



Биол. журн. Армении, 4 (71), 2019

## АКТИВИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ NADPH СОДЕРЖАЩЕГО ЛИПОПРОТЕИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ НА ЭКТОСОМАЛЬНУЮ NADPH ОКСИДАЗУ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПРИ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Ր.Մ.ՍԻՄՈՆՅԱՆ<sup>1</sup>, Ե.Մ. ԱԳԱԺՋԱՆՈՎԱ<sup>2</sup>, Մ.Ա. ԲԱԲԱՅԱՆ<sup>1</sup>, Գ.Մ. ՍԻՄՈՆՅԱՆ<sup>1</sup>,  
Տ.Տ. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ<sup>3</sup>, Մ.Ի. ԱԳԱԺՋԱՆՈՎ<sup>2</sup>, Մ.Ա.ՍԻՄՈՆՅԱՆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им Г.Х.Бунятыана НАН РА,

<sup>2</sup> ЕГМУ им .М.Гераци, Ереван,

<sup>3</sup> Ширакский государственный университет им М.Налбандяна, Гюмри,  
maxim.simonyan@gmail.com

Впервые разработан простой метод выделения и очистки эктосомальной NADPH оксидазы (экто-Nox) из цитоплазмы эритроцитов крови пациентов с диабетом 1 типа (опытная группа ОГ) и доноров (контрольная группа КГ), а также нативного NADPH-содержащего липопротеина (НЛП) из сыворотки крови.

Однако удельное содержание экто-Nox в КГ было выше такового в ОГ почти 2 раза. При инсулинзависимом диабете удельная NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая активность экто-Nox ОГ ( $19,7 \pm 1,6$  ед/мг) практически не менялась, по сравнению с КГ. Удельная ферриHb-восстанавливающая активность экто-Nox в ОГ была ниже, чем в КГ. Форма оптических спектров поглощения экто-Nox и НЛПв ОГ и КГ практически не различается. Показано, что НЛП является кофактором для Nox.

Так как содержание и ферриHb-восстанавливающая активность экто-Nox в ОГ ниже, чем таковые в КГ, это может вызывать гипоксию у больных диабетом 1 типа. Результаты исследования могут быть использованы как новые диагностические тесты диабета типа 1.

### *Կրօւծ– ԴԻԱԲԵՏ 1 ԽԻՊԱ–NADPH-ՍՈԴԵՐՋԱՑՄԱՆ ԼԻՍՈՍՊՐՏԵԻՆ –ԷԿՏՈ-NADPH-ՕՔՍԻԴԱԶԱ*

Առաջին անգամ մշակվել է պարզ մեթոդ դրսևորական (ստուգիչ խումբ – ՍԽ) և շաքարախտ 1 տիպի հիվանդների (փորձնական խումբ – ՓԽ) արյան էրիթրոցիտների ցիտոպլազմայից Էկտոսոմային ՆԱԴՐՈՒ օքսիդազի (Էկտո-Nox) և արյան շիճուկից ՆԱԴՐՈՒ պարունակող նատիվ լիպոպրոտեինի (ՆԼՊ) անջատման ու մաքրման համար: Արյան շիճուկի ՆԼՊ-ի տեսակարար քանակությունը ՍԽ-ում կազմում է  $2,45 \pm 0,03$  մգ/մլ ( $p < 0,05$ ), իսկ ՓԽ-ում  $-3,50 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ ) մգ/մլ: Ինսուլինակախյալ շաքարախտի ժամանակ Էկտո-Nox-ի ՆԱԴՐՈՒ կախյալ  $O_2^-$ -գոյացման ակտիվությունը ՓԽ-ում ( $19,7 \pm 1,6$  ед/мг) գործնականորեն չի տարբերվում դրանից ՍԽ-ում: ՓԽ-ի Էկտո-Nox-ի տեսակարար ֆերիHb-վերականգնման ակտիվությունը ( $9,0 \pm 1,1$  մ/մգ) ցածր է ՍԽ-ի Էկտո-Nox-ի ակտիվությունից: Ընդ որում Էկտո-Nox-ի քանակությունը և սուպերօքսիդ-գոյացնելու ակտիվությունը ՓԽ-ում ավելի պակաս է քան ՍԽ-ում: Նշված գործոնները կարող են հանգեցնել թթվածնային անբավարարվածության շաքարախտ-1 հիվանդության ժամանակ: ՍԽ-ում և ՓԽ-ում Էկտո-Nox-ի և ՆԼՊ-ի օպտիկական կլաման սպեկտրների ձևը գործնականորեն չի փոփոխվում:

Այսպիսով ՆԼՊ-ն Nox-ի համար հանդիսանում է որպես կոֆակտոր սուպերօքսիդ ռադիկալների գոյացման գործընթացում: Հետազոտության արդյունքը կարելի է օգտագործել որպես շաքարախտ 1 տիպի հիվանդության նոր ախտորոշիչ թեստ:

*Աղյուսակ – 1 տիպի շաքարախտ – ՆԱԴՊԻՒ-պարունակող լիպոպրոտեին – էկտո-ՆԱԴՊԻՒ օքսիդազ*

The simple method for isolation and purification of ectosomes NADPH oxidase(ecto-Nox) from cytoplasm of blood erythrocytes of patients of type 1 diabetes (experimental group – EG) and donor (control group – CG), as well as NADPH containing native lipoprotein (NCL) from blood serum was elaborated for the first time. The specific content of NCL in the blood serum of CG is  $2,45 \pm 0,03$  mg/ml ( $p < 0,05$ ), and in EG –  $3,50 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ ) mg/ml. At insulin-dependent diabetes the specific NADPH-dependent  $O_2^-$ -producing activity of ecto-Nox in EG lower than that in CG. However, the specific ferriHb-reducing activity of ecto-Nox in EG lower than that in CG. The forms of its optical absorption spectra in EG and CG practically did not differ. Thus, the NCL is a cofactor for Noxin the process of generation of superoxide radicals.

Besides, the content and ferriHb reducing activity of ecto-Noxin EG is lower than that in CG. These changes can initiate some oxygen starvation in the diabetes 1 type patients. The results of this investigation can be used as new diagnostic tests for diabetes type 1 disease.

*Blood–diabete type 1– NADPH-containing lipoprotein– ecto-NADPH oxidase*

В состав цитозоля эритроцитов входят эктосомы – наночастицы, содержащие белки и гемоглобин в окружении фосфолипидного бислоя. Они увеличивают уровень внутриклеточного кальция, являются факторами окислительного стресса и считаются биомаркерами заболевания. В целом, снижение биогенеза эктосом различными средствами оказывает терапевтическое действие [11]. Однако эктосомы эритроцитов в различных ситуациях производят двойкий эффект: они подавляют [14] или стимулируют функционирование иммунных клеток [13]. Эти наночастицы играют положительную роль при переносе оксигемоглобином молекулярного кислорода, углекислого газа и окиси азота к клеткам [9].

Впервые с использованием явления нестабильного комплексообразования между изоформами NADPH-оксидазы (Nox) и ферригемоглобином (ферриHb) из ассоциированных с гемоглобином эктосом выделена суммарная фракция терминальных и активных изоформ Nox (Nox1+Nox2) [2]. Как известно, иммунные клетки нейтрализуют антигены супероксидными радикалами, продуцируемыми Nox1+Nox2 в мембранах иммунных клеток [7]. Изоформы Nox являются NADPH-зависимыми супероксид-продуцирующими ферментами, а природным источником NADPH является липопротеин высокой плотности (НЛП), который продуцирует  $O_2^-$  в присутствии ионов  $Fe^{+3}$  или  $Cu^{+2}$  [17]. Применяемые при диабете 1 и 2 типа антиоксиданты существенно подавляют релиз терминальных и активных изоформ Nox1+Nox2 из биомембран, оказывая тем самым мембраностабилизирующий эффект [3]. Изоформы Nox из эритроцитарных мембран обладают также ферриHb-восстанавливающей активностью [5]. Механизм взаимодействия нативного NADPH-содержащего липопротеина (НЛП) и экто-Nox цитозоля эритроцитов при диабете 1 типа в настоящее время не выявлен.

Целью работы являлись выделение и очистка из сыворотки крови человека НЛП и экто-Nox из цитозоля эритроцитов донорской крови и крови пациентов при инсулинзависимом диабете, а также определение удельного содержания, супероксид-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности экто-Nox под влиянием НЛП *in vitro*.

**Материал и методика.** Была использована донорская кровь и кровь пациентов при инсулинзависимом диабете (по шесть проб объемом по 5 мл, давность заболевания 5-6 лет). Для выделения эритроцитов из плазмы был использован Dextran-70 ("Loba Finchemie", Германия). Ионообменную хроматографию белковых фракций осуществляли на колонке с целлюлозой DE-52, CM-52 ("Whatman", Англия) и смолой DEAE A-50 ("Pharmacia"-Швеция). Гельфильтрацию белковых фракций проводили на колонке с сефадексом G-100 ("Pharmacia" – Швеция).

**Выделение и очистка НЛП из сыворотки крови.** Отделение плазмы крови от эритроцитов проводили с использованием 3% Dextran -70 кДа [1]. Фракцию НЛП выделяли методом осаждения из сыворотки крови [7] с небольшой модификацией – вместо FeCl<sub>3</sub> была использована 0.1 М соляная кислота. Для удаления следов белковых примесей во фракции НЛП применяли ионообменную хроматографию, используя колонки с CM-52 и DE-52 и сефадексом DEAE A-50, затем проводили гельфильтрацию с сефадексом G-100 (при pH 9,5). Для удаления следов гемоглобина осуществляли фракционирование НЛП хлороформом и этанолом (1:9 об/об). Солюбилизация НЛП в воде происходила при pH 9,5.

**Выделение и очистка фракции экто-Нох из цитоплазмы эритроцитов.** После промывания эритроцитов физраствором, их гемолиза в воде и удаления эритроцитарных мембран [3] цитоплазму эритроцитов подвергали диализу для очищения от солей. Диализат центрифугировали (14.000 × g, 15 мин), полученный супернатант подвергали ионообменной хроматографии, используя колонку с целлюлозой DE-52 для удаления следов антиоксидантов: CuZn-СОД, каталазы, а также других белковых примесей кислого характера. Для полного удаления этих примесей процедуру очистки гемоглобина повторяли. Далее pH раствора гемоглобина доводили до 9,5 путем добавления 0,1М КОН. Раствор инкубировали при температуре 37°С в течение часа. После инкубации раствор вновь подвергали ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52. После удаления осажденного гемоглобина 0,005М калий-фосфатным буфером, pH 7,4 (КФБ), суммарную фракцию экто-Нох (Нох1+Нох2) элюировали 0,2 М КФБ (при необходимости изоформы экто-Нох отделяли после гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100).

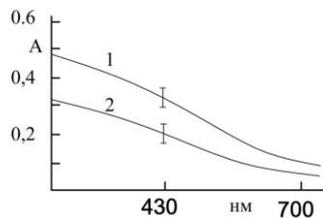
**Определение супероксид-продуцирующей активности суммарной фракции экто-Нох в отсутствие и присутствии НЛП.** Супероксид (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)-продуцирующую активность экто-Нох в отсутствие и присутствии НЛП исследовали с помощью адренилинового метода, определяя кинетику окисления адренилина в адренохром при 500 нм под влиянием продуцируемых O<sub>2</sub><sup>-</sup> [4]. За единицу O<sub>2</sub><sup>-</sup>-продуцирующей активности принимали то количество экто-Нох, которое вызывает повышение плотности максимального поглощения адренохрома на 50%. Удельную активность продуцирования O<sub>2</sub><sup>-</sup> выражали в ед/мг экто-Нох.

**Определение ферриНв-восстанавливающей активности экто-Нох.** ФерриНв-восстанавливающую активность экто-Нох определяли кинетическим методом [10]. При этом определяли кинетику снижения плотности максимального оптического поглощения ферриНв (α-полоса поглощения при 560 нм) в ходе восстановления ферриНв до ферроНв под влиянием экто-Нох. За единицу этой активности принимали то количество экто-Нох, которое вызывает снижение плотности поглощения ферриНв при 560 нм до 0,2 оптических единиц (ое). Удельную ферриНв-восстанавливающую активность выражали в ед/мг Нох.

В ходе работы были использованы спектрофотометр "Hitachi-2000" (Япония), центрифуги К-24 и К-70 ("Janetzki", Германия). Спектры флуоресценции регистрировали на приборе "Perkin Elmer" (США). Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера, с определением критерия достоверности "р" (число проводимых опытов – 6).

**Результаты и обсуждение.** Полученный согласно описанной методике НЛП из сыворотки донорской крови (контрольная группа –КГ) и сыворотки крови пациентов, больных диабетом 1 типа (опытная группа –ОГ), имеет слабое поглощение при 430 нм в видимой области спектра (рис. 1).

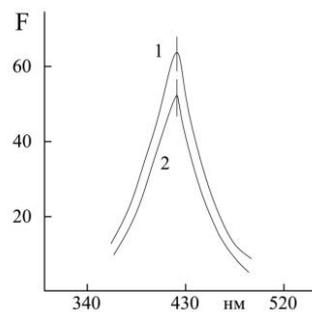
В результате очистки оптический спектральный индекс НЛП (A<sub>280</sub>/A<sub>430</sub>) ОГ и КГ составляет 8-8,2, что свидетельствует о чистоте этого липопротеина [5].



**Рис.1.** Оптический спектр поглощения НЛП из сыворотки КГ (1) и ОГ (2). Объем раствора НЛП, выделенного из 3 мл сыворотки, в КГ – 4 мл, а в ОГ – 5 мл ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Удельное содержание НЛП в сыворотке КГ составляет  $2,45 \pm 0,03$  мг/мл ( $p < 0,05$ ), а в ОГ –  $3,50 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ ) мг/мл.

NADPH в составе НЛП восстанавливает перманганат калия и нитротетразолиевый синий, предотвращает окисление адреналина в адренохром. Содержание NADPH в НЛП в КГ больше на 15-16%, чем в ОГ. Эмиссионный пик НЛП в КГ и ОГ появляется при 430 нм с длиной возбуждения 370 нм (рис.2).

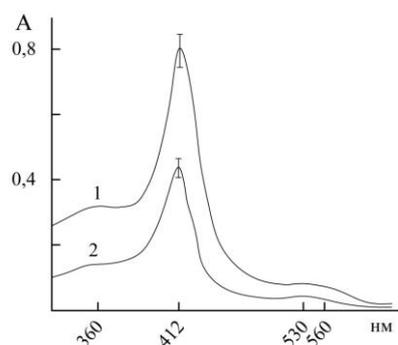


**Рис.2.** Спектр флуоресценции группы NADPH в составе НЛП из сыворотки донорской крови (1) и сыворотки крови пациентов с диабетом 1 типа (2). Концентрация НЛП в КГ и ОГ по 4 мг/мл ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). F- флуоресценция в относительных единицах.

Удельное содержание экто-Nox в КГ в 2 раза выше, чем в ОГ. Формы оптического спектра поглощения экто-Nox в КГ и ОГ практически не различаются. В окисленном состоянии оптические спектры у экто-Nox в КГ и ОГ имеют характерные максимальные оптические поглощения, аналогичные терминальным изоформам Nox1+Nox2 из эритроцитарных мембран донорской крови: 560 нм, 530 нм и 412 нм, как это показано на рис.3.

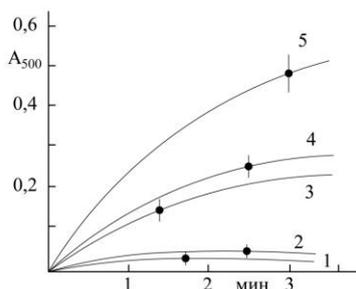
Определенная приведенным методом удельная NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая активность экто-Nox в КГ составляет  $20,1 \pm 2,1$  ед/мг, а в ОГ -  $19,7 \pm 1,6$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Это свидетельствует о том, что по сравнению с КГ при инсулинзависимом диабете NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая активность экто-Nox практически не меняется. Однако удельная ферриНв-восстанавливающая активность экто-Nox в ОГ ( $9,0 \pm 1,1$  ед/мг) несколько ниже, чем в КГ ( $11,2 \pm 2,0$  ед/мг,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Впервые показан процесс активации экто-Nox, выделенным НЛП сыворотки крови, для продуцирования  $O_2^-$  за счет электрона NADPH в составе этого липопротеина. Этим путем активирование в гомогенной фазе экто-Nox с помощью НЛП в КГ на 15-16% больше, чем в ОГ ( $p < 0,05$ ).



**Рис.3.** Оптический спектр поглощения экто-Nox из цитозоля эритроцитов донорской крови (1) и крови пациентов при диабете 1 типа (2). Объем растворов экто-Nox, выделенных из 2 мл эритроцитов, составляет 5 мл ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). После восстановления дитионитом натрия появляется характерная  $\alpha$ -полоса при 558 нм.

Эти данные получены с использованием процесса окисления адреналина под влиянием экто-Nox КГ и ОГ в отсутствие и присутствии НЛП КГ и ОГ. Отдельно НЛП обладает только восстановительными свойствами и подавляет окисление адреналина в адrenoхром. Экто-Nox практически не влияет на процесс окисления адреналина. Однако в результате совместного действия НЛП и экто-Nox в КГ и ОГ происходит резкое увеличение скорости окисления адреналина в адrenoхром (рис. 4).



**Рис.4.** Кинетические кривые окисления адреналина ( $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) в адrenoхром при 500 нм под влиянием: НЛП (0,3 мг/мл) и экто-Nox (0,4 мг/мл) в присутствии  $1,5 \cdot 10^{-8} \text{M}$  Cu,Zn-СОД (1); НЛП (2); в отсутствие экто-Nox, НЛП и СОД (3); в присутствии экто-Nox (4), под влиянием НЛП+ экто-Nox (5). Объем реакционной смеси составляет 4 мл ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Каковы механизмы представленных изменений?

1. Эктосомы ассоциируются с ферриHb, а экто-Nox отщепляется от эктосом только после инкубации с ферриHb при pH 9,5 и температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение часа. В этих условиях повышается липидная перекисидация мембран эктосом с образованием нестабильного комплекса ферриHb с локализованным в мембранах экто-Nox (Nox1+Nox2). Последний переходит из гетерогенной фазы в гомогенную.

После такой инкубации гемоглобина определенная его часть осаждается на колонке с целлюлозой DE-52, образуя нестабильный комплекс ферриHb с экто-Nox, который является гемопротеином кислого характера. Без инкубации ферриHb не осаждается на колонке с целлюлозой DE-52, является гемопротеином основного характера и осаждается на целлюлозе KM-52. Таким образом, эктосомы ассоциированы с молекулой ферриHb и за счет локализованной экто-Nox оказывают

ферриHb-восстанавливающую активность, способствуя переносу к клеткам, восстановленным гемоглобином (окси-гемоглобином), молекулярного кислорода, окиси азота и CO<sub>2</sub>. Причем, ферриHb-восстанавливающая активность экто-Nox в ОГ и КГ практически одинакова. Таким образом, в ОГ в качестве нового патогенетического механизма можно считать существенное понижение (в 2 раза) уровня эритроцитарных экто-Nox, ассоциированных с гемоглобином. С другой стороны, проникновение глюкозы через мембрану в цитоплазму эритроцитов усиливается при диабете 1 типа, что приводит к гликозилированию гемоглобина [12, 15, 16, 20]. Понижение уровня ассоциированных с гемоглобином эктосом в ОГ может быть связано с гликолизацией гемоглобина в тех участках, где должны ассоциироваться эктосомы. Это может привести к некоторому кислородному голоданию в ОГ [6]. Можно предполагать, что введенная экзогенная экто-Nox может компенсировать уровень эндогенной экто-Nox в цитоплазме эритроцитов, оказывая положительный эффект при диабете 1 типа. Возможность проникновения экто-Nox через мембраны эритроцитов и ассоциирование с гемоглобином при диабете 1 типа не исключается, что связано с увеличением проницаемости (текучести) эритроцитарных мембран на фоне повышения липидной перекисидации этих мембран [19]. Объективность этого предположения требует дальнейших исследований.

2. Супероксид-продуцирующая активность экто-Nox НЛП из сыворотки крови в КГ несколько выше (на 12-15%), чем в ОГ. Возможно, это связано с некоторым понижением уровня NADPH в составе нативного НЛП из сыворотки крови ОГ. Фактически, связанная с НЛП NADPH является источником электрона для переноса суммарной фракцией экто-Nox1+Nox2 к молекулярному кислороду для его одноэлектронного восстановления и образования O<sub>2</sub><sup>-</sup>. С другой стороны, удельное содержание НЛП в сыворотке в ОГ и КГ практически одинаковое. Активирование НЛП экто-Nox, как фактор повышения процесса окисления адреналина в адренохром, происходит в гомогенной фазе *in vitro*. Возможно, этот процесс можно было бы считать физиологическим, если бы он происходил в гетерогенной фазе – в биомембранах, где локализованы Nox, включая экто-Nox. Для выявления объективности этого предположения необходимо провести дополнительные исследования.

Обобщая вышеприведенные данные, можно сделать следующие заключения: 1. NADPH содержащий НЛП является активатором (кофактором) для экто-Nox цитозоля эритроцитов. 2. Восстановление ферриHb происходит благодаря экто-Nox, локализованной, скорее всего, на поверхностных участках мембран этих наночастиц. 3. Комплексообразование ферриHb происходит и с изоформами экто-Nox, локализованными в мембранных образованиях эктосом. 4. Существенное понижение содержания экто-Nox цитозоля эритроцитов, на наш взгляд, может быть является новым и чувствительным диагностическим тестом при инсулинзависимом диабете.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мелконян Л.Г., Симонян Р.М., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Аракелян Л.Н., Айрапетян Р.Л., Симонян М.А., Галоян А.А. Повышение уровня, NADPH зависимой O<sub>2</sub> - продуцирующей и ферригемоглобин-восстанавливающей активности изоформ цитохрома b<sub>558</sub> из мембран митохондрий и ядер клеток органов крыс после электрической стимуляции супраоптических и паравентрикулярных ядер (PVN) гипоталамуса. *Нейрохимия*, 27(2), с.155-158, 2010.
2. Симонян Р.М., Алексанян А.С., Бабаян М.А., Симонян Г.М., Алексанян С.С., Чалян С.Г., Симонян М.А. Выделение и свойства фракций изоформ NADPH оксидазы из

- мембран эритроцитов и эктосом I-IV групп крови человека. *Вопр.теорет.клин.мед.*, 20, 5,с.24-27, 2017.
3. *Симонян М.А., Каранетян А.В., Бабаян М.А., Симонян Р.М.* NADPH-содержащая супероксид-продуцирующая липопротеиновая фракция из сыворотки крови, выделение, очистка, краткие характеристики и механизм действия. *Биохимия*, 61, 5, с. 932-938, 1996
  4. *Симонян Р.М., Симонян Г.М., Симонян М.А.* Способ выделения изоформ NADPH оксидазы (Nox) из биосистем, Лицензия изобретения РА 2818 А, Ереван, 2014.
  5. *Aghajanova Y.M.* EATM decreases ex vivo releasing of NADPH-oxidases from erythrocyte membranes and blood serum of patients with diabetes types 1 and 2. *The New Armenian Medical Journal*, 7, 3, p.23-3, 2013.
  6. *Arden G.B., Sivaprasad S.* Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.*, 5, 7, с.291-304, 2011.
  7. *Arvind Panday, Malaya K Sahoo, Diana Osorio, Sanjay Batra.* NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol.* 12, 1, с. 5-23, 2015.
  8. *Björn Neu, Samuel O. Sowemimo-Coker, Herbert J. Meiselman* Cell-Cell Affinity of Senescent Human Erythrocytes. *Biophys J.*, 85, 1, с.75-84, 2003.
  9. *Maria Cristina De Rosa, Cristiana Carelli Alinovi, Antonio Galtieri, Roberto Scatena, Bruno Giardina.* The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron. Devoted to the XIV International Conference on Dioxigen Binding and Sensing Proteins. Pages 162-171. Edited by Luc Moens, Martino Bolognesi, Guido di Prisco, Cinzia Verde, 398, Issues 1–2, Pages 1-248 (15 August) 2007.
  10. *Misra H.P., Fridovich I.* The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 247, 10, с. 3170-3175, 1972.
  11. *Mohamed M. Badran, Fars K. Alanazi, Saudi.* Review. Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach. *Pharmaceutical Journal*, 25, 1, с. 8-17, 2017.
  12. *Omar S. Hajjawi Jenin.* Glucose transport in human red blood cells. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, 3, 1, с. 44-52, 2013.
  13. *Sadallah S, Eken C., Schifferli J.A.* Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clin Exp Immunol.*, 163, 1, с. 26–32. 2011
  14. *Salima Sadallah, Ceylan Eken, Jürg A. Schifferli.* Erythrocyte derived ectosomes have immunosuppressive properties. *J Leucocyte Biology*, 84, 5, с. 1316-1325. 2008.
  15. *Rapin J.R., Lespinasse C, Yoa R, Wiernsperger N.* Erythrocyte glucose consumption in insulin-dependent diabetes: effect of metformin in vitro. *Diabetes Metab.*, 17, (1 Pt 2), с. 164-167, 1991.
  16. *Shankar A., Klein R, Klein B.E., Moss S.E.* Association between glycosylated hemoglobin level and cardiovascular and all-cause mortality in type 1 diabetes. *Am. J. Epidemiol.*, 166, 4, с. 393-402. 2007.
  17. *Simonyan G.M., Galoyan K.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A.* Proline rich polypeptide (PRP-1) Increases the Superoxide-Producing and Ferrihemoglobin Reducing Activities of Cytochrome b<sub>558</sub> isoforms from Human Lymphosarcoma Tissue Cells. *Neurochem. Res.*, 36, p. 739-745, 2011.
  18. *Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A.* Stimulation of NADPH-dependent O<sub>2</sub><sup>-</sup>-producing and methemoglobin reducing activities of new isoforms of cytochrome b<sub>558</sub> by PRP-1 and G<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub>. *Neurochem. Res.*, 33, 6, с. 1155-1156. 2008.
  19. *Subbotina T., Titowa N.M., Sawchenko A.A., Panfilova V.* Lipid peroxidation and erythrocyte membrane permeability in children and adolescents with diabetes mellitus type 1. Article (PDF Available) in *Klinicheskaja Laboratorna*, with 5 Reads. June 2004.
  20. *Sushil K Jain, Robert McVie, John Duett, John J Herbst.* Top of Form Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes. *Diabetes*, 38, 12, с. 1539-1543, 1989.

Поступила 17.07.2019