитах периферичної крові та процесів ериптозу в пацієнток з АМКПП та анемією різного ступеня тяжкості.

**Об'єкт і методи дослідження.**

Роботу проводили в гінекологічному відділенні КНП «Міський пологовий будинок № 1» ХМР та хірур-

гічному відділенні № 4 з гінекологічними ліжками Харківської обласної дитячої клінічної лікарні № 1, що є клінічними базами кафедри акушерства, гінекології, дитячої гінекології та медичної генетики ХНМУ, та на кафедрі біологічної хімії ХНМУ протягом 2021-2024 рр. Обстежено 31 пацієнтку віком 10–17 років, які звернулися до медичних закладів у зв'язку з АМК. Ці дівчата становили основну групу (ОГ). До контрольної групи (КГ) увійшло 12 практично здорових дівчат. Під час проведення даного дослідження було дотримано вимог Good Clinical Practice (ICH E2(R6) GCP) та Гельсінської Декларації Всесвітньої медичної організації. Критеріями включення до дослідження були АМК згідно з міжнародними критеріями (FIGO, 2011) [10] на момент госпіталізації в медичні заклади, добровільна інформована згода батьків та пацієнток (віком  $\geq 14$  років) на проведення дослідження. З урахуванням рівня гемоглобіну (Hb) у клінічному аналізі крові (КАК) дівчат ОГ додатково розподілили на три підгрупи. I клінічна підгрупа – 12 (38,7%) дівчат з рівнем Hb в КАК  $114,5 \pm 4,5$  г/л, II – 10 (32,3%) дівчат з рівнем Hb в КАК  $94,5 \pm 14,5$  г/л, III – 9 (29,0%) дівчат з рівнем Hb в КАК  $< 80$  г/л. У дівчат КГ рівень Hb в КАК становив  $125 \pm 5$  г/л. Для визначення ступеня тяжкості анемії брали до уваги рівень Hb в КАК та скарги пацієнток (слабкість, головний біль, запаморочення, блідість шкіри, зниження успішності в школі) [11]. Так, у дівчат I підгрупи мала місце анемія легкого ступеня, у дівчат II підгрупи – анемія середнього ступеня, у дівчат III підгрупи – анемія тяжкого ступеня.

Рівень генерації АФК в Ер периферичної крові визначали за допомогою проточної цитометрії. Було з'ясовано середню інтенсивність флуоресценції (СІФ) дихлорфлуоресцеїну (DCF, ДХФ) у популяції життєздатних Ер периферичної крові. Зразки крові аналізували на проточному цитометрі «BD FACS Canto II» (Becton Dickinson, США). З метою визначення зв'язування анексину V з фосфатидилсерином (ФС) для дослідження інтенсивності процесів ериптозу ми аналізували такі параметри: відсоток анексин V-позитивних Ер та значення середньої інтенсивності флуоресценції анексин V-FITC в усіх Ер.

Статистичне оброблення даних проводили з використанням програм «GraphPad Prism» 7.05 та 5.0. Використовували критерії Шапіро-Уїлка та Холмова-Смирнова для перевірки нормальності розподілу вибірок. Для порівняння двох незалежних груп

**Таблиця 1 – Середня інтенсивність флуоресценції дихлорфлуоресцеїну в еритроцитах периферичної крові дівчат основної та контрольної груп**

Клінічні групи	Середня інтенсивність флуоресценції дихлорфлуоресцеїну в еритроцитах (Median [25%; 75% percentile])
КГ (n=12)	595.5 [409.0; 886.5]
I клінічна група (n=12)	541.5 [434.0; 629.0]
II клінічна група (n=10)	1545.0 [637.3; 3429.0] <sup>a, b</sup> p=0.014; p <sub>1</sub> =0.0017;
III клінічна група (n=9)	1065.0 [976.0; 1234.0] <sup>a, b, d</sup> p=0.006; p <sub>1</sub> =0.001;

**Примітки:** <sup>a</sup> – значуща (p<0.05) відмінність порівняно з показниками в дівчат КГ; <sup>b</sup> – значуща (p<sub>1</sub><0.05) відмінність порівняно з показниками в дівчат I клінічної підгрупи; <sup>c</sup> – значуща (p<sub>2</sub><0.05) відмінність порівняно з показниками в дівчат II клінічної підгрупи; <sup>d</sup> – значуща (p<sub>2</sub><0.05) відмінність порівняно з показниками в дівчат III клінічної підгрупи.

використовували або непараметричний u-критерій Манна-Уїтні, або параметричний t-критерій Стьюдента. У першому випадку числові значення було представлено у вигляді медіани (Me) й інтерквартильного розмаху (IQR).

**Результати дослідження.**

Збільшення генерації АФК в Ер оцінювали шляхом визначення СІФ ДХФ в Ер периферичної крові пацієнток ОГ та КГ. При аналізі отриманих результатів досліджень з'ясовано, що в дівчат I клінічної підгрупи генерація АФК Ер не збільшується порівняно з відповідними показниками у дівчат КГ (**табл. 1**).

У пацієнток II клінічної підгрупи спостерігався найбільш значущий рівень генерації АФК в Ер, що перевищував на 159,4% та 185,3% відповідно цей показник у КГ та у I клінічній підгрупі.

У пацієнток III клінічної підгрупи спостерігалася підвищена генерація АФК в Ер, а саме на 78,8% та 96,6% відповідно порівняно з визначеними показниками в КГ й у дівчат I клінічної підгрупи.

Виявлена в ході дослідження підвищена генерація АФК в Ер периферичної крові в пацієнток з АМК й анемією II та III ступеня також може впливати на процеси ериптозу, а саме індукувати загибель Ер.

Для оцінювання інтенсивності процесів ериптозу Ер було визначено відсоток анексин V-позитивних еритроцитів та значення середньої інтенсивності флуоресценції анексин V-FITC в усіх Ер. Отримані результати наведено в **табл. 2** та на **рисунку**.

Проведене дослідження показує наявність статистично значущих змін у відсотку анексин V-позитивних Ер, а саме в кількості мертвих Ер у пацієнток з анемією різного ступеня тяжкості порівняно з КГ (**рис.**).

Аналіз отриманих результатів (**табл. 2**) дає змогу виявити зростання відсотка мертвих еритроцитів до 6,0% усіх Ер периферичної крові в пацієнток з АМК й анемією I ступеня (підгрупа I), що на 4,8% (у 5 разів) вище за цей показник у дівчат КГ; водночас середня інтенсивність флуоресценції анексин V-FITC в Ер зростала в середньому до 2241 у.о., що на 142,0% більше, ніж цей показник у КГ. Ми спостерігали також статистично значущу різницю відсотка анексин V\* Ер порівняно з цим показником у КГ, зокрема його збільшення практично на 8,3% та на 15,5% у пацієн-

**Таблиця 2 – Характеристика інтенсивності процесів ериптозу еритроцитів (Me[IQR]) у дівчат контрольної та основної груп**

Клінічні групи	Анексин V-позитивні еритроцити, %	Середня інтенсивність флуоресценції анексин V-FITC в еритроцитах, у.о.
КГ (n=12)	1.2 [0.725; 1.675]	926 [764; 1134]
I клінічна підгрупа (n=12)	6.0 [3.7; 7.25] <sup>a</sup> p=0.0002	2241 [2009; 2352] <sup>a</sup> p<0.0001
II клінічна підгрупа (n=10)	9.5 [7.55; 11.10] <sup>a, b</sup> p=0.0001; p <sub>1</sub> =0.0011	3672 [1985; 4809] <sup>a</sup> p<0.0001;
III клінічна підгрупа (n=9)	16.7 [12.75; 24.10] <sup>a, b, c</sup> p=0.0001; p <sub>1</sub> =0.0006; p <sub>2</sub> =0.004;	4450 [3273; 5129] <sup>a, b</sup> p=0.0001; p <sub>1</sub> =0.0007;

**Примітки:** <sup>a</sup> – значуща (p<0.05) відмінність порівняно з показниками в дівчат з КГ; <sup>b</sup> – значуща (p<sub>1</sub><0.05) відмінність порівняно з показниками в пацієнток з I підгрупи; <sup>c</sup> – значуща (p<sub>2</sub><0.05) відмінність порівняно з показниками в пацієнток з II підгрупи.

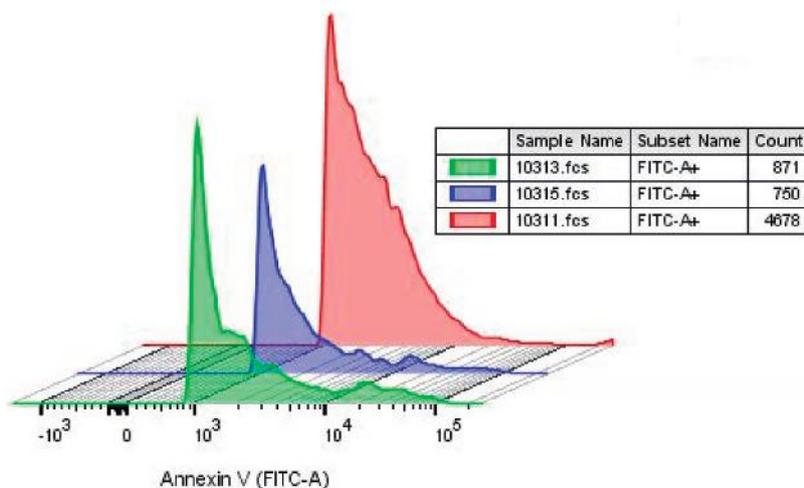


Рисунок – Репрезентативні гістограми (визначення анексин V-позитивних еритроцитів, %) пацієнток з аномальними кровотечами пубертатного періоду залежно від ступеня тяжкості анемії (синій колір – показники в I підгрупі; зелений колір – показники в II підгрупі; червоний – показники в III підгрупі пацієнток).

ток з АМКПП з анемією II та III ступеня відповідно (підгрупи II та III).

Оцінюючи середню інтенсивність флуоресценції анексин V-FITC в Ер можемо також відзначити збільшення цього показника в пацієнток II та III підгруп порівняно з КГ на 296,5% та 380,5% відповідно. У пацієнток з АМКПП та з анемією III ступеня різниця між цим показником теж була значущою порівняно із середньою інтенсивністю флуоресценції анексин V-FITC в Ер у пацієнток I підгрупи, а саме на 98,57%. Отже, найбільш значущі зміни в показниках інтенсивності процесів еритроптозу Ер ми спостерігали в пацієнток III підгрупи, а саме з анемією III ступеня тяжкості.

У пацієнток з АМК та з анемією I ступеня ми виявили незначний розвиток еритроптозу, що, вірогідно, пов'язано з неможливістю виявити збільшення генерації АФК в Ер та ймовірним запуском компенсаторних механізмів, активацією антиоксидантної системи для елімінації АФК.

У пацієнток з АМК з II та III ступеня тяжкості анемії спостерігається значне порушення редокс-гомеостазу в циркулюючих Ер, що може призвести до зміни їхньої форми, виникнення деформації, передчасного старіння, порушення транспортної функції, елімінації клітин з кровообігу, створюючи підстави для розвитку анемії та гіпоксичних станів.

#### Обговорення результатів дослідження.

Дослідження генерації АФК в еритроцитах набуває особливої актуальності в ПП, коли організм проходить через значні гормональні перебудови. АФК як важливі медіатори клітинних процесів, зокрема апоптозу й імунної відповіді, при надмірному накопиченні можуть призводити до ОС, який впливає на функцію еритроцитів [12]. Відомо, що підвищений рівень АФК в еритроцитах може індукувати еритроптоз, що в свою чергу призводить до погіршення реологічних властивостей крові, порушення мікроциркуляції та зниження транспорту кисню до тканин [13]. У дівчат пубертатного віку з АМК окисний стрес може бути одним з ключових чинників, що впливає на прогресування захворювання та його ускладнення, включаючи анемію.

Як відомо, еритроптоз є важливим механізмом регуляції життєвого циклу еритроцитів, а його надмірна активація може спричинити розвиток патологічних станів, пов'язаних з порушенням мікроциркуляції, зниженням оксигенації тканин і підвищенням в'язкості крові [9].

Аналіз отриманих результатів досліджень показав збільшення відсотка мертвих еритроцитів у пацієнток з АМК та анемією порівняно з КГ. Крім того, було зафіксовано підвищення інтенсивності флуоресценції анексин V-FITC в еритроцитах, що свідчить про зростання процесів еритроптозу. Це може пояснюватися зміною фізико-хімічних властивостей фосфоліпідного бішару клітинних мембран еритроцитів на тлі ОС при АМК [13].

У пацієнток з тяжкими ступенями анемії спостерігалось більш виражене збільшення кількості анексин V+-еритроцитів, що вказує на поглиблення порушень у клітинних механізмах кровообігу.

У роботі виявлено значне зростання інтенсивності флуоресценції анексин V-FITC в еритроцитах у пацієнток з більш тяжкими формами анемії (II та III підгрупи) порівняно з КГ. У дівчат з тяжкими формами анемії підвищення флуоресценції в еритроцитах вказує на глибокі порушення цілісності мембран та метаболічної рівноваги, що спричиняє їх передчасну загибель та виведення з кровообігу. Особливо помітними зміни були в пацієнток з анемією III ступеня, де цей показник значно перевищував дані не лише контролю, але й пацієнток I підгрупи, що мали легшу форму анемії.

Отже, у пацієнток з анемією середнього та тяжкого ступеня (II та III підгрупи) відзначалося суттєве підвищення інтенсивності еритроптозу, особливо в групі з анемією III ступеня. У пацієнток з найлегшою формою анемії (I підгрупа) розвиток еритроптозу був мінімальним, що, імовірно, пов'язано з активацією антиоксидантної системи. При важких формах анемії спостерігалось порушення редокс-гомеостазу, що призводило до деформації еритроцитів, їх передчасного старіння та порушення транспортної функції, сприяючи розвитку анемії та гіпоксії.

#### Висновки.

У пацієнток з АМКПП й анемією II та III ступеня тяжкості спостерігається підвищена генерація активних форм кисню в еритроцитах периферичної крові, що сприяє розвитку оксидативного стресу та призводить до підвищення інтенсивності процесів еритроптозу циркулюючих еритроцитів.

#### Перспективи подальших досліджень.

АМКПП – одна з найчастіших патологій у підлітковій гінекологічній практиці. Вивчення основних патогенетичних моментів розвитку цього стану дасть змогу прогнозувати його та визначитися з лікувально-профілактичними заходами, що сприятиме покращенню репродуктивного потенціалу нації.

## References / Література

- Kovalyshyn O. Anomální matkovi krvoteci pubertatnoho periodu: do pytan patohenezu i diahnozyky. Reproduktyvne zdorovia zhinky. 2022;(2):39-46. DOI: <https://doi.org/10.30841/2708-8731.2.2022.261806>. [in Ukrainian].
- Elmaoğulları S, Aycan Z. Abnormal Uterine Bleeding in Adolescents. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2018;10(3):191-197. DOI: [10.4274/jcrpe.0014](https://doi.org/10.4274/jcrpe.0014).
- Cano-Herrera G, Salmun Nehmad S, Ruiz de Chávez Gascón J, Méndez Vionet A, van Tienhoven XA, Osorio Martínez MF, et al. Endometriosis: A Comprehensive Analysis of the Pathophysiology, Treatment, and Nutritional Aspects, and Its Repercussions on the Quality of Life of Patients. Biomedicines. 2024;12(7):1476. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines.12071476>.
- Fudvoye J, Lopez-Rodríguez D, Franssen D, Parent AS. Endocrine disruptors and possible contribution to pubertal changes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2019;33(3):101300.
- Franssen D, Svingen T, Lopez Rodriguez D, Van Duursen M, Boberg J, Parent AS. A Putative Adverse Outcome Pathway Network for Disrupted Female Pubertal Onset to Improve Testing and Regulation of Endocrine Disrupting Chemicals. Neuroendocrinology. 2022;112(2):101-14.
- Dreischer P, Duszenko M, Stein J, Wieder T. Eryptosis: Programmed Death of Nucleus-Free, Iron-Filled Blood Cells. Cells. 2022;11:503.
- Bissinger R, Bhuyan AAM, Qadri SM, Lang F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: A pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. FEBS J. 2019;286:826-854.
- Alfihli MA, Lee MH. Flow Cytofluorometric Analysis of Molecular Mechanisms of Premature Red Blood Cell Death. Methods Mol. Biol. 2021;2326:155-165.
- Alghareeb SA, Alfihli MA, Fatima S. Molecular Mechanisms and Pathophysiological Significance of Eryptosis. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(6):5079. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms.24065079>.
- Munro MG, Critchley HOD, Fraser IS, FIGO Menstrual Disorders Committee. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions. Int J Gynaecol Obstet. 2018;143(3):393-408. DOI: [10.1002/ijgo.12666](https://doi.org/10.1002/ijgo.12666).
- MOZ Ukrainy. Nakaz MOZ Ukrainy № 709 Unifikovanyi klinichniy protokol pervynnoi, vtorynnoi (spetsializovanoi) medychnoi dopomohy. Zalozhdefitsyna anemiia. Kyiv: MOZ Ukrainy; 2015. Dostupno: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0709282-15#n22>. [in Ukrainian].
- Alieksieieva O, Harkavenko K, Posokhov Y, Prokopyuk V, Lazurenko V, Safonov R. Redox status and cell membrane alterations of circulating leukocytes and erythrocytes in abnormal uterine bleeding. Problems of Endocrine Pathology. 2023;80(1):7-16. DOI: <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2023.1.01>.
- Repsold L, Joubert AM. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. Biomed. Res. Int. 2018;2018:9405617.

### ГЕНЕРАЦІЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ЕРИТРОЦИТАХ ТА ПРОЦЕСИ ЕРИПТОЗУ У ДІВЧАТ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРІОДУ З АНОМАЛЬНИМИ МАТКОВИМИ КРОВОТЕЧАМИ

Вигівська Л. А., Наконечна О. А., Плехова О. О.

**Резюме.** Аномальні маткові кровотечі пубертатного періоду в дівчат є однією з найпоширеніших причин звернення до лікарів-гінекологів, що зумовлено значними фізіологічними та гормональними перебудовами організму в цей період. Механізм виникнення та розвиток АМКПП пов'язаний з різноманітними змінами, які виникають в організмі в цей час. Однією з таких можливих змін може бути ериптоз – програмована загибель еритроцитів, яка виникає внаслідок підвищеного утворення активних форм кисню і, як наслідок – виникнення оксидативного стресу.

Метою цього дослідження було визначення рівня генерації АФК в еритроцитах периферичної крові та процесів ериптозу в пацієнток з АМКПП й анемією різного ступеня тяжкості.

Основну групу становила 31 пацієнтка віком 10–17 років, які звернулися до медичних закладів у зв'язку з АМК. Залежно від ступеня тяжкості анемії, пацієнток основної групи додатково розподілили на підгрупи: I – дівчата з АМКПП та анемією легкого ступеня, II – дівчата з АМКПП й анемією середнього ступеня, III – дівчата з АМКПП й анемією важкого ступеня. Контрольну групу (КГ) становили 12 практично здорових дівчат. Проведене дослідження виявило в пацієнток II клінічної групи найбільш значущий рівень генерації АФК в Ер, що перевищував цей показник у КГ та I клінічної підгрупі на 159,4% та 185,3% відповідно. У пацієнток III клінічної підгрупи спостерігалася підвищена генерація АФК в Ер, а саме на 78,8% та 96,6% відповідно порівняно з визначеними показниками в КГ й у дівчат I клінічної підгрупи. Підвищена генерація АФК в Ер периферичної крові в пацієнток з АМКПП й анемією середнього та важкого ступеня може впливати на процеси ериптозу, а саме індукувати загибель Ер. У пацієнток I підгрупи відсоток мертвих еритроцитів зростав до 6,0%, що в 5 разів перевищувало цей відсоток у дівчат КГ, а середня інтенсивність флюоресценції анексин V-FITC в Ер зростала в середньому до 2241 у.о., що на 142,0% більше за цей показник у КГ. У пацієнток II та III підгруп відсоток мертвих еритроцитів зростав до 9,5% та 16,7% відповідно та перевищував цей показник у КГ в 7,9 та 13,9 разів, а середня інтенсивність флюоресценції анексин V-FITC в Ер зростала в середньому до 3672 у.о. та 4450 у.о., що на 296,5% і 380,5% більше за цей показник у КГ. Отже, у пацієнток II та III підгруп виявлено значне підвищення інтенсивності ериптозу. За таких анемії спостерігалася порушення редокс-гомеостазу, що призводило до деформації еритроцитів, їх передчасного старіння та порушення транспортної функції, спричиняючи розвиток анемії і гіпоксії.

У пацієнток з АМКПП й анемією середнього та важкого ступеня спостерігається підвищена генерація активних форм кисню в еритроцитах периферичної крові, що спричиняє розвиток оксидативного стресу та призводить до підвищення інтенсивності процесів ериптозу циркулюючих еритроцитів.

**Ключові слова:** активні форми кисню в еритроцитах, ериптоз, аномальні маткові кровотечі пубертатного періоду, анемія, оксидативний стрес.

### GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN ERYTHROCYTES AND ERYPTOSE PROCESSES IN ADOLESCENTS WITH ABNORMAL UTERINE BLEEDING

Vygivska L. A., Nakonechna O. A., Pliekhova O. O.

**Abstract.** Abnormal uterine bleeding in adolescents is one of the most common reasons for seeking medical attention, which is associated with significant physiological and hormonal changes in the body during puberty. The

mechanism of occurrence and development of AAUBA is associated with various changes that occur in the body during this period. Eryptosis, which is the programmed death of erythrocytes, occurring as a result of increased formation of reactive oxygen species and as a result of oxidative stress might be one of such possible changes.

The aim of this study was to determine the level of ROS generation in peripheral blood erythrocytes and eryptosis processes in patients with AUBA and anemia of varying degrees of severity.

The main group consisted of 31 female patients aged 10-17 years, who sought medical attention due to AUB. Depending on the grade of anemia, the patients of the main group were further divided into subgroups: I – girls with AUBA and mild anemia, II – girls with AUBA and moderate anemia, III – girls with AUBA and severe anemia. The control group (CG) included 12 practically healthy girls. The study showed that the most significant level of ROS generation in erythrocytes was observed in patients of clinical group II, which exceeded by 159.4% and 185.3%, respectively, the level of this indicator in the CG and in clinical group I. Increased generation of ROS in erythrocytes was observed in patients of clinical group III, namely by 78.8% and 96.6%, respectively, in comparison with the determined indicators in the CG and in the girls of clinical group I. The increased generation of ROS in peripheral blood erythrocytes in patients with AUBA and moderate and severe anemia can affect the processes of eryptosis, namely induce the death of erythrocytes. In Group I patients, the percentage of dead erythrocytes increased to 6.0%, which was 5 times higher than this percentage in CG girls, and the mean fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes increased to 2241 r.u. on average, which is 142.0% more than this indicator in CG. In patients of Groups II and III, the percentage of dead erythrocytes increased to 9.5% and 16.7%, respectively, and exceeded this indicator in CG by 7.9 and 13.9 times, and the mean fluorescence intensity of annexin V-FITC in erythrocytes increased on average up to 3672 r.u. and 4.450 r.u., which is 296.5% and 380.5% more than this indicator in CG. Therefore, a significant increase in the intensity of eryptosis was noted in patients of Groups II and III. Such anemias, triggered impairment of redox homeostasis, which led to the deformation of erythrocytes, their premature aging and impaired transport function, contributing to the development of anemia and hypoxia.

Increased generation of reactive oxygen species in peripheral blood erythrocytes is observed in patients with AUBA and with moderate and severe anemia, which contributes to the development of oxidative stress and leads to an increase in the intensity of the processes of eryptosis of circulating erythrocytes.

**Key words:** reactive oxygen species in erythrocytes, eryptosis, abnormal uterine bleeding during puberty, anemia, oxidative stress.

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

Vygivska L. A.: <http://orcid.org/0000-0002-9389-4845><sup>ADEF</sup>

Nakonechna O. A.: <http://orcid.org/0000-0002-2614-1587><sup>ADEF</sup>

Pliekhova O. O.: <http://orcid.org/0000-0003-3183-8183><sup>BC</sup>

**Conflict of interest / Конфлікт інтересів:**

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

**Corresponding author / Адреса для кореспонденції**

Vygivska Liudmyla Anatoliivna / Вигівська Людмила Анатоліївна

Kharkiv National Medical University / Харківський національний медичний університет

Ukraine, 61022, Kharkiv, 4 Nauky Avenue / Адреса: Україна, 61022, м. Харків, проспект Науки 4

Tel.: +380509675487 / Тел.: +380509675487

E-mail: [liudmilavygovskaya@gmail.com](mailto:liudmilavygovskaya@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 статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

**Received 16.07.2024 / Стаття надійшла 16.07.2024 року**  
**Accepted 19.11.2024 / Стаття прийнята до друку 19.11.2024 року**

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-282-288

UDC 616.3-05-056.527-089.15

**Voitiv Y. Yu., Sorokin B. V., Savoliuk S. I., Reiti A. O., Tkachuk O. V., Tyselskyi V. V.**

**RISK FACTORS FOR THE NEGATIVE COURSE OF GASTRODUODENAL GASTROINTESTINAL BLEEDING IN OBESE PATIENTS**

**Shupyk National Healthcare University of Ukraine (Kyiv, Ukraine)**

[tkachukolga19@gmail.com](mailto:tkachukolga19@gmail.com)

*Obesity affects 25% of adults in Ukraine, which is one of the highest rates on the European continent. Treating gastrointestinal ulcer bleeding in obese patients is challenging due to 75% of them are taking at list one ulcerogenic or blood-thinning medications, and 25% use three or more because comorbidities. The problem of treating and predicting the outcomes of ulcerative bleeding in such patients is insufficiently studied. This study aimed to assess treatment outcomes for acute ulcerative bleeding in sever obese patients, evaluate the effects of age and medication*